

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**“Caracterización de germoplasma de *Panicum coloratum*
L. VAR. *coloratum* para la tolerancia a la salinidad,
alcalinidad y al frío”**

Por

Ing. Agr. Maria Gabriela Pittaro

Directoras Edith Taleisnik y Andrea Tomas

IFRGV-CIAP- INTA



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2017

Comisión asesora

Edith Taleisnik, IFRGV- CIAP INTA, CONICET

Andrea Tomas, EEA Rafaela, INTA

Hernán Ramiro Lascano, IFRGV- CIAP INTA, CONICET y FCEfyN, UNC

Fernando Eduardo Prado, Facultad de Ciencias Naturales e Inst. Miguel Lillo, UNT

Defensa oral y pública

Lugar y Fecha:

Calificación:

Tribunal

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

*A mi mamá; que me dio la confianza
para creer que puedo hacer
lo que me proponga.*

Agradecimientos

Agradezco al Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos y Vegetales (INTA) que me abrió sus puertas y financió mi carrera de Doctorado. A CONICET que financió inicialmente mis estudios.

Agradezco profundamente a mi Directora de Tesis Edith Taleisnik, por acompañarme incansablemente durante todo el proceso del desarrollo de mi carrera de Doctorado, por su dedicación, paciencia, su permanente consejo, por no frenar mis iniciativas y estimular mi aspecto crítico. Y sobre todo por sus enseñanzas.

Agradezco a mi co-Directora Andrea por su predisposición, paciencia, ayuda y buen trato.

Agradezco a los miembros de la comisión por sus consejos, buena predisposición y críticas durante la carrera del Doctorado.

Agradezco a mis evaluadores, en especial a la Dra Karina Grumberg que con sus correcciones mejoro sustancialmente la Tesis.

Agradezco a todos mis amigos de INTA (en especial a Loli, Leo O, Fer, Alicia, Euge, Belen, Mariela, Alita, Vero T, Tiki, Pauli, Flor A., Tomi, Ceci L, Fers, Ana, Chiche, Niko, Caro, Diego F, Carlos, Pablo, Marcos, Kari T, Nacho, Rodrigo, Natis, Lore, Franco, Andres, Daniel, y) que fueron de gran ayuda y compañía.

Finalmente agradezco a mis padres que siempre estuvieron presentes con su ayuda incansable. A mis queridos hermanos Maria Elena (Nené) y Gerardo, por sus consejos, empuje y alegría. A mi Compañero Sergio, que me auxilio constantemente, ademas de su cariño. A mi pequeño Estani por su cariño y alegría, que me acompaña firmemente en todos los momentos de mi vida. A mi Tio Juan por sus sabios consejos. A mis amigas del alma por su compañía y alegría. Agradezco a mi tía Cristina por su ojo crítico, la constancia y su ayuda permanente. A Mima y Carlos por sus buenos consejos y su ayuda.

Listado de publicaciones derivadas de la tesis

- Luna D. F., Aguirre A., Pittaro G., Bustos D., Ciacci B. Taleisnik E. 2016. Nutrient deficiency and hypoxia as constraints to *Panicum coloratum* growth in alkaline soils. Grass and Forage Science. doi: 10.1111/gfs.12263
- Pittaro G., Cáceres L., Bruno C., Tomás A., Bustos D., Monteoliva M., Ortega L. Taleisnik E. 2015. Salt tolerance variability among stress-selected *Panicum coloratum* cv. Klein plants. Grass and Forage Science. 71: 683-698.
- Pittaro, Gabriela; Bruno, Cecilia; Tomás, Ma. Andrea; Taleisnik, Edith. 2013. Evaluación de clones de *Panicum coloratum* var. *coloratum* en condiciones de campo e invernadero. Información Técnica de Forrajeras Megatérmicas. Jornada Forrajeras Tropicales 2013. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Informe Técnico 58. ISSN: 035-9129

INDICE

Índice de Tablas	8
Índice de Figuras.....	12
Índice de Imágenes	15
Abreviaturas.....	16
Resumen	19
Capítulo 1.....	21
Introducción general	21
Objetivo general.....	23
Capítulo 2.....	24
Antecedentes de la población de estudio de <i>Panicum coloratum</i> L. var. <i>coloratum</i>	24
Respuestas fisiológicas al estrés por salinidad, alcalinidad y heladas	25
Hipótesis	32
Objetivos Específicos	32
Materiales y métodos	33
Objetivos específicos 1 y 2	33
Tolerancia a la salinidad en materiales <i>P. coloratum</i> respecto al cultivar comercial 'Klein'.....	33
Caracterización de tolerancia a la helada en ausencia y presencia de salinidad en materiales <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	35
Evaluación del efecto de estrés por alcalinidad, salinidad y su combinación en materiales colectados de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	37
Objetivo específico 3	39
Respuestas fisiológicas relacionados a la tolerancia a la salinidad en materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	39
Concentración de proteínas y contenido relativo de agua (CRA).	40
Efecto de la salinidad sobre la fluorescencia de la clorofila y la actividad antioxidante de materiales de <i>P. coloratum</i> con tolerancia contrastante.	40
Potencial osmótico y concentración de prolina y sacarosa en macollos de materiales de <i>P. coloratum</i>	41
Concentración de prolina, glicina-betaína y de iones K ⁺ y Na ⁺ en láminas de materiales de <i>P. coloratum</i>	42
Técnicas analíticas	42
Determinación de daño oxidativo	43
Determinación de actividad antioxidante no enzimáticos	44
Determinación de actividad antioxidante enzimática	44
Determinación de azúcares totales, prolina, glicina-betaína	45
Análisis de datos	47

Resultados	48
Tolerancia a la salinidad en materiales de <i>P. coloratum</i> respecto al cultivar comercial 'Klein'	48
Caracterización de tolerancia a la helada en ausencia y presencia de salinidad en materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	52
Evaluación del efecto de estrés por alcalinidad, salinidad y su combinación en materiales colectados de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	53
Resumen de la caracterización de la población en estudio	58
Respuestas fisiológicas relacionados a la tolerancia a salinidad en materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	59
Concentración de proteínas solubles y contenido relativo de agua (CRA)	59
Efecto de la salinidad sobre la fluorescencia de la clorofila y la actividad antioxidante de materiales de <i>P. coloratum</i> con tolerancia contrastante.	61
Fluorescencia de la clorofila	61
Actividad antioxidante	62
Potencial osmótico y la concentración de prolina y sacarosa en macollos de materiales de <i>P. coloratum</i>	65
Prolina, glicina-betaína y concentración de iones K ⁺ y Na ⁺ en láminas de materiales de <i>P. coloratum</i>	67
Prolina y glicina-betaína	67
Concentración de iones K ⁺ y Na ⁺ en vaina y lámina	69
Discusión	72
Crecimiento de <i>Panicum coloratum</i> en salinidad	72
Respuestas fisiológicas relacionadas a la tolerancia diferencial a la salinidad	73
Ajuste osmótico	74
Acumulación de iones.....	76
Enzimas antioxidantes y tolerancia a salinidad	79
Fluorescencia de la clorofila	82
Alcalinidad y crecimiento	84
Aclimatación al frío y tolerancia a helada	85
Capítulo 3.....	87
Valoración de parámetros morfológicos y de crecimiento, relacionados al mejoramiento genético en materiales promisorios de <i>Panicum coloratum</i>	87
Hipótesis	90
Objetivos Específicos	90
Materiales y Métodos	91
Objetivo específico 1	91
Evaluación de los materiales colectados de <i>P. coloratum</i> en condiciones de campo ..	91
Acumulación de forraje	91

Estructura de la planta	92
Sincronía de floración y foliosidad	92
Objetivo específico 2	93
Evaluación de la variabilidad de familias de medios hermanos de <i>P. coloratum</i> en presencia y ausencia de salinidad	93
Fenotipificación de la variabilidad para tolerancia a la salinidad en invernadero ...	94
Análisis de datos	96
Estimación de parámetros genéticos.....	96
Resultados	99
Evaluación de los materiales colectados de <i>P. coloratum</i> en condiciones de campo ..	99
Acumulación de forraje	99
Estructura de la planta, sincronía de floración y foliosidad.....	100
Evaluación de la variabilidad de familias de medios hermanos de <i>P. coloratum</i> en presencia y ausencia de salinidad	102
Fenotipificación de la variabilidad para tolerancia a la salinidad en invernadero .	102
Estimación de parámetros genéticos.....	103
Predicción del avance genético que se obtendría al realizar selección.....	106
Discusión	107
Variabilidad fenotípica de los materiales <i>P. coloratum</i> en condiciones de campo	107
Variabilidad de la progenie de <i>P. coloratum</i> en condiciones de invernadero	107
Estimación de los componentes de varianza	109
Mejoramiento para tolerancia a salinidad	111
Capítulo 4.....	114
Conclusiones generales.....	114
Anexos	117
Bibliografía	131

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Conductividad eléctrica y pH de los líquidos de drenajes.....38
- Tabla 2. Medias y EE del contenido de proteínas referidos al peso fresco corregidas por CRA (mg de proteína/g PF) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en tratamientos control y 200 mM NaCl (T).....59
- Tabla 3. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* 4 y 15 (M), en tratamientos 50, 100 y 200 mM NaCl respecto al control (T) y su interacción, en las variables: contenido malondialdehído (MDA), antioxidantes no enzimáticos (FRAP), actividades enzimáticas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y ascorbato peroxidasa (APX).....62
- Tabla 4. Media y EE de concentraciones de prolina y glicina-betaína en laminas jóvenes de materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M) de tolerancia a salinidad contrastante, en los tratamientos de ausencia de estrés, 200 mM NaCl, pH 9 y pH 9 + 200 mM NaCl.....68
- Tabla 5. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre familias de medios hermanos de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en presencia y ausencia de 200 mM NaCl (T) y su interacción, en las siguientes variables de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), número de hojas (NH), número de macollos (NM), tasa de aparición de hojas GD (TAH) y tasa de aparición de macollos (TAM).....102
- Tabla 6. Varianzas: genética, aditiva, por bloque, del error y fenotípica y heredabilidad estricta entre progenie de *P. coloratum*, en ausencia y presencia de 200 mM NaCl, en los siguientes parámetros de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), número de hojas (NH), número de macollos (NM), tasa de aparición de hojas (TAH) y tasa de aparición de macollos (TAM).....104

- Tabla 7. Avance genético y ganancia genética media esperada con 15% de selección (K), en progenies de *P. coloratum*, en ausencia y presencia de 200 mM NaCl; para los siguientes parámetros de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), tasa de aparición de hojas (TAH), tasa de aparición de macollos (TAM), número de macollos (NM), número de hojas (NH).....105
- Anexo cap 2 Tabla 1. Materiales usados en ensayos I y II de tolerancia a helada por etapas.....115
- Anexo cap 2 Tabla 2. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en presencia y ausencia de salinidad (200 mM NaCl) (T) y su interacción, en las siguientes variables de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), número de hojas (NH), número de macollos (NM), tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de aparición de hojas GD (TAH) y tasa de aparición de macollos (TAM).....115
- Anexo cap 2 Tabla 3. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M) en presencia de salinidad respecto al control (200 mM NaCl) y su interacción, en las variables de crecimiento vegetativo: % peso seco aéreo (% PSA), % número de hojas (%NH), % número de macollos (% NM), % tasa de crecimiento relativo (% TCR), % tasa de aparición de hojas GD (% TAH) y % tasa de aparición de macollos (%TAM).....116
- Anexo cap 2 Tabla 4. Probabilidad de que el % daño de membrana sea igual entre materiales de *P. coloratum* (M), con y sin el agregado de 200 mM NaCl (T) y su interacción, luego del estrés por helada.....116
- Anexo cap 2. Tabla 5. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en tratamientos control, 200 mM NaCl, alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + 200 mM NaCl y su interacción en las variables de crecimiento vegetativo: Peso seco aéreo (PSA), número de macollos (NM), número

- de hojas (NH), tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de aparición de hojas GD (TAH), tasa de aparición de macollos (TAM), eficiencia del FII (EF II) y % de daño de membrana (% Daño)117
- Anexo cap 2 Tabla 6. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en tratamientos referidos al control (T): 200 mM NaCl/control, alcalinidad/control; alcalinidad + 200 mM NaCl/alcalinidad y su interacción, en las variables de crecimiento vegetativo: % Peso seco aéreo (% PSA), % número de macollos (% NM), % número de hojas (% NH), % tasa de crecimiento relativo (% TCR), % tasa de aparición de hojas GD (% TAH) y % tasa de aparición de macollos (% TAM).....117
 - Anexo cap 2 Tabla 7. Probabilidad de que el contenido relativo de agua (CRA) y contenido de proteínas corregido por CRA (mg de proteína/g PF) sean iguales entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en tratamientos control y 200 mM NaCl (T) y su interacción.....118
 - Anexo cap 2 Tabla 8 A. Probabilidad que los resultados sean iguales para los diferentes criterios de clasificación y su interacción, en parámetros de fluorescencia de la clorofila cuantificados a las 24 de aplicado diferentes niveles de salinidad y a los 7 días de aplicado el nivel superior de salinidad. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable. B. Probabilidad que los resultados sean iguales en parámetros de fluorescencia de la clorofila en la condición 0-50 mM NaCl por criterio de clasificación. C. Probabilidad que los resultados sean iguales en la condición 0-100 mM NaCl por criterio de clasificación. D. Probabilidad que los resultados sean iguales en la condición 0-200 mM NaCl a las 24 h de aplicado este nivel de salinidad, por criterio de clasificación. E. Probabilidad que los resultados sean iguales en la condición 0-200 mM NaCl a los 7 días de aplicado este nivel de salinidad, por criterio de clasificación.....119
 - Anexo cap 2 Tabla 9. Probabilidad de que los resultados sean iguales para el potencial osmótico, concentración de azúcares solubles totales y prolina entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en condiciones de ausencia o

- presencia de 200 mM NaCl (S), aclimatadas o no al frío (F) y su interacción.....122
- Anexo cap 2 Tabla10. Probabilidad de que las concentraciones de prolina y glicina-betaína sean iguales entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en tratamientos de ausencia de estrés, 200 mM NaCl, pH 9 y pH 9 + 200 mM NaCl (T) y su interacción.....122
 - Anexo cap 2 Tabla 11. Probabilidad de que la concentración de iones K^+ y Na^+ , en las secciones lámina y vaina sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en condiciones de (T) ausencia de estrés, presencia de: 200 mM NaCl, alcalinidad (pH 9), alcalinidad + 200 mM NaCl (pH 9 + 200) y su interacción.....123
 - Anexo cap 2 Tabla 12. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales 4 y 15 de *P. coloratum* (M) en tratamientos de ausencia de estrés, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl) y su interacción, para los iones Na^+ y K^+ en la relación vaina/lámina.....123
 - Anexo cap 2 Tabla 13. Análisis OJIP usando los datos de la fase rápida de emisión de fluorescencia.....124
 - Anexo cap 3 Tabla 1. Apreciación de matas de *P. coloratum* var. *coloratum* en Chascomús 20/11/15 por material.....124
 - Anexo cap 3 Tabla 2. Probabilidad de que los resultados sean iguales para familias de medios hermanos, particionado por tratamiento, en las siguientes variables de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA); número de hojas (NH); número de macollos (NM); tasa de aparición de hojas GD (TAH), tasa de aparición de macollos (TAM).....125

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 A. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre el peso seco aéreo PSA (g), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'...49
- Figura 1 B. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre el número de hojas (NH) finales en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.....49
- Figura 1 C. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre la tasa de crecimiento relativa (TCR) (g/ g día), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.....50
- Figura 1 D. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre la tasa de aparición de hojas (h/h día), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.....50
- Figura 1 E. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre la tasa de aparición de macollos (m/m día), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.....51
- Figura 2. % daño de membrana en materiales de *P. coloratum* en ausencia y presencia de 200 mM NaCl, luego del estrés por helada. Las barras indican valores promedios y EE. Repeticiones por material en tratamientos, salinidad n= 10 y ausencia de salinidad n= 8.....52
- Figura 3. Efecto de la alcalinidad, salinidad y su combinación sobre la tasa de crecimientos relativa (g/g día) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*, en tratamientos de ausencia de estrés, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por material en tratamientos, control n=5, 200 mM NaCl n= 8, pH 9 n=8 y pH 9 + 200 mM NaCl n=8 y. Las barras indican medias de tasa de crecimiento relativa por material. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) según test DGC.....54

- Figura 4. Efecto de la alcalinidad, salinidad y su combinación, respecto a su control, sobre la tasa de crecimiento vegetativo (%g/g día) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*. Distribución de paneles por material. Repeticiones por material y tratamiento, % 200 mM NaCl n=8, % pH 9 n=8; %pH 9 + 200 mM NaCl n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05), según test DGC.....55.
- Figura 5. Efecto de la alcalinidad, salinidad y su combinación sobre la tasa relativa de aparición de hojas (h/h día) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*, en tratamientos de ausencia de estrés, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9), alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por material en tratamientos, control n=5, 200 mM NaCl n= 8, pH 9 n=8 y pH 9 + 200 mM NaCl n=8. Las barras indican medias de tasa de crecimiento relativa por material. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) según test D G C56. ...
- Figura 6. Efectos de la salinidad en los parámetros ET_o/Rc , Tro/Rc , Di_o/Rc , Abs/Rc , Vj , Fv/fm y PI abs en materiales 4 y 15 de *P. coloratum*. Repeticiones por material en tratamiento de 200 mM NaCl referidos al control n= 5. Los parámetros se expresan como porcentaje respecto al control.....61
- Figura 7. Porcentaje de actividad enzimática SOD (A), GR (B) y CAT (C) en condición de salinidad respecto al control no salinizado, en materiales de *P. coloratum* evaluados a las 24 h de cultivo en 50, 100 y 200 mM NaCl. Las barras indican valores medios. Repeticiones por material en tratamientos referidos al control n=5. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los criterios de clasificación (p<0,05) según LSD.....63
- Figura 8. Potencial osmótico de macollos de *P. coloratum* en ausencia de salinidad y en presencia de 200 mM NaCl, en plantas aclimatadas y no aclimatadas al frío. Repetición por tratamiento n=5. Las barras indican valores medios, letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) según LSD.....64
- Figura 9. Concentración de prolina en macollos de materiales de *P. coloratum* referida a peso fresco, en ausencia (0) y presencia de 200 mM NaCl, en plantas

- aclimatadas o no aclimatadas al frío. Repetición por tratamiento n= 3. Las barras indican valores medios, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según DGC.65
- Figura 10. Concentración de prolina en láminas de hojas de materiales de *P. coloratum*, en control, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9), alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por tratamientos, control n=16, 200 mM NaCl n= 16, pH 9 n= 17 y pH 9 + 200 mM NaCl n=15. Las barras indican valores medios, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....66
 - Figura 11. Concentración de glicina-betaína en láminas de materiales de *P. coloratum*, en control, 200 mM NaCl, alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por tratamientos, control n=16, 200 mM NaCl n= 16, pH 9 n= 17 y pH 9 + 200 mM NaCl n=15. Las barras indican valores medios, letras distintas indican diferencias significativas según LSD.....67
 - Figura 12. Relación vaina/lámina para K^+ en la última hoja totalmente expandida de los materiales 4 y 15 de *P. coloratum*, cultivados en condiciones de: control, 200 mM NaCl, pH 9, pH 9 + 200 mM NaCl. Repeticiones por material y tratamiento n=3. Las barras indican valores medios, letras distintas indican diferencias significativas según LSD.....70
 - Figura 13. Acumulación de materia seca por mata en materiales de *P. coloratum* a los 161 días del trasplante, en la localidad de Chascomús. Repeticiones por material n=13. Las barras indican valores medios, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según Fisher.....99
 - Figura 14. Diámetro/altura en relación al IFFT en matas de materiales de *P. coloratum* crecidos en la localidad de Chascomús. El tamaño del círculo indica la acumulación de materia seca. Repeticiones por material n=13.....100
 - Figura 15. Acumulación de materia seca por mata en materiales de *P. coloratum* a los 104 días de crecimiento, en la localidad de Chascomús. Repeticiones por

- material n= 8. Las barras indican medias, letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) según test de Fisher.....101
- Anexo cap 2 Figura 1. Dinámica de descenso de temperatura por hora en helada.....125
 - Anexo cap 2 Figura 2. Tolerancia a la salinidad sobre diversas variables de crecimiento en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar 'Klein' y su porcentaje respecto a la condición no salina. En cada panel, las barras indican medias de las variables, letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) según test LSD. Variables por recuadro: A. % Peso seco aéreo (% PSA), B. % número de hojas por planta (% NH), C. % Tasa de crecimiento relativa por día (% g/g día), D. % Tasa de aparición de hojas medida en día (% h/h día) y E. % Tasa de aparición de macollos medida por día (% m/m día).....126
 - Anexo cap 2 Figura 3. Concentración de azúcares solubles totales en base al PF en presencia y ausencia de 200 mM NaCl, en macollos de materiales 2, 3, 4, 14 y 15 de *P. coloratum* de plantas aclimatadas y no aclimatadas al frío. Repeticiones por tratamiento n=5. Las barras indican valores medios. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$), según LSD.....127
 - Anexo cap 3 Figura 1. Acumulación de materia seca por familias de medios hermanos en ausencia de estrés por salinidad. Repeticiones por material n=13. Las barras indican medias y EE.....128
 - Anexo cap 3 Figura 2. Tasa relativa de aparición de hojas (h/h día) en familias de medios hermanos, en ausencia de estrés. Repeticiones por material n= 13. Las barras indican medias y EE (n=13).....128

ÍNDICE DE IMÁGENES

- Imagen 1. Trampas para la cosecha de semillas en lote de la localidad de Sinsacate, año 2015.....93

Abreviaturas

PS: Peso seco

PF: Peso fresco

PSA: Peso seco aéreo

PT: Peso turgente

TCR: Tasa de crecimiento relativo

IP: Índice de crecimiento

IT: Índice de tolerancia

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

PAR: Radiación fotosintéticamente activa

EROS: Especies Reactivas de Oxígeno

CRA: contenido relativo de agua

MDA: Malondialdehido

FRAP: Capacidad de reducción férrica en plasma

SOD: Superóxido dismutasa

CAT: Catalasa

APX: Ascorbato peroxidasa

GR: Glutación reductasa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

CE: Conductividad eléctrica

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

TPTZ: Tripiridiltriazina

NBT: Nitroblue tetrazolium

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)

GSSG: Glutación oxidado

RPM: Revoluciones por minuto

LSD: Fisher Least significant difference

DGC: Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves

TCA: TCA: Ácido Tricloroacético

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

FSII: Fotosistema II

f_v/f_m : Eficiencia cuántica máxima del F II

F_v : Fluorescencia variable ($F_m - F_o$)

F_m : Fluorescencia máxima F_m

V_j : Fluorescencia relativa al tiempo 2 ms luego de iniciado el pulso de luz actínica

$\phi P \alpha$: Rendimiento cuántico máximo potencial de la maquinaria fotoquímica del PSII

M_o : Pendiente inicial de la fluorescencia variable

Abs/R_c : Absorción por centros de reacción

D_{i_0}/R_c : Disipación a tiempo 0 por centros de reacción

Tr_0/Rc : Atrapamiento a tiempo 0 por centros de reacción

Et_0/Rc : Flujo de transporte de electrones. Transporte electrónico a tiempo 0 por centros de reacción

Pi Abs: índice de *performance*

IFFT: Índice que indica, presencia de flores + matas + relación hoja/tallo

RESUMEN

Panicum coloratum es una gramínea forrajera de creciente interés, ya que se considera una especie con características de tolerancia a helada, adaptada a ambientes con problemas de salinidad y alcalinidad, aunque se desconocen las variables fisiológicas subyacentes responsables de la tolerancia. Los cultivares de *Panicum coloratum* son poblaciones que presentan cierto grado de variabilidad interna que ofrece la posibilidad de seleccionar individuos. En esta Tesis se trabajó con una población colectada de *Panicum coloratum* var. *coloratum*, que fue elegida por permanecer verde, luego de haber sufrido periodos de intensa sequía. Los objetivos generales de esta Tesis fueron, contribuir al conocimiento de la variabilidad en tolerancia a salinidad en una población colectada de *P. coloratum* var. *coloratum*, evaluar tolerancia a heladas y alcalinidad, y determinar heredabilidad de caracteres asociados a la tolerancia a la salinidad.

Los resultados demostraron que la población colectada de *P. coloratum* fue más tolerante a la salinidad que el cultivar comercial 'Klein'. La variabilidad interna de esta población, en el crecimiento de los materiales en salinidad se relacionó al incremento de la actividad superóxido dismutasa y a la disminución de la proporción de la concentración del cation K^+ en vaina/lámina. El crecimiento de la gran mayoría de los materiales colectados de *P. coloratum* en alcalinidad no se vio afectado, sin embargo, el tratamiento combinado de salinidad y alcalinidad tuvo efectos similares al tratamiento de salinidad. Se trabajó bajo el supuesto de que la población de *P. coloratum* verificaría variabilidad en tolerancia a heladas, sin embargo, esto no se confirmó. Si bien los tratamientos de salinidad indujeron acumulación de compuestos orgánicos como prolina, glicina-betaína y azúcares, ésta no incrementó la tolerancia a las heladas en la mayoría de los materiales. Por último, para evaluar heredabilidad en los parámetros de crecimiento vegetativo en ausencia y presencia de salinidad, se analizaron familias de medios hermanos producto del cruzamiento de los materiales colectados y posteriormente cultivados a campo. En este grupo de materiales se observó baja heredabilidad en los parámetros de crecimiento vegetativo, así como bajos avances genéticos con una intensidad de selección del 15%, lo cual es esperable en un grupo de materiales tolerantes.

Los resultados de esta Tesis podrían resultar un aporte para encarar programas de mejoramiento en *P. coloratum* var. *coloratum* para tolerancia al estrés por salinidad, partiendo de una colecta.

Esta Tesis consta de cuatro capítulos: el primer capítulo brinda antecedentes generales de temáticas abordadas en este trabajo. El segundo capítulo se refiere al estudio de las respuestas fisiológicas asociados a la tolerancia diferencial frente al estrés por salinidad en materiales de *Panicum coloratum*, y la evaluación de la tolerancia al estrés por alcalinidad y heladas en estos. Las hipótesis que guían esta parte del trabajo se indican a continuación del marco teórico. El tercer capítulo aborda la valoración de parámetros relacionados al mejoramiento genético de tolerancia a salinidad usando la población de *P. coloratum* var. *coloratum*. Las hipótesis correspondientes a este capítulo se indican luego de la introducción. Ambos capítulos incluyen las correspondientes secciones de Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Por último, el cuarto capítulo presenta una discusión general que integra todo el trabajo realizado en esta Tesis.

CAPÍTULO 1

Introducción general

El corrimiento de la frontera agrícola ha desplazado la ganadería de zonas con potencialidad agrícola hacia zonas afectadas por sequía, salinidad y heladas. La habilitación de estas áreas a la explotación ganadera, exige incorporar pasturas adaptadas a estos ambientes marginales.

La Pampa Deprimida, es una extensa planicie de gran heterogeneidad ambiental (León, 1992) que forma parte de la pradera pampeana y ocupa alrededor de 10 millones de hectáreas dentro de la Provincia de Buenos Aires (Burkart *et al.*, 2005) incluyendo el área denominada Depresión del Salado (Vervoorst, 1967). En esta región, la cría de ganado bovino para carne es la actividad predominante (Cauhepé e Hidalgo, 2005). La expansión de la ganadería en esta área se ha sustentado con el aprovechamiento de pastizales naturales, sin embargo en las últimas décadas se registró un notable aumento de la carga animal por hectárea, que impactó negativamente sobre el pastizal reduciendo la receptividad (Otondo, 2011). La introducción de nuevas especies, entre ellas, *Panicum coloratum* L., son fundamentales para aumentar la oferta de biomasa de calidad (Petruzzi *et al.*, 2003).

El clima en la región de la Pampa Deprimida es de tipo templado, subhúmedo en el oeste y húmedo cerca del Atlántico. El 60% de los suelos de la región se incluyen en el régimen ácuico y se encuentran afectados por procesos de hidro-halomorfismo (INTA, 1990). Poseen textura franca fina, con presencia de un horizonte arcilloso sódico poco permeable (horizonte nátrico). Sobre estos se acumula el agua de lluvia que ocasiona la mayoría de las inundaciones (Lavado y Taboada, 1988; Chaneton *et al.*, 1996). Estos suelos pertenecen a los Grandes Grupos de los Natracuoles y Natracualfes (Buol *et al.*, 2011) y, en algunos casos, presentan proceso de salinización y sodificación. Ello resulta de la interacción del clima, la geomorfología, la hidrología, el uso del suelo y las propiedades del agua freática y de la dinámica de las sales (Otondo, 2011). Se considera que al menos

un 60% de los suelos son halo-hidromórficos y están afectados por deficiente drenaje, además de un exceso de sales y sodio en todo o parte del perfil (Salazar Lea Plaza y Moscatelli, 1989; Taboada y Micucci, 2009). En estos ambientes la implantación de *P. coloratum*, constituye una alternativa potencial para incrementar la oferta forrajera en los bajos salinos-alcalinos (Rossi, 2005).

En la región de la Pampa Deprimida, por otro lado, es frecuente la ocurrencia de condiciones de alcalinidad en suelos salinos (Panigatti, 2010), es decir, cuando el suelo salino contiene HCO^{-3} y/o CO_3^{-2} elevando el pH del mismo (Yang *et al.*, 2008 a; b). Respecto a *P. coloratum* se considera a esta especie como tolerante al estrés por alcalinidad, sin embargo, la bibliografía que sustenta esta información es escasa.

Por otra parte, la temperatura se considera uno de los factores claves que determina en plantas el período de crecimiento y la distribución geográfica (Chinnusamy *et al.*, 2010). En la región de la Pampa Deprimida, la temperatura media decrece desde el norte hacia el sur; la fecha media de la primera helada ocurre a principios de junio en el noreste, anticipándose un mes en el sudeste, la última helada tiene lugar a fines de agosto en el noreste y un mes más tarde en el centro oeste (Otondo, 2011). El rebrote de *P. coloratum* comienza durante el mes de septiembre (Petruzzi *et al.*, 2003), por lo que hay probabilidad de superposición entre el rebrote con heladas tardías. De esta manera, resulta interesante valorar la tolerancia a heladas durante la etapa de crecimiento inicial en la población en estudio.

Panicum coloratum L. es una especie gramínea C4 perenne de crecimiento estival, nativa de África oriental (Armando *et al.*, 2013), utilizada principalmente como fuente de forraje verde, que se caracteriza por su notable tolerancia a estrés por sequía (Tischler y Ocumpaugh, 2004). Se trata de una especie altamente polimórfica y se reconocen diferentes variedades, entre ellas, la var. *coloratum* y var. *makarikariense* como las más comunes, sin embargo, una tercera variedad la var. *kabumlabula* también es mencionada en la literatura (Tischler y Ocumpaugh, 2004). El cultivar 'Klein', perteneciente a *P. coloratum* var. *coloratum*, exhibe mayor tolerancia a la salinidad que el cultivar 'Bambatsi', de la var. *makarikariense*, mostrando mayor acumulación de biomasa durante el tratamiento de 200 mM de NaCl en condiciones de invernadero y además se identificó mayor concentración de K^+ y una mayor relación K^+/Na^+ en la parte aérea (Taleisnik *et al.*,

1998). Estas características de tolerancia, hacen que el cv 'Klein' sea considerado más atractivo para explorar variabilidad en tolerancia a la salinidad. Por otra parte, este cultivar se caracteriza por su tolerancia a sequía y a heladas (Petruzzi *et al.*, 2003), su amplia adaptación a una variedad de suelos y condiciones climáticas (Armando *et al.*, 2013), además de tolerancia a inundaciones y anegamiento (Imaz *et al.*, 2013).

En esta Tesis se estudió una población de 16 matas de *P. coloratum* var. *coloratum* cv 'Klein', que presentaron variabilidad para tolerancia a la salinidad. La var. *coloratum* presenta una reproducción de tipo alógama de forma casi estricta, ploidía tetraploide y número básico de cromosomas ($x=9$) (Tischler y Ocumpaugh, 2004; Armando *et al.*, 2013).

En la actualidad, el mejoramiento genético de pasturas se basa principalmente en el aumento de la producción y el incremento de tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Rasmussen *et al.*, 2012). Para llevar a cabo el mejoramiento, se requiere entre otros elementos de técnicas eficientes que permitan identificar variabilidad genética en una población (Munns y James, 2003). La colección del germoplasma de partida, posterior cuantificación y caracterización de la variabilidad fenotípica y genética, son los pasos iniciales antes de la implementación de un programa de mejora genética. Respecto a la población de estudio de *P. coloratum* var. *coloratum* ésta presenta variabilidad fenotípica en tolerancia a salinidad, sin embargo se desconoce si ésta se corresponde con variabilidad genética.

Objetivo general

“En esta tesis se plantea contribuir al conocimiento de la variabilidad entre materiales de *Panicum coloratum* var. *coloratum* en tolerancia a salinidad y determinar tolerancia a helada y alcalinidad”.

CAPÍTULO 2

Antecedentes de la población de estudio de *Panicum coloratum* L. var. *coloratum*

P. coloratum L. var. *coloratum* es una gramínea adaptada a zonas subtropicales y tropicales. Las principales características de esta forrajera son su resistencia a sequía, heladas (Petruzzi *et al.*, 2003) y salinidad (Taleisnik *et al.*, 1998; Pittaro, 2014; Pittaro *et al.*, 2015), con cierta variabilidad intraespecífica para estas características. Además se la considera tolerante a inundaciones y anegamiento (Cook *et al.*, 2005; Imaz, *et al.*, 2013; Imaz *et al.*, 2015), como así también a suelos de tipo alcalino (Otondo, 2011).

En este trabajo se estudió una población de 16 matas de *P. coloratum* var. *coloratum*, proveniente de un lote ubicado en la localidad de Chascomús, provincia de Buenos Aires, implantada desde hacía cinco años sobre un suelo Natracualf típico. Las matas fueron elegidas por permanecer verdes, luego de haber sufrido períodos de intensa sequía y fuertes heladas. Estos materiales colectados fueron denominados: material 1 hasta material 16.

Esta población fue caracterizada molecularmente y para tolerancia a la salinidad en una etapa anterior a este trabajo (Pittaro *et al.*, 2015), cuyos resultados se resumen a continuación. El uso de la técnica de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), permitió identificar variabilidad genotípica entre materiales *P. coloratum* var. *coloratum* colectados. La población de estudio presentó variabilidad en ausencia y presencia de salinidad, que se observó evaluando numerosas variables de crecimiento vegetativo, entre ellas, número de hojas, número de macollos, peso seco aéreo, tasa de aparición de hojas y macollos. Aunque todos los materiales de la colecta, fueron afectados negativamente por la presencia de salinidad, esta respuesta fue diferente entre ellos.

La variabilidad en tolerancia a la salinidad observada entre los materiales de *P. coloratum*, no se relaciona con diferencias en la acumulación de Na⁺ a nivel foliar, ya que

los 16 materiales presentaron una concentración promedio similar entre ellos de 0,027 mmoles/gPS en condiciones de 200 mM de NaCl.

Los diferentes cultivares de *P. coloratum* son considerados poblaciones con cierto grado de variabilidad genotípica intracultivar. Esto ofrece la posibilidad de seleccionar individuos con rasgos diferenciales, ya sea en cuanto a su aptitud productiva o de tolerancia a estrés abiótico (Young, 1994), sin embargo se desconoce si la tolerancia diferencial identificada para un determinado estrés, en este caso salinidad, puede ser usado como fuente de variabilidad con posibilidad de selección.

Respuestas fisiológicas al estrés por salinidad, alcalinidad y heladas

Levitt (1982) considera al estrés abiótico como resultante de cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para un organismo viviente. En ambientes estresantes, las plantas desarrollan estrategias de respuesta que varían de acuerdo a la especie, y se conocen como respuesta de evasión o tolerancia (Levitt, 1982). La estrategia de evasión a un estrés abiótico incluye una variedad de mecanismos que retrasan o previenen el impacto negativo del estrés. En éstas se incluyen adaptaciones de tipo morfológicas y se consideran inherentes y estables en plantas (Krasensky y Jonak, 2012). Por otro lado, en plantas la tolerancia a un ambiente estresante se encuentra relacionada a su capacidad de adaptación (Krasensky y Jonak, 2012). Las respuestas adaptativas involucran procesos moleculares, fisiológicos y bioquímicos (Miller *et al.*, 2010) que usualmente, cuando las condiciones adversas no persisten, desaparecen. Exposiciones previas y graduales a una situación de estrés, incrementan la tolerancia a una situación de estrés más severa, mediante un proceso que se denomina aclimatación (Krasensky y Jonak, 2012). La respuesta de tolerancia en plantas suele ser plástica y reversible (Krasensky y Jonak, 2012).

El estrés abiótico por salinidad afecta gravemente a la productividad agrícola y se estima que cerca del 25 % de la superficie total de nuestro planeta se encuentra afectada por dicha condición (Yeo, 1998). La salinidad afecta el crecimiento de los cultivos, el rendimiento y la productividad (Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008). La

mayoría de los cultivos tiende a disminuir su rendimiento, cuando la conductividad eléctrica del agua del suelo supera los 4 dS/m (Mass y Hoofman, 1977).

Se considera que la salinidad provoca en primer término estrés hídrico y posteriormente toxicidad iónica y desequilibrio nutricional (Greenway y Munns, 1983). Entre las respuestas a la exposición a la salinidad se distinguen las de aparición temprana, dominadas por efectos osmóticos, y las tardías donde prevalece la respuesta a la incorporación de iones (Greenway y Munns, 1983; Munns, 1993).

Los efectos osmóticos se observan inmediatamente luego de la exposición a la salinidad y provocan múltiples respuestas, entre ellas, cierre de estomas e inhibición de la división y expansión celular (Flowers *et al.*, 1991; Passioura y Munns, 2000; Munns, 2002; Fricke y Peters, 2002; Munns y Tester, 2008).

Elevadas concentraciones tisulares de Na^+ y Cl^- alteran la estructura de proteínas e interfieren en la actividad de enzimas, lo que ocasiona alteraciones metabólicas más o menos severas. El estrés iónico provoca senescencia prematura de hojas maduras y síntomas de toxicidad como clorosis y necrosis (Munns, 2002; Tester y Davenport, 2003; Munns *et al.*, 2006). La excesiva acumulación de iones reduce significativamente el crecimiento y rendimiento de los cultivo (Munns y Tester, 2008). El principal sitio de toxicidad del Na^+ en la mayoría de las plantas es la hoja bandera (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008). No obstante, pasa un tiempo hasta que la acumulación de iones llega a concentraciones tóxicas que afectan las funciones de la planta (Munns y Tester, 2008). El mantenimiento de bajas concentraciones foliares de Na^+ y un adecuado balance K^+/Na^+ se han asociado con tolerancia a la salinidad en muchos cultivos (Tester y Davenport, 2003).

Estudios previos hechos en *P. coloratum* indican que la concentración de K^+ en láminas viejas fue superior a la de Na^+ , en ausencia y presencia de salinidad (Pittaro *et al.*, 2015). Sin embargo, se desconoce si tolerancia diferencial a salinidad entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* se relaciona, con cambios en las concentraciones de K^+ y Na^+ en la última hoja totalmente expandida, y tampoco si la concentración de estos iones se altera entre las secciones vaina y lámina. Ya que, hay evidencia que la tolerancia diferencial a salinidad en líneas de trigo, se relaciona con diferente concentración de Na^+ a nivel de vaina (Davenport *et al.*, 2005).

Las condiciones de estrés abiótico inducen alteraciones de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y su detoxificación, resultando en daño oxidativo (Parida y Das, 2005). Entre las EROS más tóxicas se reconocen: ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y oxígeno singlete (O^{\cdot}). Aunque las EROS se generan normalmente en las plantas, su sobreproducción conlleva aparejados efectos dañinos en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para minimizar este daño, las plantas inducen un sistema antioxidante de defensa (Abdelgawad *et al.*, 2014). Numerosos estudios indican que la tolerancia a la salinidad en plantas se correlaciona con la respuesta antioxidante (Shoresh *et al.*, 2011). Sin embargo, algunas EROS se desempeñan además como moléculas de señalización (Miller *et al.*, 2010).

Por otro parte, la mayoría de los compartimentos celulares tienen la potencialidad de ser productoras de EROS (Vranová *et al.*, 2002), y se consideran clave en el crecimiento y desarrollo de la planta (Bose *et al.*, 2014). En condiciones de ausencia de estrés sin embargo, la formación y detoxificación de las EROS se encuentra balanceada (Alscher *et al.*, 2002), mientras que en condiciones de estrés su producción se incrementa. El exceso de oxidación conduce a daño y muerte celular (Noctor y Foyer, 1998; Bose *et al.*, 2014). Sin embargo, algunas plantas bajo condiciones de estrés responden incrementando los procesos antioxidantes (Alscher y Hess, 1993; Alscher *et al.*, 2002).

El sistema antioxidante en las plantas se agrupa en dos clases: enzimático y no enzimático. El sistema antioxidante de tipo enzimático se lleva a cabo por una serie de enzimas, que catalizan la transferencia de electrones desde las EROS a compuestos antioxidantes de bajo peso molecular (Castelli *et al.*, 2010). Se han observado cambios en la actividad de estas enzimas en plantas sometidas a estrés por salinidad (Castelli *et al.*, 2010). El sistema antioxidante no enzimático está integrado por compuestos de tipo fenólicos, alcaloides, aminoácidos no proteicos, tocoferoles, glutatión reducido (GSH), ácido ascórbico, etc. (Gholizadeh y Kohnhrouz, 2010) que en su conjunto cumplen funciones similares a los antioxidantes enzimáticos.

La acumulación de compuestos orgánicos con actividad osmótica provee elementos para el balance hídrico intracelular y constituye uno de los principales cambios bioquímicos durante la adaptación a salinidad (Hasegawa *et al.*, 2000). Estos compuestos se consideran solutos compatibles porque no inhiben el metabolismo celular, generando el potencial

osmótico requerido para permitir la absorción de agua en condiciones de menor potencial hídrico. Los solutos compatibles incluyen aminoácidos, compuestos de amonio cuaternario, sulfonio terciario (Smirnoff, 1995), polioles y carbohidratos (Adams *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 2012). Entre dichos compuestos se destaca la prolina, que desde su primer reporte en el 1954 en *Lolium perenne* (Kemble y MacPherson, 1954), ha demostrado tener una correlación positiva entre su acumulación y el incremento de la tolerancia a diversos estreses ambientales (Ahmad *et al.*, 2012). Por varios años se ha correlacionado la tolerancia a diversos estreses y la acumulación de este aminoácido (Barnett y Naylor, 1966; Singh *et al.*, 1972; Stewart y Lee, 1974; Krasensky y Jonak, 2012). Además de este, el compuesto nitrogenado glicina-betaína ha recibido mucha atención en tolerancia a estreses abióticos (Mc Cue y Hanson 1990).

Los osmolitos compatibles estabilizan las proteínas, la estructura celular y/o mantienen la turgencia celular por ajuste osmótico; además actúan en el metabolismo *redox* removiendo los niveles excesivos de EROS y restableciendo el balance *redox* (Bartels y Sunkar, 2005; Valliyodan y Nguyen, 2006; Munns y Tester, 2008; Janska *et al.*; 2010; Krasensky y Jonak, 2012).

La tolerancia a salinidad no siempre se relaciona al incremento de todos los osmolitos compatibles por igual. Como pudo observarse en un conjunto de forrajeras de la Subfamilia *Chloridoideae*, en la cual la tolerancia a salinidad se asoció positivamente a la concentración de glicina-betaína y no con la concentración de prolina (Marcum, 1999).

Como se describió arriba, la salinidad afecta la productividad en plantas. Además, conduce a la reducción del crecimiento asociado a un descenso de la tasa fotosintética (Mehta *et al.*, 2010). En condiciones de salinidad, mantener alta producción de biomasa depende de una mayor fotosíntesis neta, mínima pérdida de agua y menor consumo de energía (Naidoo *et al.*, 2012).

La fotosíntesis es particularmente sensible a diversos estreses. En condiciones de estrés por salinidad, puede estar limitada por el cierre estomático, reduciendo la concentración intracelular de CO₂ (Brugnoli y Lauteri, 1991) y por factores no estomáticos, tales como, reducción de la síntesis de clorofila, del transporte de electrones o de la fluorescencia de la clorofila (Koyro *et al.*, 2013).

La salinidad afecta la eficiencia fotosintética, la tasa de transporte de electrones del fotosistema II (FSII), induciendo cambios graduales en dicho fotosistema (Metha *et al.*, 2010; Jajoo, 2013). El análisis de la fluorescencia de la clorofila, es una técnica que permite la evaluación del funcionamiento del FSII, así como la vitalidad del sistema, en condiciones desfavorables.

Como se expresó en la introducción general, en la Depresión del Río Salado de la Provincia de Buenos Aires es frecuente la ocurrencia de condiciones de alcalinidad en los suelos salinos (Panigatti, 2010). Scoppa y Di Giácomo (1985) consideran que un 50% de la superficie de la Pampa Deprimida está ocupada por suelos sódicos y salino-sódicos con pH alcalino. Ambos estreses abióticos impactan negativamente en la productividad fotosintética y en el metabolismo general de la planta (Nishiuchi *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2012). Sin embargo, los procesos moleculares y fisiológicos que están envueltos en la respuesta son diferentes (Bui, 2013).

El ajuste osmótico y el equilibrio iónico intracelular juegan papeles claves en la resistencia de las plantas al estrés salino y alcalino (Yang *et al.*, 2007). Por otra parte, el pH en el suelo afecta directamente la absorción de elementos minerales e interfiere el restablecimiento del equilibrio iónico. Por ello, la tolerancia al NaCl no siempre acompaña a la tolerancia del estrés por alcalinidad + salinidad (Tuyen *et al.*, 2010). Existe bibliografía en arroz sobre las diferencias que presentan las tolerancias a salinidad y alcalinidad (Singh y Flowers, 2011). Por el contrario, en otros taxones de gramíneas, como el de *Chloris* (Bui, 2013), los mecanismos de tolerancia para ambos estreses aparecen compartidos (Bromham *et al.*, 2013).

La exposición de plantas a bajas temperaturas (subóptimas), no de congelación, se considera un proceso por el cual las plantas, adquieren tolerancia a las heladas a través del proceso de aclimatación al frío. En este proceso se producen modificaciones en numerosos niveles, desde moleculares hasta morfológicos. Entre ellos la expresión de genes (Smallwood y Bowles, 2002; Gilmour *et al.*, 1998), acumulación y degradación de proteínas (Guy, 1990; Kosmala *et al.*, 2009 a, b), cambios en el contenido de azúcares solubles (Hisano *et al.*, 2004) y en la maquinaria fotosintética (Rapacz *et al.*, 2008; Sandve *et al.*, 2011).

Los daños en hojas causados por heladas tardías y tempranas (final de la primavera y principio del otoño) limitan significativamente la duración del ciclo de crecimiento de las plantas, así como su producción y distribución (Woodward, 1987). Heladas tardías son especialmente perjudiciales, ya que se producen en momentos en que la mayoría de las plantas han perdido la latencia invernal (Liu y Osborne, 2008). Los daños por helada son causados principalmente por la ruptura física de las estructuras celulares causados por los cristales de hielo resultantes del congelamiento de los fluidos celulares y posterior deshidratación celular (Pearce, 2001).

Tanto los daños por frío como por heladas se manifiestan a nivel fisiológico, primariamente como daños a membranas celulares (Blum, 1988), con pérdida de su permeabilidad selectiva (Thomashow, 1999). Bajos potenciales osmóticos en células reducen los daños causados por las bajas temperaturas, al disminuir el punto de congelación de las soluciones celulares (Smallwood y Bowles, 2002).

En situación de bajas temperaturas se limita la fijación de CO₂, causando en muchos casos la fotoinhibición (Sandve *et al.*, 2011). El proceso ocurre cuando la energía absorbida en los procesos fotosintéticos es superior a la demanda energética por lo que se produce una sobre reducción del FSII y posterior inhibición de la capacidad fotosintética (Sandve *et al.*, 2011).

Estudios previos han sugerido que solamente unas pocas especies C4 tienen la capacidad para aclimatarse durante la exposición al frío, aumentando la tolerancia de las hojas a subsiguientes heladas. Entre ellas, en *Paspalum dilatatum* y *Eragrostis curvula*, forrajeras, nativas de África y tolerantes a estrés por sequía (Percival, 1977; Robinson y Whalley, 1991), se observó que la aclimatación al frío produjo cambios fisiológicos, que aumentaron notablemente la tolerancia a helada (Rowley, 1976). Resultados similares de aclimatación al frío y tolerancia a heladas fueron reportados también para plantas perennes del género *Pennisetum*, que se caracterizaban por su elevada tolerancia a sequía (Tellman, 2002). Sin embargo, otros autores informaron que la gran mayoría de estas especies C4 forrajeras no desarrollan aclimatación al frío y que tienen una mínima tolerancia a las heladas, asociada, a su vez, a altos costos energéticos (Smallwood y Bowles, 2002). Estos resultados son confirmados Liu y Osborne, (2008) en *Poaceas* C4, que sugieren que la aclimatación al frío en éstas especies es atípica (Beck *et al.*, 2007). *Panicum coloratum* se

considera una especie tolerante a helada según Tischler y Ocumpaugh (2004), sin embargo, se desconoce si materiales colectados de *P. coloratum* presentan mayor tolerancia a helada que el cultivar comercial 'Klein'. Además, determinar si la variabilidad en tolerancia a la salinidad de la población de estudio se corresponde con una tolerancia diferencial a helada.

Desde hace tiempo se investiga la capacidad de adaptación de las plantas cultivadas a una situación de estrés en particular (Miller *et al.*, 2010). Sin embargo, los cultivos rutinariamente están sometidos a una combinación de estreses (Tester y Bacic, 2005; Miller *et al.*, 2010). Por otra parte, en agricultura, la magnitud de los daños por diferentes estreses, manifiesta la necesidad de desarrollar cultivos y plantas con mayor tolerancia a diferentes combinaciones de estreses abióticos y/o bióticos (Miller *et al.*, 2010).

En plantas, la aclimatación a un estrés abiótico en particular requiere de respuestas específicas, que en algunos casos, puede diferir respecto de otros estreses abióticos (Miller *et al.*, 2010). Estudios de perfiles transcriptómicos en situación de diferentes estreses aislados, muestran cómo cada situación en particular propone respuestas únicas y de poca superposición (Miller *et al.*, 2006). Sin embargo, exposiciones simultáneas a diferentes condiciones de estrés abiótico da lugar a la coactivación de diferentes vías de respuesta a estos estreses. Además, se han observado, efectos sinérgicos o antagónicos entre las respuestas, así como, vías específicas de respuesta a un estrés particular, pueden activarse por la combinación de estreses (Miller *et al.*, 2006).

En síntesis, los estreses abióticos alteran la estructura y funciones de las plantas (Larcher, 2003). La sequía, salinidad y bajas temperaturas conducen a la pérdida de turgencia celular, desorganización de membrana plasmática, desnaturalización de proteínas y a menudo aumento del nivel de EROS. Como consecuencia de ello, hay inhibición de la fotosíntesis, disfunción metabólica y daño en la estructura celular, que conducen a la perturbación en el crecimiento, reducción de la fertilidad y senescencia prematura (Krasensky y Jonak, 2012). Algunos cambios metabólicos adaptativos son comunes entre estreses como salinidad, sequía y bajas temperatura, mientras que otros son específicos (Rizhsky *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005; Kempa *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2008; Usadel *et al.*, 2008; Urano *et al.*, 2009; Lugan *et al.*, 2010; Krasensky y Jonak, 2012).

En base a estos antecedentes se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis

1. Materiales de *P. coloratum* var *coloratum* sobrevivientes a sequía y heladas en condiciones de campo, presentan mayor tolerancia a salinidad que plantas del cultivar 'Klein'.
2. Materiales de *Panicum coloratum* var *coloratum* presentan variabilidad en tolerancia a la salinidad que se corresponde con tolerancia diferencial a la alcalinidad y helada.
3. La variabilidad en la tolerancia a la salinidad entre materiales de *Panicum coloratum* var. *coloratum* se asocia a diversos mecanismos de tolerancia: ajuste osmótico, concentración de K^+ y Na^+ y su acumulación diferencial en hoja joven, respuesta del sistema antioxidante y tasa de transporte de electrones del fotosistema II (FSII).

Objetivos Específicos

1. Comparar la tolerancia a salinidad en materiales de *P. coloratum* sobrevivientes a sequía y heladas en condiciones de campo con respecto el cultivar comercial 'Klein'.
2. Caracterizar la tolerancia a helada y alcalinidad en los materiales colectados de *P. coloratum* var. *coloratum*.
3. Evaluar la actividad fotosintética, la acumulación foliar de Na^+ , K^+ , así como de compuestos osmocompatibles (azúcares solubles, prolina y glicina-betaína), y la actividad antioxidante de materiales de *P. coloratum* cultivados en presencia o ausencia de salinidad.

Materiales y métodos

Los ensayos que se describen en este trabajo se hicieron en un invernadero, con paredes de policarbonato e iluminación suplementaria suministrada por lámparas de halogenuro metálico HQI de 400W (Osram, Argentina) y programada para ciclo diario de 16/8 h luz/oscuridad (fotoperiodo). En todos los ensayos se registraron cada hora valores de temperatura, radiación fotosintéticamente activa (PAR, $\mu\text{ mol/ m}^2\cdot\text{s}$) y humedad relativa (%HR), mediante un data logger (Cavadevices, Argentina).

Para los ensayos se usaron plantas resultantes de la multiplicación vegetativa de matas de *Panicum coloratum* var. *coloratum* colectadas en la localidad de Chascomús, que habían sobrevivido a varios años de sequía y fuertes helada, que se denominaron “materiales”. De cada material se obtuvieron macollos y se pusieron a enraizar en vasos de 330 ml conteniendo vermiculita de partículas medianas, y se obtuvieron clones de cada uno. También se utilizaron plantas obtenidas a partir de semillas de *P. coloratum* cv ‘Klein’ y se multiplicaron vegetativamente tal como se indicó con los materiales.

Objetivos específicos 1 y 2

Tolerancia a la salinidad en materiales *P. coloratum* respecto al cultivar comercial ‘Klein’.

El objetivo de esta caracterización fue evaluar a partir de caracteres morfológicos si matas colectadas tenían tolerancia incrementada a la salinidad, respecto a las plantas provenientes de semillas que no habían sido sometidas a presión de selección del ambiente, durante la etapa crecimiento vegetativo inicial.

Para la fenotipificación se usaron los materiales 2, 3, 8, 14, 15 y 16, identificados por tener comportamiento diferencial en condiciones de salinidad:

2, 3, 8: Tolerancia superior a 200 mM NaCl

14, 15, 16: Tolerancia media a 200 mM NaCl

Para la multiplicación vegetativa del cultivar comercial 'Klein' (30), semillas de éste se pusieron a germinar en *speedling* con vermiculita gruesa. Cuando las plantas alcanzaron el estadio de 4 hojas se trasplantaron a vasos conteniendo el mismo sustrato. Aproximadamente 3 semanas después de realizado el trasplante se comenzó con la multiplicación vegetativa, tal como se explicó con las matas colectadas. De esta forma, en este ensayo se partió de esquejes homogéneos de todas las plantas a caracterizar con PF promedio de 0,7 g.

Los esquejes obtenidos se dispusieron en tubetes forestales de 55 mm de diámetro y 15 cm de alto, conteniendo una mezcla de una parte de arena gruesa de río, previamente lavada, y dos partes de perlita. Los tubetes fueron dispuestos en bandejas de 59,5 x 40 x 15 cm. En cada bandeja se ubicaron 54 tubetes, y el diseño usado fue de distribución al azar misma para cada uno de los tratamientos.

Este ensayo se hizo en tres etapas secuenciales, ya que no se disponía de la cantidad de tubetes para evaluar todos los materiales juntos. En la primera etapa se evaluaron los materiales 2, 3 y 16, en la segunda el 14 y 8, y en la tercera el material 15 y el cultivar 'Klein' (30). En cada etapa se usaron 10 repeticiones de cada material en presencia de salinidad y 8 sin el agregado de NaCl. La distribución de los materiales salinizados y no salinizados fue al azar.

El nivel de salinidad final (200 mM NaCl) de cada tubete se logró proveyendo incrementos sucesivos de 50 mM de NaCl en solución mineral nutritiva de Hoagland (dilución 0,5 x) (Hoagland y Arnon, 1950). Cada tubete se regó una vez por semana con 200 ml de solución y luego de cada riego se corroboró la concentración, midiendo la conductividad eléctrica del líquido drenado de macetas seleccionadas al azar.

Este ensayo tuvo una duración aproximada de 4 semanas y durante este período se midieron las siguientes variables:

a) Peso seco aéreo (PSA): en el momento de la cosecha se separó la parte aérea de la radical. La parte aérea se colocó en estufa a 70°C durante 3 días hasta que su peso se mantuvo constante.

b) Tasas de aparición de hojas (TAH) y macollos (TAM): se contó el número de hojas y macollos dos veces por semana. Luego se calculó la pendiente de la tasa de aparición de los mismos en relación a los grados días. Se consideró 10 °C la temperatura base de la especie (Petruzzi *et al.*, 2003). También se contabilizó el n° de hojas (NH) y macollos finales (NM).

c) Tasa de crecimiento relativo (TCR): esta determinación se hizo de acuerdo a Shennan *et al.* (1987). Para este cálculo, se usó el peso inicial de cada material al trasplante (PFA t₁), el peso fresco al momento de la cosecha (PFA t₂) y los días de duración del ensayo.

$$\text{TCR: } (\ln \text{ PFA } t_2 - \ln \text{ PFA } t_1) / (D \ t_2 - D \ t_1)$$

Donde, PFA: peso fresco aéreo; D t₂ - D t₁: días acumulados en el ensayo, entre t₂ (cosecha) y t₁ (trasplante inicial).

d) Tolerancia relativa a la salinidad: este parámetro se estimó haciendo la proporción del valor de cada una de las variables en condiciones de salinidad por material, respecto a la media de ese parámetro de ese clon en ausencia de estrés.

Caracterización de tolerancia a la helada en ausencia y presencia de salinidad en materiales *P. coloratum* var. *coloratum*

Se hicieron dos ensayos de tolerancia a helada, utilizando algunos de los materiales colectados de *P. coloratum* var *coloratum* sobrevivientes a sequía y heladas en condiciones de campo. En estos ensayos se usaron esquejes homogéneos de 0,57 g de PF promedio. Estos se trasplantaron en tubetes forestales descrito en el ensayo anterior, con sustrato inerte de perlita: arena (2:1) y se dispusieron en bandejas con distribución aleatoria.

La tolerancia a la helada se evaluó comparando la estabilidad de membrana de los materiales colectados luego de ser sometidos a estrés por helada respecto a los controles que se mantuvieron en invernadero, con y sin agregado de 200 mM de NaCl. Además, se

comparó la tolerancia a helada de los materiales colectados respecto al cultivar comercial 'Klein'. Adicionalmente se constató la supervivencia de los materiales.

En estos ensayos se usaron 10 repeticiones con agregado de salinidad y 8 sin NaCl por material, la distribución del tratamiento de salinidad fue al azar.

Los ensayos tuvieron una duración de aproximadamente 30 días. Las plantas controles estuvieron en invernadero durante todo el ensayo, mientras que las plantas que fueron sometidas al estrés por helada estuvieron 21 días en invernadero y luego se trasladaron a un freezer doméstico (Neba, Argentina). Antes de proporcionar el estrés por helada las plantas fueron aclimatadas a frío.

El freezer contó con un sensor digital (Danfoos, Dinamarca) para la regulación de la temperatura. Además, se suministró luz mediante lámparas tipo *led*, con intensidad lumínica de $200 \mu\text{moles m}^{-2}\text{-seg}^{-1}$ y fotoperíodo de 16 h de luz. Además, el freezer contaba con tres ventiladores tipo *cooler* para permitir la circulación del aire. La temperatura y la intensidad luminosa se registraron con un data logger (Cavadices, Argentina) programado para la toma de datos cada 15 min. La aclimatación al frío tuvo una duración de 4 días. Durante los primeros 3 días la temperatura promedio fue de 15 °C, mientras que, el cuarto día, la temperatura descendió a 10 °C por 12 h, y por último a 5 °C. Pasado el periodo de aclimatación se suministró la helada.

Antes de aplicar la helada se tomaron muestras para la cuantificación de los osmolitos compatibles que se describen en: "Potencial osmótico y concentración de prolinas y sacarosa en macollos de materiales de *P. coloratum*" y en "Técnicas analíticas". Luego de esto se procedió a aplicar la helada.

La cinética del descenso de temperatura durante la helada fue gradual, entre 5 y 4 °C cada 2 h con las luces apagadas para simular la noche. La temperatura más baja (-9 °C) se registró a las tres horas de iniciado el periodo de helada. A partir de este punto comenzó el ascenso de la temperatura, llegando a los 0 °C después de 6 h de comenzar la helada (Anexo cap 2 Figura 1). Finalizada la helada, las plantas se mantuvieron a 5 °C hasta el día siguiente con suministro de luz. Para evitar el daño por frío del sistema radicular se agregó perlita (coeficiente de conductividad térmica 0,046) para rellenar todos los espacios entre los tubetes.

La distribución de los materiales en los ensayos I y II de tolerancia a la helada se indican en Anexo cap 2. Tabla 1.

Luego de la aplicación de helada se evaluó porcentaje de daño de membrana de la última hoja totalmente expandida de acuerdo a Blum (1988). Para esta determinación se cortaron segmentos de láminas y se colocaron en tubos de ensayo con 20 ml de agua destilada. Al cabo de 18 a 24 horas se midió la conductividad eléctrica (CE_1), luego los tubos se calentaron a 100 °C durante 30 min en un baño termostatzado, que destruye la integridad de las membranas celulares permitiendo la liberación del contenido celular. Una vez enfriados los tubos se vuelve a medir la conductividad eléctrica (CE_2). El porcentaje de daño se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Daño de membrana (\%)}: \{1 - [(T_2 - T_1) / T_2] / [(C_2 - C_1) / C_2]\} \times 100$$

Donde, T y C son los valores de CE de los materiales en los tratamientos de presencia y ausencia de helada y en control; los subíndices 1 y 2 representan las lecturas: inicial y final, respectivamente. La relación $(T_2 - T_1) / T_2$ indicaría la proporción de retención de electrolitos en el tejido.

Durante el análisis estadístico de esta determinación se corrigieron posibles diferencias en el suministro de la helada dentro del freezer. Por lo que se tuvo en cuenta la estructura de correlación entre las observaciones y se modeló ésta a partir de funciones de distancia en el contexto de los modelos lineales mixtos (Gilmour *et al.*, 1997; Zimmerman y Harville, 2008; Di Rienzo *et al.*, 2010). Estos modelos contemplan la estructura de correlación entre observaciones y controlan la variabilidad espacial.

Evaluación del efecto de estrés por alcalinidad, salinidad y su combinación en materiales colectados de *P. coloratum* var. *coloratum*

El objetivo de este ensayo fue valorar la tolerancia a la alcalinidad, salinidad y su combinación en materiales de *P. coloratum*.

Los materiales usados en esta instancia fueron:

2 y 3: Tolerancia elevada a salinidad

14, 15 y 16: Tolerancia media a salinidad.

4: Susceptible a la salinidad

Para esta fenotipificación, los materiales se multiplicaron vegetativamente en invernadero, de acuerdo al procedimiento antes descrito. En este ensayo se usaron esquejes homogéneos con 2 o 3 hojas, sin macollos, con PF promedio de 0,40 g, que se trasplantaron a macetas tipo tubos de PVC con sustrato de perlita/arena lavada (2:1).

La caracterización de los materiales para la tolerancia a la alcalinidad se realizó en invernadero, cuya temperatura media fue de 26,31 °C.

Para esta caracterización se usaron cuatro tratamientos: control; salinidad (200 mM NaCl); alcalinidad (solución alcalina pH 9) y alcalinidad + salinidad (solución alcalina pH 9 + 200mM de NaCl). El nivel de salinidad final se logró mediante incrementos sucesivos de 50 mM NaCl, disuelto en solución de Hoagland (dilución 0,5 x), con y sin agregado de solución buffer alcalina, hasta lograr la concentración deseada.

La solución alcalina consistió en buffer Na_2CO_3 (8 mM) / NaHCO_3 (2 mM) pH 9. Los tratamientos de alcalinidad fueron regados desde el principio con solución de Hoagland pH ~9 (dilución 0,5 x). Todos los tratamientos fueron regados dos veces por semana empleando 200 ml de solución por maceta, midiendo la conductividad eléctrica con un termo/conductivímetro digital de mesa Altronix (CTX-II, Argentina) y el pH con un pHmetro (Mettler Toledo MP 220) en el líquido de drenaje (Tabla 1).

Tabla 1. Conductividad eléctrica y pH de los líquidos de drenajes

Drenajes	pH	Conductividad eléctrica (DS/m)
Control (pH 7)	7,13	0,4
200 mM NaCl	7,87	19,05
Alcalinidad (pH 9)	9,18	1,42
pH 9 + 200 mM NaCl	9,14	18,88

El ensayo tuvo una duración de aproximadamente 30 días y se cuantificaron las siguientes variables:

- a) Peso seco aéreo (PSA)
- b) Tasa de aparición de hojas (TAH) y macollos (TAM), número de hojas finales (NH) y macollos finales (NM)
- c) Tasa de crecimiento relativo (TCR)
- d) Eficiencia del fotosistema II en la última hoja totalmente expandida
- e) Tolerancia relativa a la alcalinidad y alcalinidad + salinidad: este parámetro se estimó por material, comparando el valor de las variables de crecimiento en condiciones de estrés, respecto a la media de esa variable en ausencia de estrés. De esta forma se relativizó el comportamiento de los materiales bajo estrés respecto al control. Para los casos de estrés por alcalinidad y salinidad, se relativizaron con la ausencia de estrés. En el caso de estrés por alcalinidad + salinidad, se relativizó con la condición de alcalinidad.
- f) Determinación de prolina, glicina-betaína y de iones K^+ y Na^+ al momento de la cosecha (explicado en “Respuestas fisiológicas relacionados a la tolerancia a la salinidad en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*” y “Técnicas analíticas”).

Objetivo específico 3

Respuestas fisiológicas relacionados a la tolerancia a la salinidad en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*

En sucesivos ensayos realizados en condiciones de invernadero se hicieron determinaciones químicas y fisiológicas según se detalla a continuación.

Concentración de proteínas y contenido relativo de agua (CRA).

Para esta determinación se usaron los materiales colectados 4, 5, 8, 9, 13, 14, 15 y 16. Estos se multiplicaron vegetativamente en invernadero, tal como se describió previamente. En este ensayo se usaron esquejes homogéneos con 2 o 3 hojas, sin macollos, con PF promedio de 0,40 g, que se trasplantaron a macetas tipo tubos de PVC con sustrato de perlita/arena lavada (2:1).

Esta determinación se hizo en tratamientos de ausencia y presencia de 200 mM NaCl. El nivel de salinidad final se logró tal como se describió previamente. El riego se hizo mediante un sistema de hidroponía manual.

La concentración de proteínas y contenido relativo de agua se hizo a los 31 días de iniciado el ensayo. Estas determinaciones se hicieron en la lámina de la primera hoja crecida luego de iniciado el ensayo, la cual fue dividida en tres partes: la parte basal se usó para la determinación de proteínas de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976), el segmento medio se utilizó para la determinación del CRA y el segmento apical se descartó.

Efecto de la salinidad sobre la fluorescencia de la clorofila y la actividad antioxidante de materiales de *P. coloratum* con tolerancia contrastante.

Para estas determinaciones se usaron materiales de *P. coloratum* 4 y 15, de tolerancia contrastante a salinidad. Para esto, se trasplantaron esquejes homogéneos con 2 o 3 hojas, sin macollos, con PF promedio de 0,40 g, a macetas tipo tubetes forestales con sustrato de perlita/arena lavada (2:1). Luego de 21 días del trasplante de los esquejes, se realizaron los tratamientos y las determinaciones que se detallan a continuación.

Estas determinaciones se hicieron en tratamientos de ausencia y presencia de 50, 100 y 200 mM de NaCl. El nivel de salinidad se logró tal como se describió previamente y el sistema de riego fue manual.

La medición de la fluorescencia de la clorofila se efectuó sobre la última hoja totalmente expandida de macollos nuevos a las 24 h de aplicado el tratamiento salino; previa aclimatación a la oscuridad durante 20 min, luego de un pulso luz actínica saturante

(3500 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación PAR). Se usó un fluorímetro portátil Pocket Pea (Hansatech, Inglaterra), que lee la curva de inducción de fluorescencia conocida como "cinética de Kautsky". Esta cinética muestra una fase de incremento rápido de la fluorescencia en un primer segundo de iluminación, seguida de una fase lenta de declive de la fluorescencia que dura varios minutos. Los parámetros usados para establecer diferencias entre materiales y tolerancia a la salinidad se muestran en Anexo cap 2. Tabla 13.

La actividad antioxidante se cuantificó en la última lámina totalmente expandida cosechadas 24 h después de aplicado el tratamiento salino. El material colectado se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de las determinaciones. Los resultados fueron referidos al contenido proteínas, según Bradford (1976). Las determinaciones no enzimáticas y enzimáticas se exponen más adelante en la sección "Técnicas analíticas".

Potencial osmótico y concentración de prolina y sacarosa en macollos de materiales de *P. coloratum*

Estas determinaciones se hicieron en el ensayo descrito previamente "Caracterización de tolerancia al frío (helada) en ausencia y presencia de salinidad en materiales *P. coloratum* var. *coloratum*" sobre los materiales colectados 2, 3, 4, 14, 15 y 16 de *P. coloratum* (Ensayo I).

Las determinaciones que se detallan a continuación se realizaron sobre el pseudotallo de macollos nuevos crecidos durante los tratamientos de ausencia y presencia de salinidad, con y sin aclimatación al frío a los 21 días desde el trasplante.

1. Potencial osmótico: se determinó en el tejido de la sección superior del pseudotallo del macollo, utilizando psicrómetro (Wercor HR 33T con cámara C-52). Para esto se extrajo la savia de esa sección de acuerdo a Brown y Tanner (1981).
2. Azúcares solubles totales: para su determinación se usó la sección media del pseudotallo del macollo y se siguió el procedimiento de Falest (1951).

3. Prolina: se cuantificó de acuerdo al método de Bates *et al.* (1972), utilizando la sección basal.

Concentración de prolina, glicina-betaína y de iones K^+ y Na^+ en láminas de materiales de *P. coloratum*

Estas determinaciones se hicieron en el ensayo descrito previamente “Evaluación del efecto de estrés por alcalinidad, salinidad y su combinación en materiales colectados de *P. coloratum* var. *coloratum*” sobre los materiales 2, 3, 4, 14, 15 y 16.

Estas determinaciones se realizaron en la última hoja totalmente expandida de los materiales, en los tratamientos de alcalinidad, salinidad, alcalinidad + salinidad y control.

1. En la parte media de la lámina se cuantificó la concentración de prolina de acuerdo a Bates *et al.* (1972).
2. En 25 mg de láminas secas se cuantificó glicina-betaína, mediante el protocolo de Grieve y Grattan (1983).
3. La cuantificación de cationes Na^+ y K^+ , en parte superior de lámina y vaina se hizo por espectroscopia de absorción atómica usando un equipo HPLC (Shimadzu, modelo AA 6300, Japón).

Técnicas analíticas

Para la determinación de proteínas (Bradford, 1976), las láminas fueron congeladas y molidas en nitrógeno líquido. A continuación, se agregó buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4 conteniendo PVPP 100mg y EDTA 1mM. Luego de centrifugar a 14000 rpm durante 30 min a 4°C se recogió el sobrenadante para la valoración de las proteínas. A 150 µl del sobrenadante (con dilución 1:75) se les agregó 150 µl de Coomassie brilliant blue G-250 0,11 mM. A continuación, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Labsystems Multiskan MS). Para calcular la concentración de proteínas se

utiliza una curva patrón realizada con cantidades conocidas (1- 5 ug) de albúmina sérica bovina (BSA).

Contenido relativo de agua (CRA): Para esto se pesaron los segmentos en fresco (PF), luego se colocaron en cámara húmeda por 24 h y se pesaron nuevamente para obtener el peso turgente (PT). Finalmente se secaron en estufa para obtener el peso seco (PS). El CRA se determinó como la relación:

$$\text{CRA (\%)}: [(PF-PS) / (PT-PS)] *100$$

Determinación de daño oxidativo

Malondialdehído (MDA) (Hodges *et al.*, 1999): la peroxidación de lípidos está relacionada con la degradación lipídica por daño oxidativo, siendo el MDA un subproducto de aldehído secundario cuantificable por espectrofotometría de este daño. Para ello 50 mg de láminas de hoja bandera congeladas y molidas en N₂ líquido se resuspendieron en 1 ml de etanol al 80%. Luego de centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C se colectó el sobrenadante para determinar MDA. A 0,5 ml de sobrenadante calentado a 80° C por 20 min, se agregó 0,5 ml del reactivo cromógeno (TCA 20% y TBA 0,5%). Después de mezclar en vortex se calentó nuevamente a 95° C durante 30 min. Al cabo de este tiempo se enfrió en baño de hielo y se leyó la absorbancia a 540 y 600 nm con un blanco de reactivos. La valoración del MDA se hizo aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{MDA (mmol/g)}: (A_{540}-A_{600}) \times 1,5 \times 1/155$$

Dónde 155 corresponde al coeficiente de extinción molar del MDA expresado en mM⁻¹ cm⁻¹

Determinación de actividad antioxidante no enzimáticos

Se empleó el método de la capacidad del plasma para reducir el hierro, el cual cuantifica la capacidad de los antioxidantes contenidos en una muestra para reducir el tripiridil-triazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+}) (Benzie y Strain, 1996). El procedimiento se realizó en placa de ELISA con 5 μl del extracto etanólico y 200 μl de mezcla de reacción (buffer acetato de sodio 5 μM , pH 3,6; FeCl_3 55 μM ; tripiridiltriazina (TPTZ) 0,5 μM). Las muestras se incubaron en oscuridad durante 40 min y luego se midió la absorbancia a 560nm. La actividad antioxidante no enzimática se expresó sobre la base del contenido proteínico foliar.

Determinación de actividad antioxidante enzimática

La valoración de la actividad superóxido dismutasa (SOD): se realizó por la técnica de Beauchamp y Fridovich (1973). Se homogeneizaron aproximadamente 50 mg de tejido foliar en N_2 líquido, en presencia de 100 mg PVPP y 0,75 ml de buffer de extracción fosfato de potasio 50 mM, pH 7,8. Después de centrifugar el homogenato a 12000 rpm durante 30 min a 4°C, se recogió el sobrenadante para ser usado como fuente de enzima (extracto).

La actividad SOD se evaluó usando una mezcla de reacción que contenía 30 μl de extracto, buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,8; riboflavina 20 μM ; EDTA 0,1 μM , metionina 13 mM y NBT 75 μM . La mezcla se incubó durante 8 min bajo luz ultravioleta y se midió la absorbancia a 560 nm. La actividad SOD se expresó sobre la base del contenido proteínico foliar.

La actividad catalasa (CAT): se determinó por el procedimiento Aebi (1984), que mide la cinética de descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para esta medición se usó el extracto preparado para la determinación de la actividad SOD. Se adicionaron 20 μl de extracto la mezcla de reacción conteniendo buffer fosfato de potasio 0,75 M, pH 7,4 y

H₂O₂ 50 mM. La degradación del H₂O₂ se siguió a 240 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman Coulter TM, USA). Para el cálculo se usó el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ cuyo valor es 43,6 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa (APX) (Nakano y Asada, 1981): el extracto enzimático se preparó homogeneizando 50 mg de tejido foliar en presencia de N₂ líquido con buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4 conteniendo EDTA 1 mM y ácido ascórbico 0,5 mM. Luego de centrifugar a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C se recogió el sobrenadante (extracto). Para determinar la actividad APX se usó una mezcla de reacción que contiene 50 µl de extracto, 0,1 mM de H₂O₂ y ácido ascórbico 0,2 mM. La reacción se inició con la adición de H₂O₂ y se registró la oxidación del ácido ascórbico midiendo la reducción de la absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman Coulter TM, USA). Para el cálculo de la actividad se usó un coeficiente de extinción molar de 0,49 mM⁻¹ cm⁻¹.

Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR) (Schaedle y Bassham, 1977): para esta medición se usó el mismo extracto empleado para la actividad SOD. Para determinar la actividad GR se usó la siguiente mezcla de reacción: buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8; NADPH 1,5 mM, GSSG 0,5 mM; MgCl₂ 3 mM; EDTA 1 mM; 40 µl de extracto. La actividad se determina siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman Coulter TM, USA). La actividad GR se cuantificó como NADPH oxidado por minuto en función de la cantidad de proteína de la lámina foliar. Para el cálculo se usó un coeficiente de extinción molar de NADPH 6,22 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de azúcares totales, prolina, glicina-betaina

Determinación de azúcares solubles totales (Fales, 1951): para esto se pesó aproximadamente 50 mg de tejido fresco que se homogeneizó en presencia de 500 µl de

buffer Hepes -KOH 50 mM, pH 8,3. Luego de centrifugar el homogenato resultante a 17000 rpm durante 20', se colectó el sobrenadante. A 0,5 ml del sobrenadante se agregó 1ml de solución de antrona al 0,2%. Después de calentar la mezcla en baño a 100° C durante 5 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se procedió a leer la absorbancia a 620 nm contra un blanco de reactivos en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman Coulter TM, USA). La concentración de azúcares totales se obtuvo a partir de una curva patrón de glucosa (0,012-0,06 ug/ul).

Cuantificación de Prolina (Bates *et al.*, 1972): se pesaron 50 mg de tejido fresco que se molieron con el agregado de N₂ líquido. Luego se agregó 1,5 ml de ácido sulfosalicílico al 3 % y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min desechando el precipitado. A 0,5 ml del sobrenadante, se le agregó 0,5 ml de ácido acético glacial y 0,5 ml de ninhidrina ácida. Inmediatamente después se mezcló el contenido de los tubos y se calentaron a 100° C durante 1 h. Luego de enfriar en hielo, se agregó 1 ml de tolueno y se mezcló y con vortex, dejando reposar unos instantes. La mezcla se separó en dos fases recogiendo la superior que contenía la prolina. La concentración de prolina se cuantificó midiendo la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter TM, USA). Para el cálculo se preparó una curva patrón con cantidades conocidas de prolina (0,015 – 0,50 mM).

Determinación de glicina-betaína (Grieve y Grattan, 1983). Se partió de 25 mg de láminas foliares secas. Luego de pulverizar el material se le agregó 1 ml de agua destilada y se mantuvo bajo agitación durante 12-16 h. Seguidamente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 13 °C, recogiendo el sobrenadante. A 0,5 ml de sobrenadante se agregó 0,5 ml de ácido sulfúrico 2 N y se dejó reposar 1 h en frío. Luego se le agregó 0,2 ml de triioduro (KI-I₂) y se dejó reposar a 12° C por 24 h. A continuación, se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min a 0 °C y se eliminó con cuidado el sobrenadante para obtener los cristales de la betaína con yodo que quedan en el fondo y paredes del tubo. Completada esta fase, se agregó a los tubos 1 ml de 1,2 dicloroetano para disolver los cristales y se dejó reposar 1 h. Por último, se diluyó la mezcla en 1,2 dicloroetano (1:20) y se determinó la concentración de glicina-betaína a una absorbancia de 360 nm, en un espectrofotómetro UV-visible (Beckman Coulter TM, USA). Para determinar la concentración de glicina-betaína se usó una curva de betaína de 0.005–0.032 µg.

Análisis de datos

El procesamiento estadístico de datos se llevó a cabo mediante el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2013) que cuenta de una interfaz con “R” , y se realizó un análisis de varianza (ANAVA) con niveles de significancia de $p < 0,05$. En estos análisis, se compararon los datos absolutos como los relativos (proporción de la variable en condiciones de salinidad con respecto a condiciones no salinas) por variable. Las comparaciones se realizaron en diferentes criterios de clasificación (materiales de *P. coloratum*, tratamientos aplicados) y en su interacción. Posterior a los ANAVA, se hicieron test a posteriori entre ellos test de Fisher o DGC.

En todos los casos se corroboraron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, recurriendo a modelos lineales para contemplar el incumplimiento de estos.

Resultados

Tolerancia a la salinidad en materiales de *P. coloratum* respecto al cultivar comercial 'Klein'

El objetivo de esta caracterización fue evaluar si plantas colectadas por haber sobrevivido a intensas sequías y fuertes heladas, presentaban tolerancia incrementada a la salinidad durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial, respecto a plantas del mismo cultivar que no habían sido colectadas.

El crecimiento de todos los materiales colectados de *P. coloratum* junto al cultivar comercial 'Klein', fueron afectados negativamente por la presencia de salinidad. Todas las variables evaluadas presentaron menor valor absoluto en presencia de salinidad que en ausencia de la misma.

Por otro lado, se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la interacción “materiales colectados de *P. coloratum* junto al cultivar comercial 'Klein' y el nivel de salinidad evaluado” en las variables PSA, NH, TCR y TAH (Anexo cap 2. Tabla 2).

Así mismo la comparación de la tolerancia relativa a la salinidad de las diferentes variables de crecimiento diferenció los materiales entre ellos (Anexo cap 2. Tabla 3).

A continuación, se detallan los resultados por variable de crecimiento:

Los materiales 2, 3, 8 y 14 presentaron mayor peso seco aéreo (PSA) en ausencia de estrés por salinidad que los restantes materiales (Figura 1. A); mientras que en presencia de 200 mM NaCl se destacaron los materiales seleccionados 8 y 14 con mayor acumulación que el resto. Por otro lado, el cultivar comercial 'Klein' presentó similar acumulación de PSA que los materiales 15 y 16, en presencia y ausencia de salinidad. La comparación de % PSA entre materiales mostró a los materiales 8 y 14 como los menos afectados por salinidad, mientras que los materiales 2 y 3 fueron los más afectados (Anexo cap 2 Figura 2. A). El cultivar comercial 'Klein' se ubicó en el grupo de los más afectados.

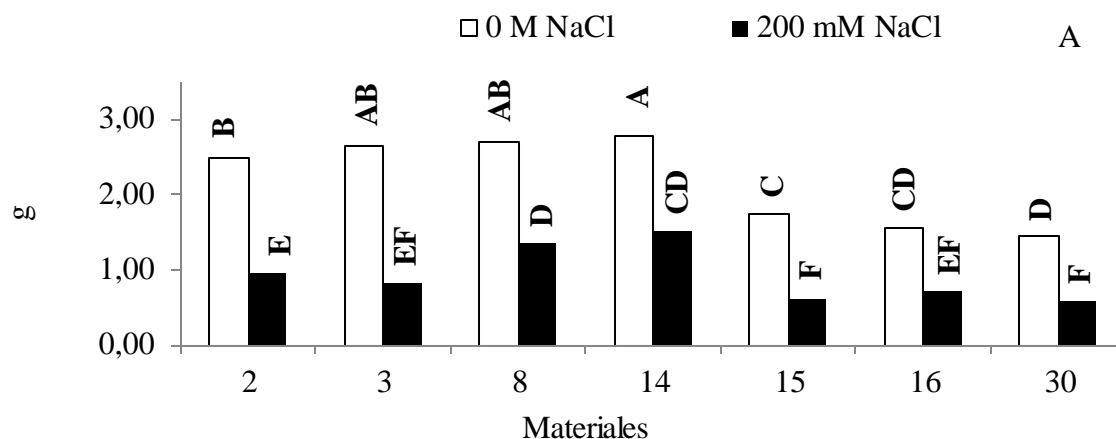


Figura 1 A. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre el peso seco aéreo PSA (g), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.

Respecto al número de hojas (NH), los materiales colectados 2, 3, 14 y 15 de *P. coloratum* presentaron similar número de hojas finales en ausencia y presencia de salinidad, tal como ocurrió con el cultivar comercial 'Klein'. Mientras que, el material 8 mostró mayor NH en presencia de salinidad que ausencia de esta (Figura 1 B). Respecto a la variable % NH, se destacó el material 8 del resto de los materiales, con un incremento del % NH en condición de salinidad respecto al control (Anexo cap 2. Figura 2. B).

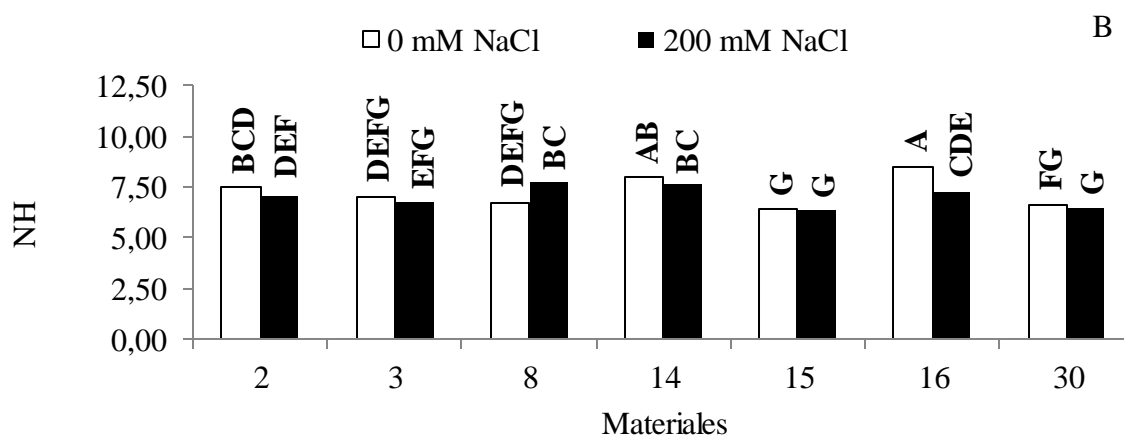


Figura 1 B. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre el número de hojas (NH) finales en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.

En ausencia de estrés todos los materiales evaluados presentaron similar tasa de crecimiento relativo (TCR) (Figura 1. C), mientras que en presencia de salinidad el cultivar 'Klein' mostró una tasa inferior que el resto. Para esta variable la salinidad no diferenció los materiales colectados entre sí. Por otro lado, para la variable % TCR, se

destacó el material seleccionado 14 del resto de los materiales evaluados, presentando mayor % TCR. Mientras que el cultivar 'Klein' presentó menor % TCR que el resto de los materiales (Anexo cap 2 Figura 2. C).

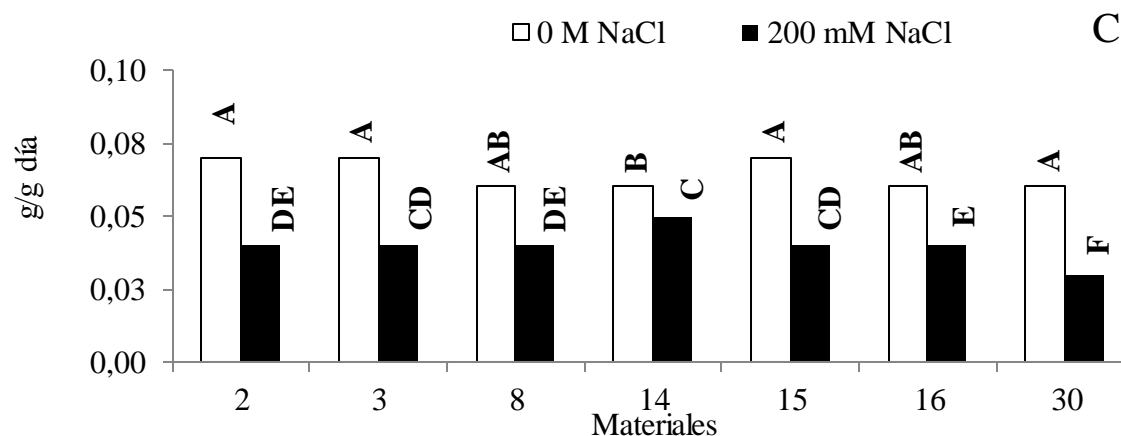


Figura 1 C. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre la tasa de crecimiento relativa (TCR) (g/ g día), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.

La salinidad afectó la tasa de aparición de hojas TAH (h/h día) en todas las plantas de *P. coloratum* de la misma manera, excepto para el material 15 que presentó una tasa superior de aparición de hojas en presencia de salinidad (Figura 1. D). Respecto a la variable tasa de aparición de macollos TAM (m/m día) los materiales colectados de *P. coloratum* presentaron similar TAM en ausencia y presencia de salinidad excepto los materiales 2 y 15 junto al cultivar comercial 'Klein' (Figura 1. E) siendo en estos casos, inferior la tasa en salinidad.

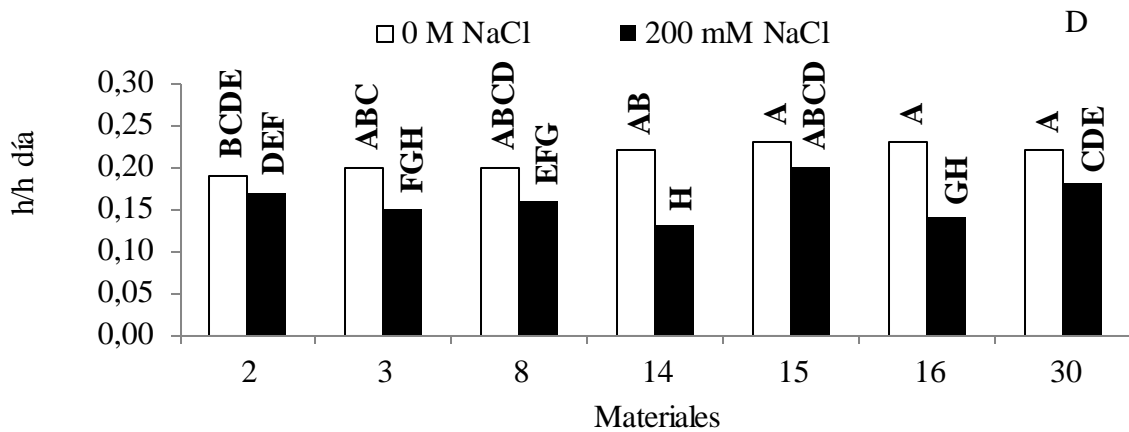


Figura 1 D. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre la tasa de aparición de hojas (h/h día), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.

El porcentaje respecto al control de las variables TAH presentó elevados valores para los materiales colectados 8 y 15, mientras que para % TAM los materiales 8 y 14 presentaron mayor relación. (Anexo cap 2 Figura 2. D y E).

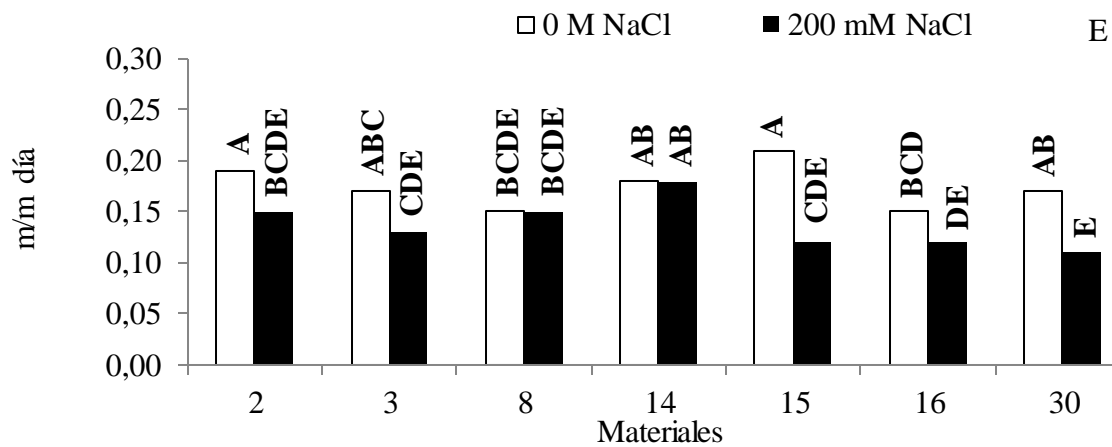


Figura 1 E. Efecto de la salinidad (200 mM NaCl) sobre la tasa de aparición de macollos (m/m día), en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar comercial 'Klein'.

Figura 1. A, B, C, D y E. En cada panel, las barras indican medias de las variables, letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05) según test LSD. Repeticiones por material y tratamientos, en salinidad n= 10, en ausencia de salinidad n= 8 y en porcentaje respecto al control n=10.

Caracterización de tolerancia a la helada en ausencia y presencia de salinidad en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*

El objetivo de este ensayo fue caracterizar la tolerancia a helada en los materiales seleccionados, durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial, en ausencia y presencia de salinidad. Se trabajó sobre la hipótesis de que la exposición a condiciones salinas incrementa la tolerancia a helada. Para esta caracterización se hicieron dos ensayos, y considerando que ambos aportaron resultados similares, se muestran los resultados de uno de ellos.

Para la caracterización de tolerancia a helada se utilizó la relación de estabilidad de membranas de los materiales que fueron sometidos al estrés por helada, en ausencia y presencia de 200 mM NaCl, respecto a los que se mantuvieron en invernadero. Este parámetro identificó diferencias significativas en la interacción “materiales de *P. coloratum* y nivel de salinidad” (Anexo cap 2. Tabla 4), indicando de este modo que no todos los materiales de la colecta presentaron similar % daño de membrana en ausencia y presencia de salinidad.

En esta instancia se destacaron los materiales colectados 2, 3, 4, 8, 14 y 16 junto al cultivar ‘Klein’ con % daño de membrana similar en ausencia y presencia de salinidad (Figura 2). Por otro lado, el material 15 mostró diferencias significativas en la variable % de daño de membrana en ausencia y presencia de salinidad; siendo superior el % daño en ausencia de salinidad respecto a la presencia de la misma (Figura 2).

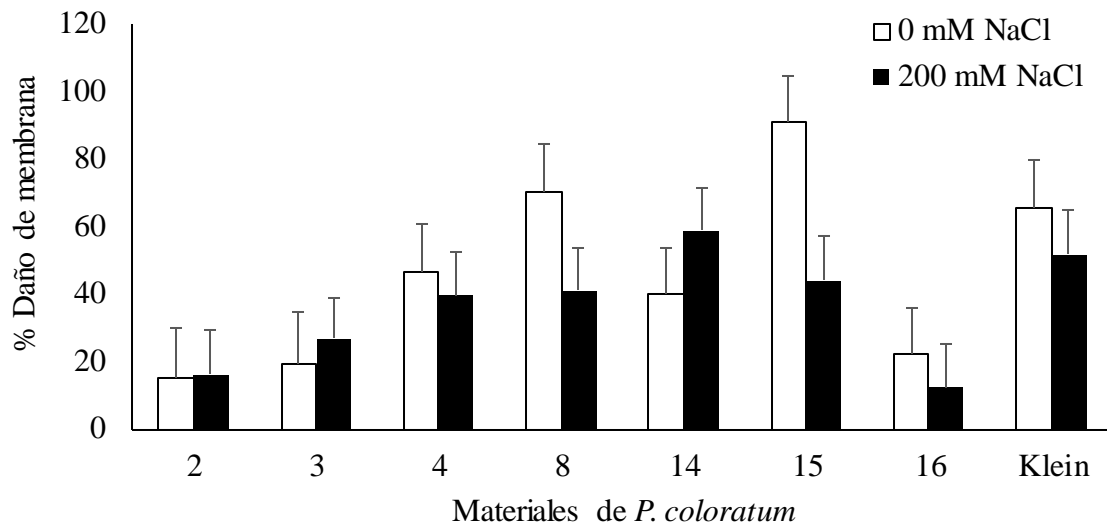


Figura 2. % daño de membrana en materiales de *P. coloratum* en ausencia y presencia de 200 mM NaCl, luego del estrés por helada. Las barras indican valores promedios y EE. Repeticiones por material en tratamientos, salinidad n= 10 y ausencia de salinidad n= 8.

Cabe destacar en esta instancia, que las diferencias significativas en tolerancia a helada entre materiales se identificaron en la última hoja totalmente expandida. Sin embargo, ninguna de las repeticiones de los materiales murió luego de la aplicación del estrés por helada.

Evaluación del efecto de estrés por alcalinidad, salinidad y su combinación en materiales colectados de *P. coloratum* var. *coloratum*

Para detectar variabilidad entre materiales colectados de *P. coloratum* en condiciones de estrés por alcalinidad, se evaluó la afectación de las variables de crecimiento vegetativo en presencia de condiciones de alcalinidad y en combinación de estreses de alcalinidad y 200 mM NaCl.

Como se puede observar en Anexo capítulo 2. Tabla 5, todas las variables de crecimiento se vieron afectadas por la aplicación de los tratamientos. Los materiales mostraron diferencias entre ellos para las variables NM, NH y TCR. Por otro lado, las variables TCR y TAH fueron las únicas que presentaron diferencias significativas en la interacción “material y tratamiento aplicado”.

Por otra parte, la comparación de la eficiencia del Fotosistema II (FSII) no mostró diferencias en la interacción “materiales y tratamientos” Anexo capítulo 2. Tabla 5.

Respecto a la TCR, en general, la alcalinidad no afectó la mayoría de los materiales evaluados, salvo el material 3 que presentó una TCR menor (Figura 3).

En presencia de salinidad se destacó el material 15 del resto, con mayor TCR, mientras que el material 4 resultó ser el más afectado (Figura 3).

Por otro lado, la presencia de salinidad y alcalinidad + salinidad redujeron significativamente y de manera similar la TCR en todos los materiales, salvo los materiales 3 y 4, que resultaron más afectados por la combinación de ambos estreses (Figura 3).

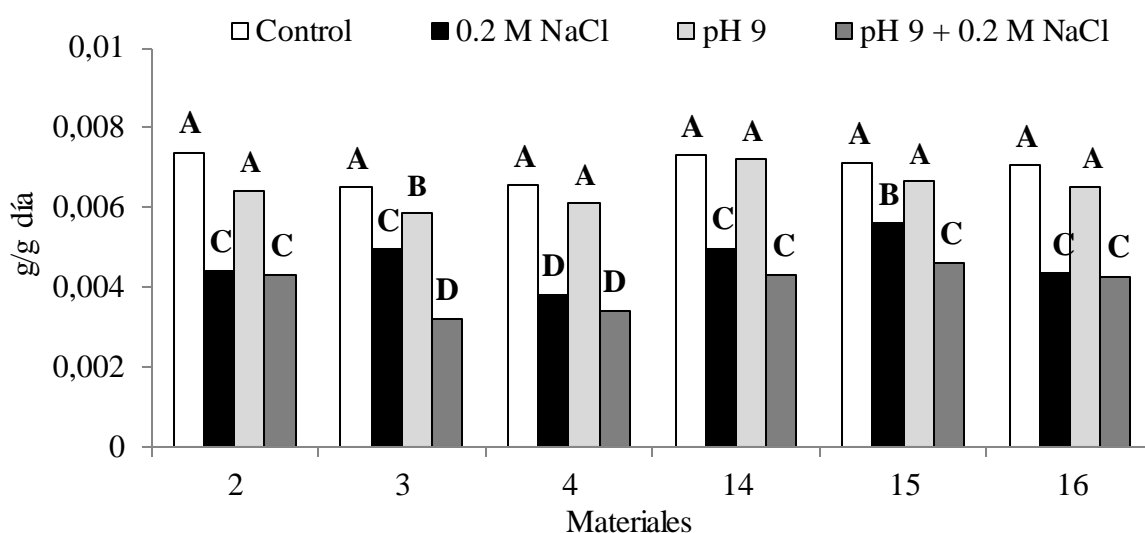


Figura 3. Efecto de la alcalinidad, salinidad y su combinación sobre la tasa de crecimientos relativa (g/g día) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*, en tratamientos de ausencia de estrés, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por material en tratamientos, control n=5, 200 mM NaCl n=8, pH 9 n=8 y pH 9 + 200 mM NaCl n=8 y. Las barras indican medias de tasa de crecimiento relativa por material. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según test DGC.

Respecto a la tolerancia relativa a la alcalinidad, sólo % TCR mostró diferencias en la interacción “material y tratamiento” (Anexo cap 2. Tabla 6). Para esta variable, el

tratamiento alcalinidad/control no diferenció los materiales colectados (Figuras 4). La combinación de alcalinidad + salinidad /control tampoco diferencio a ninguno de los materiales. Por otra parte, la salinidad/control diferenció los materiales y se destacaron los materiales 15, 14 y 3.

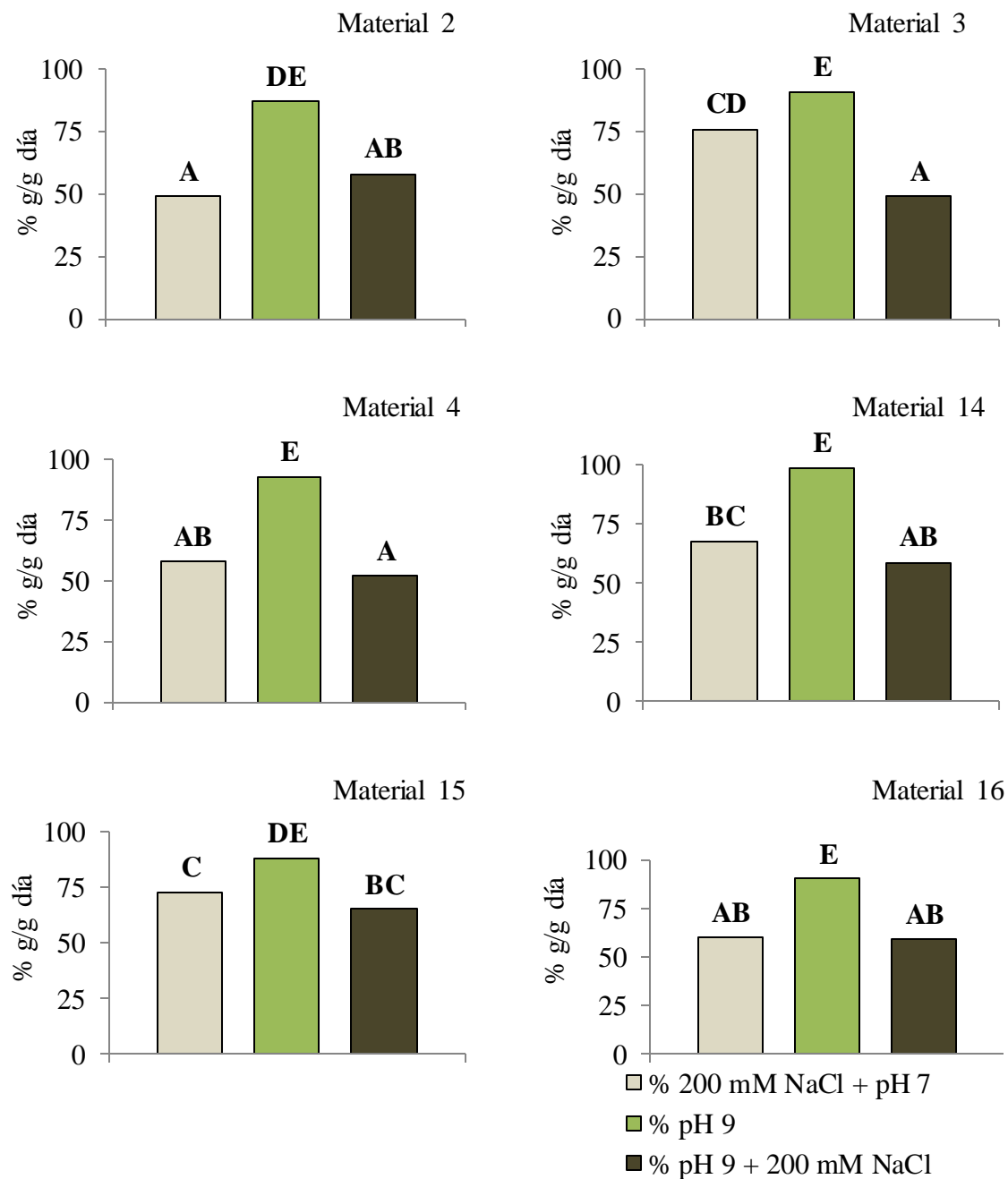


Figura 4. Efecto de la alcalinidad, salinidad y su combinación, respecto a su control, sobre la tasa de crecimiento vegetativo (%g/g día) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*. Distribución de paneles por material. Repeticiones por material y tratamiento, % 200 mM NaCl n=8, % pH 9 n=8; %pH 9 + 200 mM NaCl n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según test DGC.

Respecto a la variable TAH se destacaron con altos valores los materiales 3, 4, 14 y 15 en condición control, junto a 16 y 4 en presencia de pH 9. Por otro lado, la presencia de salinidad y la combinación de salinidad y alcalinidad no diferenciaron la tasa de aparición de hojas entre materiales colectados de *P. coloratum* (Figura 5).

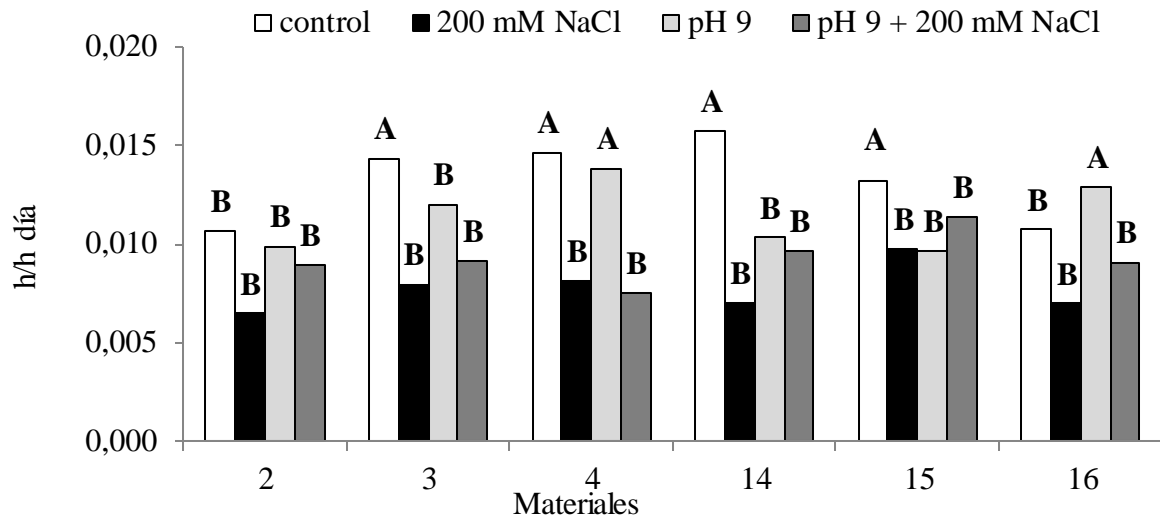


Figura 5. Efecto de la alcalinidad, salinidad y su combinación sobre la tasa relativa de aparición de hojas (h/h día) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*, en tratamientos de ausencia de estrés, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9), alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por material en tratamientos, control n=5, 200 mM NaCl n= 8, pH 9 n=8 y pH 9 + 200 mM NaCl n=8. Las barras indican medias de tasa de crecimiento relativa por material. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según test DGC.

Resumen de la caracterización de la población en estudio

Primeramente, se pudo establecer que la presencia de salinidad (200 mM NaCl) afectó el crecimiento de todos los materiales de *P. coloratum*. Entre los materiales colectados, se destacan los materiales 14 y 8 con una mayor acumulación de materia seca por planta en presencia de salinidad. Por otro lado, los materiales colectados presentaron en conjunto mayor tasa de crecimiento relativa que el cultivar comercial 'Klein' en presencia de salinidad.

Respecto a la tolerancia a helada en *P. coloratum* var *coloratum* se puede asumir, que la gran mayoría de los materiales colectados presentaron igual tolerancia a helada en presencia y ausencia de salinidad que el cultivar comercial 'Klein'. Por otro lado, entre los materiales colectados, el material 15 fue el único que en presencia de salinidad la tolerancia a helada mejoró significativamente.

Por último, se pudo establecer que la alcalinidad por sí sola no afecta el crecimiento de la mayoría de los materiales de *P. coloratum* colectados. La combinación de este estrés con la salinidad redujo la tasa de crecimiento en todos los materiales, aunque esta reducción fue mayor en los materiales 3 y 4. Por otro lado, en este ensayo el material 4 fue el más afectado por la presencia de salinidad y el 15 el más tolerante.

Respuestas fisiológicas relacionados a la tolerancia a salinidad en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*

Concentración de proteínas solubles y contenido relativo de agua (CRA)

La cuantificación de proteínas mostró diferencias significativas entre materiales y por nivel de salinidad. Mientras que el CRA mostró diferencias entre los tratamientos (Anexo cap 2 Tabla 7). Para esta última variable, los materiales crecidos en presencia de 200 mM NaCl presentaron un CRA del 92,86 %, inferior que en ausencia de la misma (96,67 %).

Luego, se procedió a corregir la concentración de proteínas respecto al CRA en los materiales y por tratamiento. Estos resultados identificaron diferencias significativas en la interacción “material y tratamiento de salinidad” tal como se puede observar en Anexo cap 2. Tabla 7. Respecto a este, se verificaron que en presencia de salinidad todos los materiales tuvieron similar concentración de proteínas corregidas por CRA entre materiales. Por otro lado, en ausencia de salinidad se observaron diferencias entre estos, siendo los materiales 16, 15 y 14 los de mayor concentración de proteína (tabla 2).

Tabla 2. Medias y EE del contenido de proteínas referidos al peso fresco corregidas por CRA (mg de proteína/g PF) en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en tratamientos control y 200 mM NaCl (T).

mg prot/g PF * CRA				
Material	Trat (mM NaCl)	Medias	E.E.	Diferencias significativas según Fisher
4	0	30,51	2,41	B C
5	0	19,1	6,72	C
8	0	25,12	1,77	C
9	0	22,31	1,16	C
13	0	22,74	7,86	C
14	0	32,76	1,57	A B C
15	0	41,3	10,91	A B C
16	0	57,79	12,48	A
4	200	46,21	4,72	A B
5	200	54,53	13,13	A B
8	200	49,71	3,46	A B
9	200	30,99	2,28	B C
13	200	43,14	15,38	A B C
14	200	25,97	3,76	C
15	200	34,16	27,54	A B C
16	200	39,88	24,41	A B C

Nota: Repeticiones por material n=3.

Efecto de la salinidad sobre la fluorescencia de la clorofila y la actividad antioxidante de materiales de *P. coloratum* con tolerancia contrastante.

Fluorescencia de la clorofila

A las 24 h de aplicados los tratamientos de salinidad (50, 100, 200 mM NaCl) los materiales no manifestaron efectos significativos en la interacción “material y salinidad” en los parámetros de fluorescencia de clorofila. Así mismo, pasados los 7 días de la aplicación del nivel superior de salinidad tampoco se observaron diferencias en la interacción “material y salinidad (200 mM de NaCl)” (Anexo cap 2 Tabla 8. A).

Para visualizar esto, se graficaron parámetros de fluorescencia de la clorofila, usando la relación salinidad/control *100 en materiales de tolerancia contrastante a los 7 días de aplicado 200 mM NaCl (Figura 6). Este gráfico mostró relaciones similares entre ambos.

Sin embargo, pudieron observarse efectos significativos a las 24 h de aplicado 50 mM NaCl por nivel de tratamientos en el parámetro F_v/F_m , que disminuyó en las plantas estresadas. Asimismo, en ese tiempo se diferenciaron los materiales entre ellos en las variables V_j , Dio/R_c , Tro/R_c , Eto/R_c . En todas estas variables el material 15 fue superior al material susceptible 4 (Anexo cap 2 Tabla 8. B).

Por otro parte, a las 24 h aplicado el tratamiento de 100 mM NaCl pudo observarse efecto de la salinidad en la variable V_j , que fue superior en ausencia de salinidad respecto a la presencia de ésta. Por otro lado, los parámetros P_i , Abs y Eto/R_c aumentaron en presencia de 100 mM NaCl en relación a la ausencia de estrés. Respecto a ABs/R_c , Dio/R_c , Tro/R_c , Eto/C_r , pudieron identificarse diferencias significativas para materiales de tolerancia contrastante, siendo superior en el material tolerante respecto a susceptible (Anexo cap 2 Tabla 8. C).

A las 24 h de aplicado el nivel superior de salinidad, se observaron mayores valores de V_j en el material 15 respecto a 4. Por otro lado, el Tro/R_c y Eto/R_c presentaron niveles superiores en el material 4 respecto al 15 (Anexo cap 2 Tabla 8. D).

Por último, a los 7 días de aplicado el nivel superior de salinidad se identificaron diferencias entre tratamientos en los parámetros Vj y Pi Abs (Anexo cap 2 Tabla 8. E).

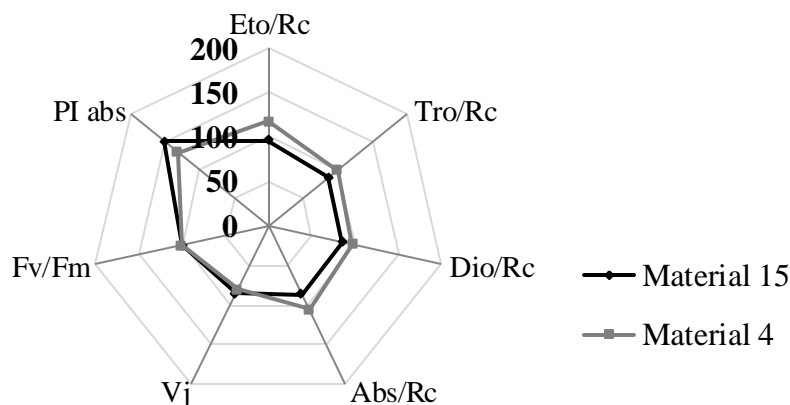


Figura 6. Efectos de la salinidad en los parámetros ET_0/Rc , Tro/Rc , Di_0/Rc , Abs/Rc , V_j , Fv/fm y $PI\ abs$ en materiales 4 y 15 de *P. coloratum*. Repeticiones por material en tratamiento de 200 mM NaCl referidos al control $n=5$. Los parámetros se expresan como porcentaje respecto al control.

Actividad antioxidante

Los tratamientos salinos no modificaron el nivel de peroxidación lipídica en materiales contrastantes ($p>0.05$), así como tampoco los niveles de antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos (Tabla 3).

Respecto a las enzimas antioxidantes, SOD y GR mostraron diferencia significativa en la interacción “material y nivel de salinidad” (Tabla 3). Como puede observarse en la figura 7 A, la actividad SOD en el material 15 disminuyó en presencia de 50 mM NaCl respecto al control y luego subió su actividad conforme aumentó la salinidad del medio. Hasta alcanzar un 50% por encima del control en presencia de 200 mM NaCl. Por otro lado, el material 4 (susceptible a salinidad) no registró cambios en la actividad de SOD en los diferentes tratamientos de salinidad.

La actividad GR mostró un comportamiento inverso a SOD, ya que, el material susceptible a salinidad presentó una actividad superior al control en presencia de 50 mM NaCl, que posteriormente disminuyó en los incrementos sucesivos de salinidad. Mientras que, el material de mayor tolerancia, presentó baja actividad GR en presencia de 50 y 100 mM NaCl (Figura 7 B).

Por otro lado, la actividad de la enzima CAT, resultó afectada por los tratamientos salinos, de manera similar en ambos materiales. Como puede observarse en la figura 7 C con 50 mM NaCl la actividad CAT aumentó 25% en el material susceptible y un 100% en el tolerante. Luego, conforme fue progresando el tratamiento de salinidad la actividad de esta enzima disminuyó en ambos materiales y se mantuvo en niveles similares al control.

Por su parte, la actividad APX no se vio afectada por los tratamientos salinos. Sin embargo, el material 4 presentó mayor actividad APX que 15. Para esta enzima la presencia de 200 mM NaCl, no dio resultados coherentes por lo que no se agregó en los análisis (Figura 7 D). Así como también, las enzimas GR y APX en presencia de 200 mM NaCl no mostraron resultados consistentes.

Tabla 3. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* 4 y 15 (M), en tratamientos 50, 100 y 200 mM NaCl respecto al control (T) y su interacción, en las variables: contenido malondialdehído (MDA), antioxidantes no enzimáticos (FRAP), actividades enzimáticas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutathion reductasa (GR) y ascorbato peroxidasa (APX).

	p- valor					
	MDA	FRAP	SOD	CAT	GR	APX
Material (M)	0,2225	0,319	0,7854	0,0061	0,0001	0,0323
Tratamiento (T)	0,5318	0,9447	0,0149	<0,0001	0,5399	0,4729
M y T	0,3112	0,3654	0,0259	0,1407	0,0082	0,3683

Nota: Repeticiones por material en tratamientos referidos al control n= 5. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

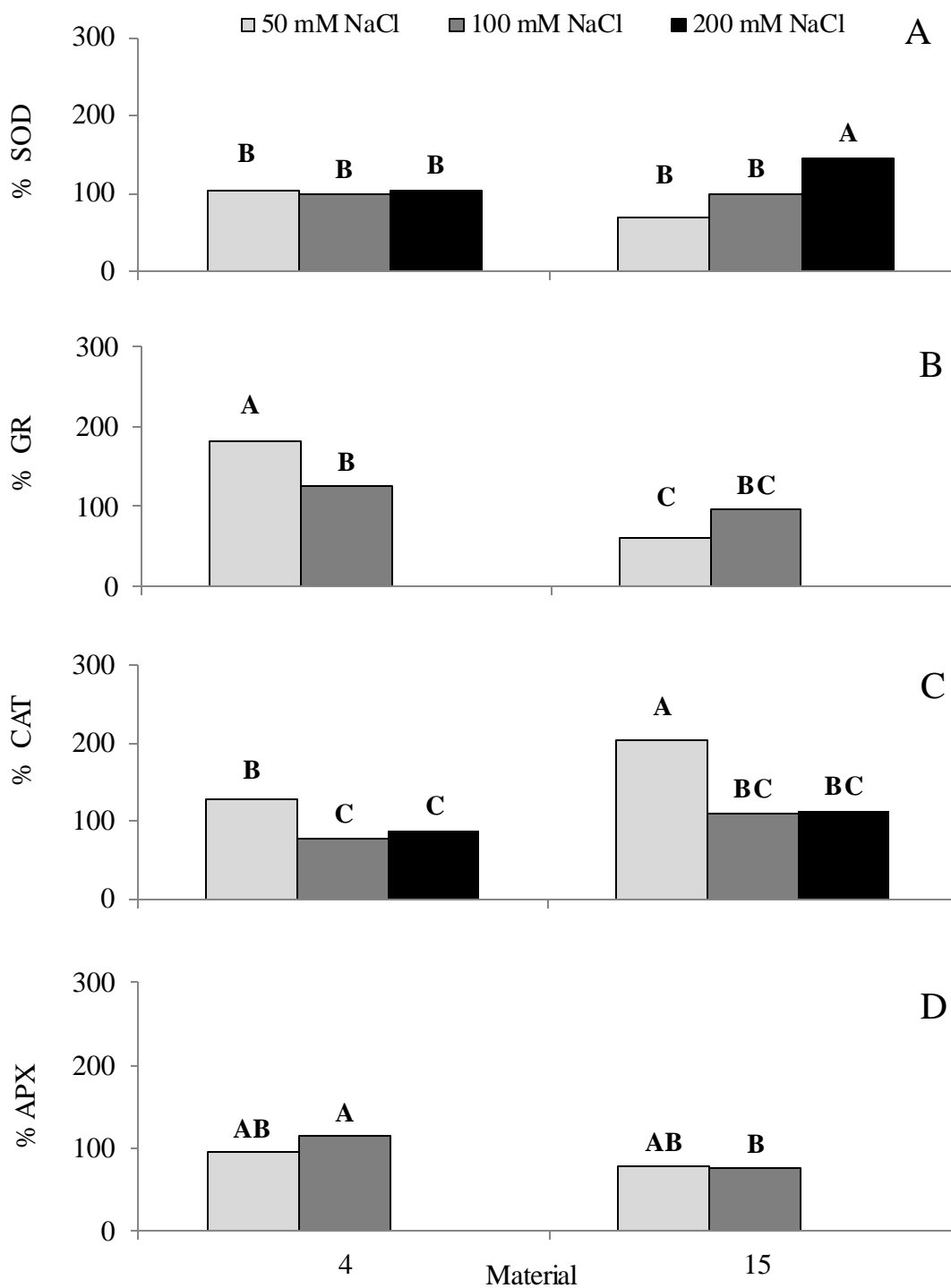


Figura 7. Porcentaje de actividad enzimática SOD (A), GR (B) y CAT (C) en condición de salinidad respecto al control no salinizado, en materiales de *P. coloratum* evaluados a las 24 h de cultivo en 50, 100 y 200 mM NaCl. Las barras indican valores medios. Repeticiones por material en tratamientos referidos al control n=5. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los criterios de clasificación (p<0,05) según LSD.

En resumen, se puede concluir que respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes sólo la SOD presentó un incremento de actividad en el material de mayor tolerancia a salinidad a las 24 h de aplicado el nivel superior de estrés (200 mM NaCl), no así el material de mayor susceptibilidad.

Potencial osmótico y la concentración de prolina y sacarosa en macollos de materiales de *P. coloratum*

En esta instancia se identificaron diferencias en el potencial osmótico y la concentración de azúcares solubles totales y de prolina, bajo condiciones de salinidad (Anexo cap 2 Tabla 9).

El potencial osmótico disminuyó significativamente en los materiales colectados en presencia de salinidad (Figura 8). Por otro lado, la aclimatación al frío no indujo cambios en este parámetro.

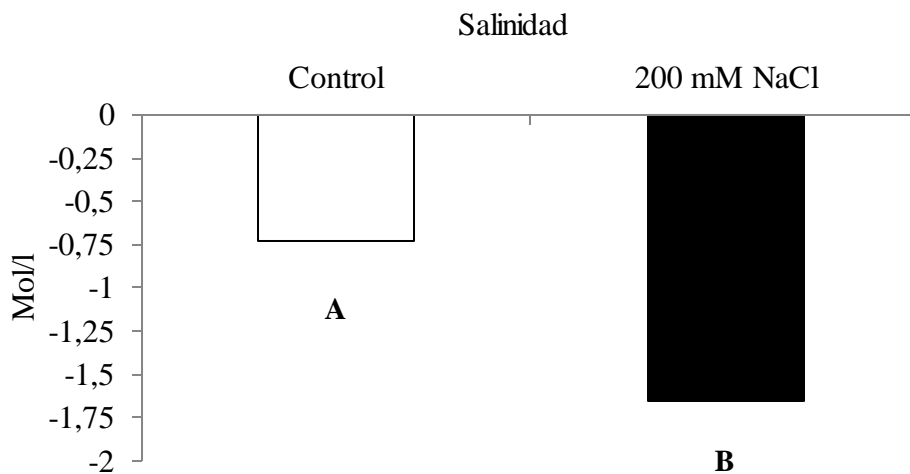
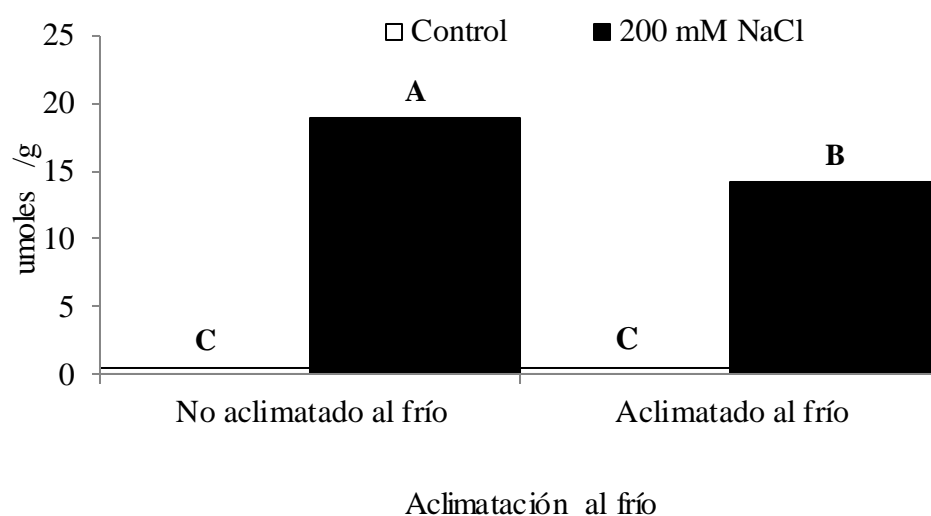


Figura 8. Potencial osmótico de macollos de *P. coloratum* en ausencia de salinidad y en presencia de 200 mM NaCl, en plantas aclimatadas y no aclimatadas al frío. Repetición por tratamiento n=5. Las barras indican valores medios, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según LSD.

La concentración de azúcares solubles totales en salinidad fue 46% superior a la registrada en ausencia de ésta (Anexo cap 2 Tabla 9).

Por otro lado, la interacción de “salinidad y aclimatación al frío” mostró diferencias significativas en la concentración de prolina. La concentración de prolina se incrementó en presencia de salinidad. Sin embargo, materiales crecidos en salinidad y aclimatados al frío acumularon un 25% menos de prolina respecto de los no aclimatados al frío (Figura 9).



Figuras 9. Concentración de prolina en macollos de materiales de *P. coloratum* referida a peso fresco, en ausencia (0) y presencia de 200 mM NaCl, en plantas aclimatadas o no aclimatadas al frío. Repetición por tratamiento n= 3. Las barras indican valores medios, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según DGC.

Prolina, glicina-betaína y concentración de iones K^+ y Na^+ en láminas de materiales de *P. coloratum*

Prolina y glicina-betaína

En esta instancia se identificaron diferencias entre los tratamientos evaluados en la concentración de prolina y glicina-betaína en láminas de materiales de *P. coloratum* (Anexo cap 2 Tabla 10). La concentración de prolina en láminas jóvenes aumentó en presencia de 200 mM NaCl (Figura 10), tal como se observó anteriormente en macollos jóvenes. La combinación de salinidad y alcalinidad también incrementó la concentración de este osmolito respecto a los tratamientos control y al pH 9. Sin embargo, este incremento observado fue menor al que ocurre en salinidad (Figura 10).

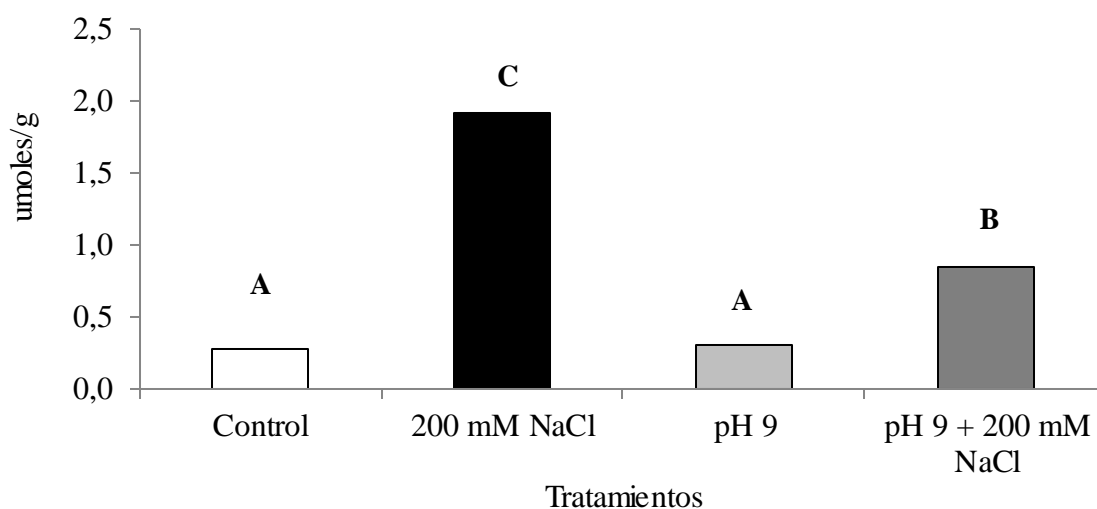


Figura 10. Concentración de prolina en láminas de hojas de materiales de *P. coloratum*, en control, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9), alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por tratamientos, control n=16, 200 mM NaCl n= 16, pH 9 n= 17 y pH 9 + 200 mM NaCl n=15. Las barras indican valores medios, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Respecto a la glicina-betaína tanto en control como en estrés por alcalinidad los niveles del metabolito fueron similares. Por otro lado, en los tratamientos de 200 mM NaCl y pH 9 + 200 mM NaCl este osmolito presentó concentraciones superiores y similares (Figura 11).

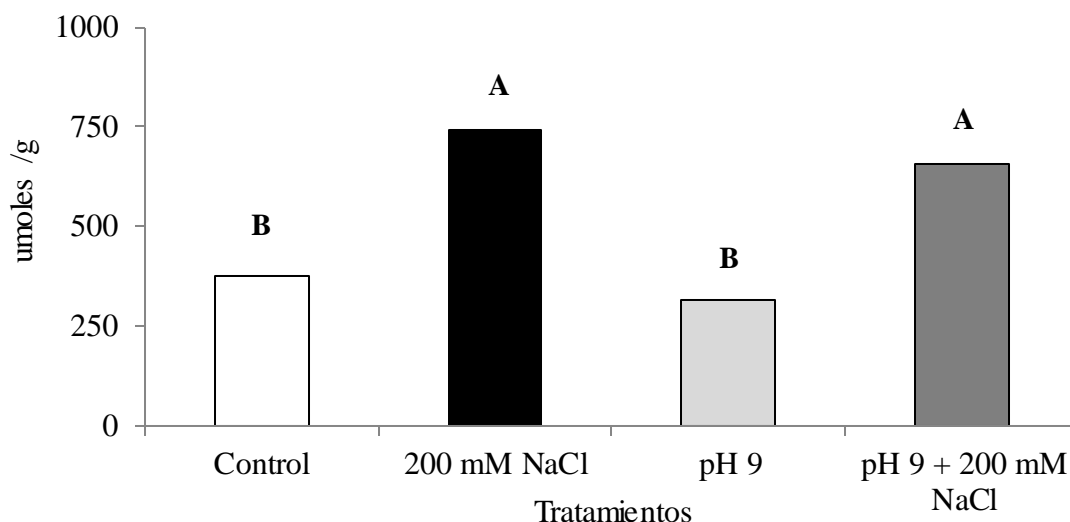


Figura 11. Concentración de glicina-betaína en láminas de materiales de *P. coloratum*, en control, 200 mM NaCl, alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl). Repeticiones por tratamientos, control n=16, 200 mM NaCl n= 16, pH 9 n= 17 y pH 9 + 200 mM NaCl n=15. Las barras indican valores medios, letras distintas indican diferencias significativas según LSD.

Por otro lado, los materiales de tolerancia contrastante a salinidad 4 y 15, presentaron concentraciones similares de prolina y glicina-betaína en los tratamientos evaluados. Tal como puede observarse en la tabla 4.

Tabla 4. Media y EE de concentraciones de prolina y glicina-betaína en laminas jóvenes de materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M) de tolerancia a salinidad contrastante, en los tratamientos de ausencia de estrés, 200 mM NaCl, pH 9 y pH 9 + 200 mM NaCl.

umoles / g PF Prolina				
Material	Tratamiento	Medias	E.E.	letras según Fisher
4	Control	0,27	0,42	E
15		0,17	0,34	E
4	200 mM NaCl	2,5	0,42	A
15		1,95	0,42	A B C
4	pH 9	0,2	0,34	E
15		0,14	0,34	E
4	pH 9 + 200 mM NaCl	0,83	0,26	D E
15		0,89	0,34	C D E
umoles / g PF Glicina-betaína				
Material	Tratamiento	Medias	E.E.	letras según Fisher
4	Control	459,42	77,03	D E F G
15		367,1	84,38	D E F G
4	200 mM NaCl	863,69	133,41	A B C
15		920,77	108,93	A
4	pH 9	313,43	77,03	E F G
15		321,31	84,38	E F G
4	pH 9 + 200 mM NaCl	593,19	108,93	B C D E
15		606,96	108,93	B C D E

Concentración de iones K⁺ y Na⁺ en vaina y lámina

Esta determinación se hizo en 8 materiales *P. coloratum* con tolerancia diferencial a la salinidad.

La comparación de la concentración de los cationes K⁺ y Na⁺ por sección no mostró diferencias significativas (Anexo cap 2 Tabla 11). Sin embargo, la comparación del

cociente vaina/lámina para los cationes Na^+ y K^+ , indicó diferencias significativas para el catión K^+ entre materiales y tratamientos de 200 mM NaCl, pH 9, control y pH9 + 200 mM NaCl (Anexo cap 2 Tabla 12).

A fin de explicar los resultados con mayor claridad se exponen los efectos de los tratamientos de 200 mM NaCl, pH 9, control y pH9 + 200 mM NaCl en los materiales 4 y 15.

Como puede distinguirse en la Figura 12, para el ion K^+ estos materiales presentaron similar relación vaina/lámina en presencia de alcalinidad y a pH neutro. Por otro lado, la presencia de 200 mM NaCl diferenció la relación vaina/lámina entre estos materiales. El material de mayor tolerancia a salinidad (15) presentó similar relación vaina/lámina en todas las condiciones de estrés evaluadas, así como también en condiciones control. Por otro lado, el material susceptible (4) mostró similar relación de K^+ en vaina/lámina en la condición de pH 9 y control, mientras que el agregado de 200 mM NaCl redujo significativamente esta relación.

Respecto al ion Na^+ no se identificaron diferencias entre los diferentes criterios de clasificación, en vaina/lámina, así como tampoco en su interacción (Anexo cap 2 Tabla 12). Sin embargo, la presencia de 200 mM NaCl aumenta el contenido de Na^+ en vaina/lámina en el material tolerante respecto al susceptible (datos no mostrados).

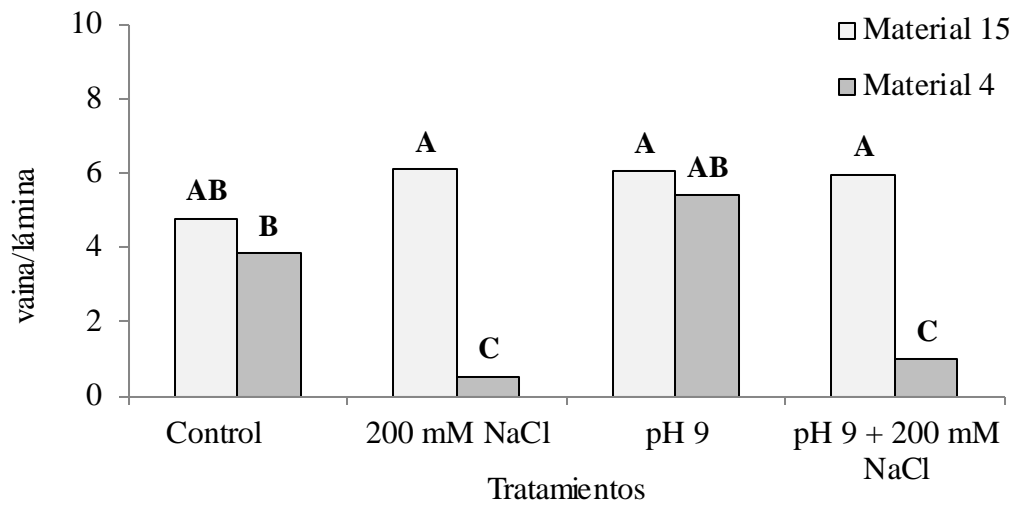


Figura 12. Relación vaina/lámina para K^+ en la última hoja totalmente expandida de los materiales 4 y 15 de *P. coloratum*, cultivados en condiciones de: control, 200 mM NaCl, pH 9, pH 9 + 200 mM NaCl. Repeticiones por material y tratamiento $n=3$. Las barras indican valores medios, letras distintas indican diferencias significativas según LSD.

Discusión

Crecimiento de *Panicum coloratum* en salinidad

Ashraf y Harris (2004) plantean que la medición del crecimiento y supervivencia de plantas es una medida integral para evaluar la tolerancia a la salinidad, que comprende diferentes mecanismos fisiológicos. Según diversos autores, en las plantas la tolerancia a la salinidad involucra mecanismos de alta y baja complejidad (Parida y Das, 2005).

En los materiales de *P. coloratum* la salinidad afectó negativamente todas las variables de crecimiento vegetativo evaluadas tanto de los materiales colectados de *P. coloratum* como los no colectados (Anexo cap 2 Tabla 2). Respuestas similares se registraron en otras especies, entre ellas trigo, donde la salinidad redujo el crecimiento vegetativo, la superficie foliar, el número de hojas e indujo una aceleración en la senescencia de éstas (Munns, 2002). En maíz se observó reducción del crecimiento, escaso desarrollo de distintas partes aéreas e inhibición de la aparición de hojas nuevas (Cramer, 2002). En un estudio hecho con 18 líneas de *Panicum miliaceum* se encontró que incrementos de NaCl afectaron negativamente diferentes variables de crecimiento en todas las líneas estudiadas (Sabir y Ashraf, 2007). Asimismo, en *Chloris gayana* la salinidad redujo el rendimiento sobre la base de la reducción del área foliar (De Luca *et al.*, 2001).

La selección intraespecífica en tolerancia a salinidad ha sido usada para el desarrollo de cultivares con tolerancia diferencial a este estrés (Flowers *et al.*, 1991). Los materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* sobrevivientes a condiciones extremas de sequía y frío presentaron mayor tolerancia a salinidad que plantas no seleccionadas del mismo cultivar 'Klein' (Figura 1 E).

En estudios realizados con *P. coloratum*, se encontró que la salinidad afectó la germinación y supervivencia de los cultivares 'Klein' y 'Bambatsi'. Sin embargo, el cultivar 'Klein' perteneciente a la var. *coloratum* presentó mayor crecimiento vegetativo en presencia de salinidad que el cultivar 'Bambatsi' perteneciente a la var. *makarikariensis* (Taleisnik *et al.*, 1998). Dentro de la población colectada de la var. *coloratum* se identificó

variabilidad en la tolerancia a la salinidad. En estudios previos, la salinidad afectó el número de macollos y la tasa de aparición de hojas y macollos (Pittaro *et al.*, 2015). Así mismo, en este trabajo de Tesis se confirmó el efecto de la salinidad observable también en las variables de PSA y NH (Figura 1 A y B). Según Munns y Tester (2008), el principal efecto de la salinidad en el crecimiento de los cereales se observa en la reducción del número de hojas y de macollos. Sin embargo, como se observó en nuestro trabajo de Tesis otras variables también se vieron afectadas por el efecto de la salinidad dentro de la población de *P. coloratum*.

Como citan Lemaire y colaboradores en su revisión (Lemaire *et al.*, 2009), los componentes morfológicos de una pastura entre ellos, tasa de aparición de hojas, así como el crecimiento y duración de las mismas, están determinados genéticamente. Estos autores también proponen que el ambiente afecta estos componentes, tal como ocurrió entre los materiales colectados de *P. coloratum*.

En pasturas megatérmicas, la tasa de macollaje es un fenómeno dependiente principalmente de la luz, pero que además se lo vincula con la intensidad y frecuencia de defoliación, provocando modificaciones en la cantidad y calidad de luz que ingresa en la estructura de la planta (Deregibus *et al.*, 1983; Casal *et al.*, 1985). Sin embargo como pudo observarse en el trabajo de Maas *et al.* (1994) la salinidad también afectó la tasa de aparición de macollos en cultivares de trigo de tolerancia contrastante a salinidad, tal como se corroboró entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*, ya que la presencia de 200 mM NaCl redujo la TAM de la mayoría de los materiales colectados, excepto para el material 14.

Respuestas fisiológicas relacionadas a la tolerancia diferencial a la salinidad

En los últimos años, los mejoradores han alcanzado progresos significativos de tolerancia a la salinidad, a través de la selección de individuos superiores y apareamientos dirigidos (Noble *et al.*, 1984; Allen *et al.*, 1985; Al-Khatib *et al.*, 1993; Ashraf y Wu, 1994; Shannon y Grieve 1998; Ashraf, 2002). Esta selección se ha basado en caracteres de

tipo agronómicos, como crecimiento y rendimiento (Noble y Rogers 1992; Ashraf y Wu, 1994), que incluyen la integración de numerosos mecanismos fisiológicos (Munns, 1993). Cuando nos referimos al mejoramiento para tolerancia a estreses abióticos, Yeo (1994) plantea que la selección de individuos mediante el uso de criterios fisiológicos, parece suministrar información más directa y fiable que los caracteres agronómicos. Por ello en esta tesis se planteó la identificación de caracteres fisiológicos, relacionados a la tolerancia diferencial a la salinidad.

Respecto a lo citado, existen numerosos reportes que muestran diferentes alteraciones fisiológicas relacionadas a la tolerancia a la salinidad (Munns, 1993; 2002). Sin embargo, para el caso de *P. coloratum* se desconocía los mecanismos metabólicos y de adaptación que se activan en condiciones de salinidad.

Por otro lado, no existen indicadores fisiológicos universales que definen la tolerancia a salinidad entre especies, que puedan ser utilizados de un modo general en el mejoramiento genético (Ashraf, 2004). En este sentido, Ashraf y Harris, (2004), indican que los mecanismos de tolerancia a la salinidad son complejos y las variaciones se producen no sólo entre especies sino también entre cultivares dentro de una misma especie.

A continuación, se describen los mecanismos de tolerancia a estrés por salinidad estudiados en materiales colectados de *P. coloratum*.

Ajuste osmótico

Munns y Tester (2008) plantean que la exposición de las plantas al estrés por salinidad tiene dos efectos, primero una reducción del crecimiento debido al estrés osmótico seguido de una reducción adicional por efectos iónicos. Ellos proponen que el ajuste osmótico permite recuperar el volumen original de las células en cuestión de horas; y en respuesta a la tolerancia de salinidad, permite a las plantas a evitar la toxicidad iónica y mantener la absorción de agua. Hay dos tipos de osmolitos con papel clave en el ajuste osmótico, los solutos orgánicos e iones inorgánicos (Chen y Jiang, 2010).

Cuando las plantas crecen en condiciones de salinidad, el potencial hídrico radical se afecta negativamente. Soriano (1980) cita diversos autores que postulan diferentes interpretaciones de las causas del estrés hídrico, entre ellos, Hsiao (1973), que propone al potencial de turgencia, como fuerza impulsora de cambios y ajustes provocados en las situaciones de estrés hídrico. Sin embargo, Itai y Benzioni (1976) discrepan con el autor citado alegando que las alteraciones hormonales pueden ser señaladas como efecto primario. No obstante, cualquiera sea el desencadenante, la respuesta de tolerancia al estrés hídrico pone en marcha el ajuste osmótico, mediante la síntesis de sustancias solubles con pesos moleculares relativamente bajos (azúcares, aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio, poliaminas, polioles, etc) o por acumulación de ciertos iones, que favorece el influjo de agua y el aumento de la turgencia (Greenway y Munns 1980; Wyn, 1981; Hernandez y Almansa 2002; Taiz y Zeiger 2002; Chaparzadeh *et al.*, 2003; Ashraf, 2004).

Para el caso de los materiales colectados de *P. coloratum* en condiciones de salinidad, todos presentaron similar potencial osmótico, sin embargo se identificaron diferencias entre ellos en diversas variables de crecimiento vegetativo, por lo que se supone que el ajuste osmótico no sería la causal de las diferencias en los parámetros de crecimiento observadas en los materiales colectados de *P. coloratum* en salinidad.

Numerosos autores indicaron una correlación positiva entre la tolerancia a salinidad y un incremento en la acumulación de osmolitos compatibles. En la actualidad, hay numerosos trabajos que sostienen que la presencia del osmolito prolina se relaciona positivamente con la tolerancia a salinidad (Ashraf y Foolad, 2007). Existe suficiente evidencia que indica que mayor acumulación de prolina en *Triglochin*, *Puccinellia* y cebada, indica mayor tolerancia a salinidad (Ashraf, 1994). Así mismo, en otras especies también se correlacionó positivamente la concentración de este osmolito y la tolerancia a la salinidad, como fue el caso de dos ecotipos tolerantes de *Agrostis stolonifera* (Ashraf y Foolad, 2007). Ashraf (1994) sugiere que la prolina cumple un rol esencial en la tolerancia a estrés salino, por lo que la propuso como criterio de selección plausible para la tolerancia al mismo. Sin embargo, hay experiencias que indican lo contrario, tal como ocurrió en arroz y sorgo en el trabajo de De Lacerda *et al.* (2003).

Por otro lado, en un número reducido de especies, la glicina-betaína es un compuesto de amonio cuaternario que actúa como osmolito compatible en respuesta adaptativa a la

salinidad. Tal como sucedió en hoja de los géneros *Suaeda* y *Salicornia*, en presencia de salinidad. Asimismo, fue característico en tribus *Hordeae* y *Chlorideae* dentro de la familia *Poaceae* en presencia de salinidad (Asrhaf, 1994). Sin embargo, en las *Poaceae* *Agropyron junceum* y *Elymus sabulosus*, con elevada tolerancia a salinidad, el contenido de glicina-betaína no resulta afectado (Asrhaf, 1994), similar a lo que ocurrió en especies de *Triticum*, *Agropyron* y *Elymus* (Wyn, 1980). Por lo escrito previamente numerosos autores afirman que la acumulación de glicina-betaína en respuesta adaptativa de tolerancia a la salinidad no es universal, además existe una considerable variación en la acumulación de este osmolito entre especies (Wyn, 1980; Asrhaf, 1994). Por otra parte, Ashraf y Foolad (2007), sugieren que la relación entre la acumulación de glicina-betaína y tolerancia al estrés es específica entre genotipos.

Asrhaf (1994) propone que la sacarosa puede actuar como osmolito compatible en condiciones de salinidad, asimismo, Cram (1976), sugiere que este osmolito en glicófitas puede contribuir en un 50 % al ajuste osmótico.

Respecto a *P. coloratum*, este presentó diferencias significativas en la acumulación de prolina, glicina-betaína y azúcares solubles totales en presencia de salinidad respecto al control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre materiales en la acumulación de estos osmolitos en los tratamientos control y de salinidad. Esto nos llevó a concluir que las diferencias en acumulación de materia seca entre materiales en condiciones de salinidad no dependen de la acumulación diferencial de estos osmolitos.

Sin embargo, resultaría interesante evaluar otros osmolitos en materiales de *P. coloratum* de tolerancia contrastante a la salinidad entre ellos, otros hidratos de carbono (diversos azúcares), así como ácidos orgánicos, y aminoácidos no proteicos.

Acumulación de iones

La fase iónica en el estrés por salinidad se inicia cuando los iones se acumulan en concentraciones tóxicas, en hojas que ya han dejado de crecer (Munns y Tester, 2008). La selectividad de K^+ , el intercambio $K^+ - Na^+$ y la reabsorción de Na^+ en tejidos, han sido

extensamente estudiados en numerosas especies para evaluar la tolerancia a salinidad (Asrhaf, 1994). Dentro de las especies se ha documentado variabilidad genética en la tasa de acumulación de iones Na^+ y Cl^- en hojas, así como en el grado de tolerancia a estos iones en distintos tejidos (Munns y Tester, 2008). En trigo por ejemplo, menor concentración de ion Na^+ a nivel de hoja se correlacionó con mayor tolerancia a la salinidad (Munns y Tester, 2008). Asimismo, Asrhaf (1994), identificó una correlación positiva entre tolerancia a salinidad y exclusión de Na^+ en otras poblaciones de gramíneas.

En materiales de *P. coloratum* de tolerancia contrastante a la salinidad, la concentración de Na^+ en vaina y lámina de la última hoja totalmente expandida, no se modificó en ninguna de las condiciones de estrés evaluadas (Anexo cap 2 Tabla 11). Asimismo, tampoco se vio alterada la concentración de Na^+ en la primera hoja crecida en condiciones de salinidad en la población de estudio (Pittaro *et al.*, 2015). Esto sugiere que los materiales de *P. coloratum* no retienen iones Na^+ en vaina como mecanismo de tolerancia a salinidad, mecanismo que se ha observado en trigo (Davenport *et al.*, 2005). Respecto a este cultivo, Davenport *et al.* (2005), encuentran que la tolerancia diferencial a salinidad en cultivares de trigo se relacionó con la proporción de Na^+ retenida a nivel de vaina.

Rajendran *et al.* (2009), consideran que una alta tolerancia a la salinidad durante la fase iónica, está representada por la exclusión de Na^+ o por la tolerancia de los tejidos a este ion. Respecto a lo que se observó entre materiales de *P. coloratum* no hubo una correlación positiva entre la acumulación de Na^+ entre las secciones vaina y lámina y la susceptibilidad a la salinidad.

El mantenimiento de la homeostasis iónica es crucial para el normal crecimiento de las plantas durante el estrés por salinidad. La gran mayoría de los investigadores evalúan cómo la salinidad altera la concentración de Na^+ a nivel celular, así como si se inhibe la absorción de los iones K^+ . Este último catión es esencial para el crecimiento y el desarrollo, y la inhibición de su absorción puede conducir a una menor productividad e incluso a la muerte (Gupta y Huang, 2014). Sin embargo, Shabala *et al.* (2007), plantean en su revisión que la homeostasis iónica para el catión K^+ es usualmente considerada de importancia secundaria, en la evaluación de la tolerancia a salinidad, ya que los principales esfuerzos por parte de los mejoradores genéticos de cultivos en tolerancia a salinidad, se han dirigido a minimizar de la captación de Na^+ y disminuir su acumulación en tallo.

Respecto a los materiales de *P. coloratum*, la concentración de K^+ tampoco se modificó significativamente entre ellos en las condiciones evaluadas y por sección (Anexo cap 2 Tabla 11). Similar a lo observado en estudios previos hechos en la primera hoja crecida en condiciones de salinidad (Pittaro *et al.*, 2015).

Conforme a Gupta y Huang (2014), el nivel de K^+ dentro del citosol debe ser de aproximadamente 100 mM para la normal actividad de enzimas citoplasmáticas, en vacuolas la concentración de este catión oscila entre 10 y 200 mM. Por otro lado, estos autores afirman que el K^+ juega un papel importante en el mantenimiento de la turgencia dentro de la célula. En plantas este catión se transporta en contra de un gradiente de concentración a través de transportadores de K^+ y canales de membrana (Gupta y Huang, 2014). Hay experiencia en algunas especies que durante el estrés por salinidad se ha incrementado la expresión de transcriptos implicados en la captación de K^+ , tal como se observó en la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* (Gupta y Huang, 2014).

En genotipos de tolerancia contrastante a salinidad en *Oryza sativa* la reducción en la concentración de K^+ en el genotipo susceptible a la salinidad probablemente sea la causa de la reducción del crecimiento (Nemati *et al.*, 2011). Por otro lado, Flowers *et al.* (1977) demostraron que las diferencias en tolerancia en condiciones de salinidad especies de *Agropiron* se debe a una mayor absorción de K^+ en medios salinos. En los materiales de *P. coloratum* en presencia de salinidad no se modificó la concentración del catión K^+ en las distintas secciones (Anexo cap 2 Tabla 12). Sin embargo, fue distinta la relación vaina/lámina para la concentración de este ion entre materiales de tolerancia contrastante (Figura 12), por lo que resultaría interesante identificar las causas que subyacen a esta observación.

Asrhaf (1994), plantea que en plantas glicófitas la relación K^+/Na^+ tiene que ser superior a 1 para el normal funcionamiento de los procesos metabólicos. Asimismo, numerosos autores sostienen que bajas concentraciones de Na^+ y alta de K^+ a nivel citoplasmático son esenciales para mantener los procesos enzimáticos (Blumwald, 2000; Zhu, 2003; Yang *et al.*, 2008; James *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). Además, estos autores proponen que en un cociente K^+/Na^+ elevado puede ser un criterio de selección para tolerancia a salinidad, que puede ser usado para numerosas especies.

Estudios previos en ecotipos de *Festuca rubra* y *Agrostis stolonifera* tolerantes a la salinidad mostraron menor acumulación de Na^+ y Cl^- y alta relación K^+/Na^+ en los brotes aéreos, cuando se compararon con otras poblaciones susceptibles (Asrhaf, 1994). Respecto a la población de estudio de *P. coloratum*, la tolerancia a la salinidad no se relacionó con cambios en el cociente K^+/Na^+ (datos no mostrados), así como tampoco con la acumulación de Na^+ .

Por otro lado, el estrés por alcalinidad + salinidad ejercen efectos osmótico e iónico junto a la influencia adicional del pH elevado, que provocan: la precipitación de iones Ca^{+2} , Mg^{+2} (Shi y Zhao, 1997), la inhibición de la absorción de ciertos aniones Cl^- , NO_3^- y H_2PO_4^- (Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011) y perturbación de la homeostasis iónica celular (Yang *et al.*, 2008). La presencia de sales de tipo alcalinas en el suelo tales como NaHCO_3 y Na_2CO_3 , son más perjudiciales para las plantas que las sales de tipo neutras (NaCl y Na_2SO_4) (Shi y Yin, 1993).

El agregado de buffer alcalino en los materiales *P. coloratum*, no alteró la concentración de K^+ y Na^+ en lámina ni vaina, así como tampoco en la relación vaina/lámina respecto a la condición de ausencia de estrés. Por otro lado, el agregado de buffer alcalino + 200 mM NaCl modificó esta relación en el material susceptible, disminuyendo la concentración de K^+ en vaina/lámina. Es decir que el agregado de salinidad a la solución buffer alcalina, afectó este cociente iónico en el material susceptible. En *Suaeda glauca* (halófito, tolerante a salinidad) la presencia de salinidad y alcalinidad no modifica el balance iónico en los brotes aéreos (Yang *et al.*, 2008 b), así como ocurrió en el material colectado de *P. coloratum* tolerante a 200 mM NaCl .

Enzimas antioxidantes y tolerancia a salinidad

Las especies reactivas de oxígeno (EROS), se encuentran implicadas en numerosos procesos fisiológicos tales como, crecimiento, desarrollo y señalización (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004, Foyer y Noctor, 2005; Miller *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2014). Asimismo, Foyer y Noctor, (2005), determinan que en muchos casos las EROS se programan genéticamente y se utilizan como mensajeros secundarios. Por otro lado

Vranová *et al.* (2002) propone que las EROS funcionan como mensajeros del estrés de tipo ubicuos y que juegan un rol probablemente de señalización en procesos adaptativos.

Numerosos estudios sugieren que el aumento de la actividad SOD permite a la planta tolerar el potencial daño oxidativo causado por la exposición de la salinidad (Ahmad *et al.*, 2012). Además, informan que estudios transgénicos de sobreexpresión mitocondrial de Mn-SOD en *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2004) y cloroplástica de Cu / Zn-SOD en *Nicotiana tabacum* (Badawi *et al.*, 2004) proporcionó mayor tolerancia al estrés por salinidad (Ahmad *et al.*, 2012).

Respecto a los resultados de este trabajo se observó una actividad 50 veces superior de la enzima SOD a las 24 h de la presencia de 200 mM NaCl respecto al control en el material de mayor tolerancia a salinidad, mientras que el material susceptible presentó la misma actividad que su control.

Respuestas similares se observaron en otras especies como arroz, maíz, así como en *Nicotiana tabacum* (Bowler *et al.*, 1994), *Pisum sativum* (Foster y Edwards, 1980) y *Spinacia oleracea* con mayor actividad de la Mn-SOD (Hernandez *et al.*, 1993; 1995; Alscher *et al.*, 2002). Así mismo en *Morus alba*, *Triticum aestivum*, *Lycopersicon sp.*, *Pisum sativum*, *Vicia faba* y *Brassica juncea* (Ahmad *et al.*, 2012 a).

Dentro del sistema antioxidante, la SOD es la primera línea de defensa contra las EROS (Alscher *et al.*, 2002). Esta enzima usa diferentes metales como cofactores (Bannister *et al.*, 1991; Alscher *et al.*, 2002) y remueve el O_2^- dismutandolo a H_2O_2 (Takahashi y Asada, 1983; Vranová *et al.*, 2002; Alscher *et al.*, 2002). El O_2^- es moderadamente reactivo y no puede penetrar la membrana plasmática (Vranová *et al.*, 2002). Por otra parte, el H_2O_2 también es moderadamente reactivo, aunque de vida relativamente más larga. El peróxido de hidrógeno atraviesa fácilmente las membranas celulares y puede difundir desde su lugar de producción. Además, hay diversas evidencias que indican que el H_2O_2 puede inactivar diferentes enzimas (Bowler *et al.*, 1994; Vranová *et al.*, 2002) y actúa como molécula de señalización en respuestas de defensa (Vranová *et al.*, 2002). Por lo que podría asumirse que el aumento de la actividad SOD en el material de *P. coloratum* tolerante a salinidad, en presencia de salinidad, implicaría un temprano incremento en la concentración de H_2O_2 . Que se traduciría posteriormente en una mayor tolerancia a la salinidad.

Hefny y Abdel-Kader (2009) consideran que las enzimas antioxidantes son buenos marcadores fisiológicos para distinguir genotipos de tolerancia contrastante y las proponen como criterio de selección en mejoramiento genético en ambientes salinos. En este sentido, la actividad de la enzima SOD permitió discriminar materiales con tolerancia diferencial a salinidad en *P. coloratum*.

La exposición de plantas de arvejas a condiciones severas de salinidad produjo aumento de la actividad Fe-SOD y reducción de la actividad Cu-Zn SOD (Hernandez *et al.*, 1993; 1995). Sin embargo en esta especie, exposición menos severa de salinidad aumento de la actividad Cu-Zn SOD (Alscher *et al.*, 2002).

Respecto a nuestros resultados, la presencia de estrés por salinidad menos severo (50 y 100 mM NaCl) no indujo cambios significativos de la actividad SOD en ninguno de los materiales estudiados, a diferencia de lo observado en una situación más severa de estrés (200 mM NaCl). Sin embargo, se desconoce la localización de la enzima SOD responsable de dicha modificación, así como el cofactor.

Similar al observado en los materiales de *Panicum coloratum* con tolerancia diferencial a salinidad. El cultivar de arroz tolerante a salinidad 'Pokkali' en presencia de salinidad presenta un ligero aumento de la actividad SOD sin cambios en la peroxidación lipídica, ni la acumulación de Na⁺, sin embargo, el cv susceptible 'Bankat' muestra un comportamiento inverso (Ashraf y Harris, 2004).

Por último, hay evidencias que moléculas implicadas en la homeostasis iónica, pueden interactuar con moléculas de señalización. Chung *et al.* (2008) proponen que la producción de EROS inducida por salinidad aumenta la actividad de SOS1 (Na⁺/H⁺ de membrana plasmática) en *A. thaliana* y que se considera un determinante de tolerancia a la salinidad para el mantenimiento de la homeostasis iónica. Por otro lado, hay evidencias en *Populus euphratica* que la salinidad aumentó la producción de las EROS y que estas actúan como moléculas intermedias en la inducción de tolerancia a la salinidad, aumentando la actividad de H⁺ -ATPasa de la membrana plasmática y mejorando la homeostasis iónica de K⁺/Na⁺ (Ellouzi *et al.*, 2011). Por ello, resulta interesante evaluar si existe alguna correlación entre la tolerancia a la salinidad en los materiales de *P. coloratum*, el incremento de la enzima

antioxidante SOD, la activación de los transportadores responsables de las diferencias de K^+ entre secciones vaina/lámina, en condiciones de salinidad.

A pesar de toda la información disponible sobre la relación entre la actividad SOD y tolerancia a la salinidad, Bose *et al.* (2014) plantean que en glicófitas existe el mismo número de informes que demuestran lo contrario, es decir, que no existe correlación positiva entre el aumento la actividad SOD y tolerancia a la salinidad.

Un estudio realizado con genotipos de sorgo de tolerancia diferencial a la salinidad, muestra similar actividad SOD en todos ellos, sin embargo el material susceptible tiene una relación de enzimas antioxidantes más alta que la observada en el genotipo tolerante (Costa *et al.*, 2005). Estos autores junto a otros, sugirieron que las diferencias en la tolerancia a salinidad entre estos genotipos se debe a la relación $SOD/(CAT+ APX+ GPX)$, que determina los niveles de O_2^- y H_2O_2 (Badawi *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados de esta Tesis indican que en los materiales de *P. coloratum*, la tolerancia diferencial a la salinidad no estaría relacionada al incremento temprano de la actividad de otras enzimas antioxidantes.

Aunque la investigación de la detoxificación de EROS ha ganado terreno en relación a la tolerancia a la salinidad, en vista de las variaciones en mecanismos y entre especies, es necesario seguir trabajando para la validación de este fenómeno (Ashraf y Harris, 2004).

Fluorescencia de la clorofila

La tolerancia a la salinidad en las plantas, está relacionada con el mantenimiento de la conductancia estomática y la tasa de fotosíntesis neta (Lakshmi *et al.*, 1996; Ashraf, 2004). Asraf (2004) identifica variabilidad en la tasa de fotosíntesis y de crecimiento en condiciones de salinidad de diferentes especies y cultivares de una misma especie, y la plantea como criterio de selección. Sin embargo, para el caso de los materiales de *P. coloratum* la tasa fotosintética no se relaciona positivamente con la tolerancia diferencial a salinidad (datos no mostrados) (Pittaro *et al.*, 2015).

El análisis del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila hace posible la evaluación

del rendimiento fotosintético y la tolerancia al estrés abiótico (Maxwell y Johnson, 2000). El rendimiento de la fluorescencia de la clorofila, provee información de la absorción, uso y disipación de la energía lumínica, así como del transporte de electrones en el FSII (Kalaji *et al.*, 2011); aportando información de la conversión de energía lumínica en química. En ese contexto, se considera que el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila ha mostrado ser una ventana abierta en el corazón del proceso de la fotosíntesis (Jajoo, 2013).

En cebada por ejemplo, los parámetros de fluorescencia de la clorofila son las únicas características fisiológicas que demostraron tener alta correlación con tolerancia a la salinidad (Belkhouja *et al.*, 1994). Para el caso de *P. coloratum*, los parámetros de fluorescencia de la clorofila no presentaron diferencias significativas en la interacción “materiales y tratamientos de salinidad”, tanto en respuestas a diferentes niveles de salinidad, como de forma temprana o tardías (Anexo cap 2 Tabla 8. A).

Ashraf, (2004) plantea que, en condiciones de salinidad, el desequilibrio iónico causado por la reducción de K^+ puede causar la ruptura del fotosistema II (FSII) tal como observan en la especie susceptible a salinidad *Avicennia marina*, en la cual, se muestran cambios en la fotosíntesis, elevada acumulación de Na^+ , Cl^- y baja concentración de K^+ a nivel de hoja; además de reducción en el contenido de clorofila por unidad de superficie y disminución del rendimiento cuántico. Por otra parte, Ball (1988), exhibe tilacoides aislados de hojas con baja concentración de K^+ y centros de reacción del FSII afectados, que induce la disminución del rendimiento cuántico en hojas intactas. En esta Tesis, materiales de *P. coloratum* de tolerancia contrastante a la salinidad presentaron diferente relación de K^+ entre vaina/lámina entre materiales de tolerancia contrastante, sin embargo, el rendimiento en la fluorescencia de la clorofila en la condición de 200 mM NaCl fue similar entre estos ($p > 0,05$).

Por otro lado, en esta Tesis se observaron diferencias en parámetros de la fluorescencia de la clorofila entre tratamientos de salinidad. Entre estos f_v/f_m , siendo superior en control que en presencia de salinidad, así como para la pendiente V_j (Anexo cap 2 Tabla 8). Estos resultados son similares a lo que normalmente se encuentran en la bibliografía, ya que en general, estos parámetros son inferiores en presencia de estrés por salinidad (Brestic y Zivcak, 2013).

Alcalinidad y crecimiento

P. coloratum según diferentes fuentes, entre ellas Otondo (2011), considera a esta especie como tolerante al estrés por alcalinidad. Sin embargo, en Luna *et al.* (2016) se desafía este concepto y muestran que plantas del cultivar comercial (‘Klein’) perteneciente a la var. *coloratum* en condiciones de pH 10 reducen significativamente su crecimiento, respecto a las cultivadas a pH neutro. Sin embargo, en los materiales colectados de *P. coloratum* var. *coloratum*, la alcalinidad no alteró significativamente las variables de PSA, NM, NH y TAM en la interacción “material y tratamientos” (Anexo capítulo 2 Tabla 5). La presencia de alcalinidad afectó la variable de tasa de crecimiento relativa entre materiales colectados de *P. coloratum*, la gran mayoría de estos presentaron similar TCR en alcalinidad que en condiciones control, excepto para el material 3 (Figuras 3 y 4). En base a esto, se asume que los materiales colectados de *P. coloratum* no presentaron tolerancia diferencial a la alcalinidad. Resultados similares fueron comunicados para la halófito *Chloris virgata* en los que la alcalinidad no afecta más que la salinidad del crecimiento de las plantas (Wang *et al.*, 2011).

Asimismo, Luna *et al.* (2016), comprobaron que plantas del cultivar ‘Klein’ crecidas en condiciones de suelo a pH 10 tuvo un efecto más negativo sobre el crecimiento, que la salinidad. Este hecho resultó diferente a lo observado en los materiales colectados de *P. coloratum*, ya que en estos la salinidad afectó más la tasa de crecimiento que la alcalinidad por sí sola.

La combinación de salinidad y alcalinidad sobre plantas del cv ‘Klein’ cultivadas en hidroponía fue más negativo que ambos estreses por separado (Luna *et al.*, 2016). Resultados similares se observan en numerosas especies cultivadas en condiciones de hidroponía (Yang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Luna *et al.*, 2016). Por su parte, la co-ocurrencia de ambos estreses en materiales colectados de *P. coloratum* no incrementó la reducción de la tasa de crecimiento siendo esta reducción similar a la que ocurre en salinidad, excepto para el material 3. Esto se propone que se debe a las condiciones a las que fueron sometidos los materiales colectados de *P. coloratum* previas a la colecta.

En otro aspecto, la alcalinidad no alteró la concentración de prolina y glicina-betaína entre materiales de *P. coloratum*. Similar a lo que ocurre en una colección de *Suaeda*

glauca en condiciones de alcalinidad y salinidad no severa (Yang *et al.*, 2008 b). Sin embargo, en presencia de estrés más severo la colección de *Suaeda glauca* sintetiza superior concentración de prolina y glicina-betaína (Yang *et al.*, 2008 b). Similar a lo ocurrido entre materiales de *P. coloratum* cuando crecieron en condiciones de alcalinidad + salinidad. Por lo que, la acumulación de prolina y glicina-betaína es una respuesta significativa a la presencia de salinidad entre materiales de *P. coloratum*.

Aunque desconocemos las respuestas fisiológicas de la tolerancia a la alcalinidad en materiales de *P. coloratum*, Luna *et al.* (2016) en plantas del cv. 'Klein' observan aumentos en la producción de anión superóxido (O_2^-) en puntas de raíces crecidas en condiciones de pH 10. De acuerdo a otros autores éste anión juega un papel clave en la señalización en condiciones de estrés (Suzuki *et al.*, 2011). Por otro lado, Luna *et al.* (2016) asociaron la tolerancia a alcalinidad a diferencias en el índice de rendimiento fotosintético y la eficiencia máxima de FSII, aspecto que debiera ser evaluado en estos materiales colectados.

Aclimatación al frío y tolerancia a helada

Liu y Osborne (2008) proponen que solo algunas especies C4 tienen la capacidad de adaptarse al frío con posterior adquisición de tolerancia a helada. La acumulación de hidratos de carbono solubles y prolina durante la aclimatación al frío es estudiado en detalle en numerosas especies, así como la correlación con la tolerancia a bajas temperaturas (Fry *et al.*, 1991; Wanner y Junttila, 1999; Cai *et al.*, 2004). La exposición de los materiales de *P. coloratum* a temperatura subóptima (aclimatación al frío), no produjo cambios en el potencial osmótico, en la acumulación de azúcares solubles y prolina. Sin embargo, se identificaron diferencias en el % de daño de membrana entre materiales en respuesta a la helada. Estos resultados difirieron de los identificados entre otras especies C4, entre ellas *Paspalum dilatatum* y *Eragrostis curvula*, donde la aclimatación al frío indujo cambios fisiológicos (Percival, 1977; Robinson y Whalley, 1991). Así también, como los resultados reportados por Cai *et al.* (2004) para *Eremochloa ophiuroides*, donde la aclimatación al frío incrementa los niveles de prolina y azúcares solubles; y se correlacionó positivamente con la tolerancia a helada en estolones y otros órganos.

En suspensiones de células vegetales de diversas especies, la aclimatación al frío además de inducir cambios a nivel de osmolitos y en la fluidez y rigidez de membranas celulares (Örvar *et al.*, 2000; Sangwan *et al.*, 2001; Smallwood y Bowles, 2002). Örvar *et al.* (2000) y Sangwan *et al.* (2001) proponen que células vegetales perciben los cambios inducidos por el frío que desencadenan cambios fisiológicos y morfológicos para defenderse del estrés. Además, suponen que el frío induce la rigidización de la membrana y una reorganización del citoesqueleto, por cambios en los canales de Ca^{+2} . Estos autores cuantifican mayor concentración de Ca^{+2} a nivel citosólico y suponen que provocan la expresión de diversos genes de aclimatación a las bajas temperaturas. Asimismo, otros autores proponen que la aclimatación al frío induce cambios en la membrana plasmática que dan lugar a alteraciones en las proporciones de lípidos (Smallwood y Bowles, 2002). Lo mismo se observó en arroz y trigo luego de la aclimatación al frío (Steponkus, 1984; Singh y Johnson-Flanagan, 1987). Nuestros resultados sugieren que estos aspectos ameritan ser evaluados en la respuesta a la aclimatación al frío en los materiales de *P. coloratum*.

CAPÍTULO 3

Valoración de parámetros morfológicos y de crecimiento, relacionados al mejoramiento genético en materiales promisorios de *Panicum coloratum*

Desde el comienzo de la domesticación de las plantas, el germoplasma vegetal se ha manipulado a través del mejoramiento genético, como una forma de evolución dirigida por el hombre para su propio beneficio. En este proceso y focalizándose en especies forrajeras, la selección artificial ha sido utilizada para aumentar las características productivas, como rendimiento y calidad, así como mejoramiento durante el establecimiento y persistencia de pasturas y resistencia a enfermedades (Vogel y Burson, 2004). Recientemente se ha incorporado el mejoramiento de tolerancia a estreses abióticos en estas especies.

Dentro de un programa de mejoramiento genético, el paso inicial es el desarrollo de información básica de la especie en cuestión, sobre aspectos tales como, comportamiento reproductivo, número cromosómico, mecanismos de esterilidad, etc (Vogel y Burson, 2004). Asimismo, resulta fundamental estudiar la existencia de variabilidad fenotípica contenida en el germoplasma de partida, así como estimar qué proporción de esta variación tiene origen genético. Tal como propone Dudley y Moll (1969), la elección de una población de partida en particular depende del comportamiento medio de la misma y de su variabilidad genética. Esto hace posible la selección intraespecífica (Loveless y Hamrick, 1984).

Como se indicó anteriormente, *P. coloratum*, es una gramínea perenne nativa de África, que ha sido extensamente usada en EEUU, Australia y América del sur (Armando *et al.*, 2013). En Argentina fueron introducidas dos variedades de *P. coloratum*: *coloratum* y *makarikariense*. Ambas con reproducción de tipo alógama de forma casi estricta, las flores perfectas, dispuestas en inflorescencias de tipo laxa, con una maduración de tipo basipeta. La duración de la floración es prolongada y la maduración de las semillas se produce de forma despareja (Armando *et al.*, 2013).

En Argentina, *P. coloratum* se ha introducido como forrajera en varias oportunidades (Petruzzi *et al.*, 2003). Sin embargo, su adopción en zonas con restricciones edáficas sigue siendo escasa, ya que sólo representa el 2,5% de las pasturas perennes implantadas en las principales provincias productivas de Argentina (INDEC, 2008). Se ha sugerido (Armando *et al.*, 2013) que la baja adopción de la especie por parte de los ganaderos podría deberse, entre otras cosas, a la baja disponibilidad de semillas en el mercado y a dificultades durante el establecimiento de pasturas (Young, 1986). Respecto a la etapa de establecimiento en pasturas, ésta se considera como la de mayor sensibilidad a las adversidades del medio ambiente, siendo crítica en ambientes con restricciones edafoclimáticas (Di Nucci de Bedendo *et al.*, 2011). En general el éxito en el establecimiento de las pasturas hace referencia a la cantidad de plantas logradas respecto de las semillas sembradas y se encuentra condicionada por aspectos de manejo, como densidad de siembra, laboreo de la tierra, fertilización, presencia de malezas, etc, a lo que se suman restricciones al crecimiento propias del suelo como puede ser la salinidad (Di Nucci de Bedendo *et al.*, 2011). Por lo tanto, el estudio de variabilidad en tolerancia a estreses abióticos, entre ellos a salinidad durante el establecimiento en *P. coloratum*, parecen ser una característica adecuada para ser tenida en cuenta en un programa de mejoramiento genético.

Por otro lado, en gramíneas, la arquitectura de la canopia de la pastura influye en la palatabilidad (Briske, 1991), así como en la accesibilidad por parte del ganado, afectando de este modo la capacidad para crecer luego de la defoliación. La disposición espacial de macollos dentro de una pastura determina la variación de la arquitectura de su crecimiento, diferenciando forma de mata compacta o laxa (Briske, 1986; 1991). Respecto a *P. coloratum* existe evidencia que indica que presenta variaciones estructurales entre plantas en el cultivo de la pastura a nivel de campo (Petruzzi *et al.*, 2003). Asimismo, los materiales colectados de *P. coloratum* presentaron variaciones en relación a la estructura de las matas y densidad de matas en condiciones de campo (Pittaro *et al.*, 2014 a). Aunque escasa información se encontró relacionada a esta temática, Kubota (1994) y colaboradores sostienen que la comprensión del comportamiento de diferentes formas de mata en *Pennisetum purpureum*, aporta información fundamental para lograr un mejor ideotipo de alta productividad. Por lo que resulta de utilidad tener en cuenta las variaciones estructurales entre matas de materiales de *P. coloratum* para la selección de materiales en un programa de mejoramiento, priorizando una estructura compacta de mata (matas de

altura y diámetro similar).

Por otro lado, mediante el mejoramiento genético convencional se ha incrementado la tolerancia a la salinidad en varias especies cultivadas, entre ellos, trigo, avena, maíz (Ashraf y McNeilly, 1989), arroz y algodón. Así como también, en forrajeras, entre ellas *Panicum antidotale* (Ahmad *et al.*, 2010). En esta última, se usó el método de selección recurrente y se necesitaron tres ciclos de selección (Noble *et al.*, 1984). En los trabajos citados, se demuestra que la tolerancia a la salinidad es un carácter complejo (Ashraf, 1994), que tiene base genética y que podría ser modificado mediante selección. Sin embargo, para que este proceso resulte exitoso, es necesario contar con la existencia de variabilidad en respuesta al estrés en el germoplasma base (Young, 1994) y que dicha variabilidad tenga considerable componente genético aditivo.

Dentro de un programa de mejoramiento genético, el paso inicial es el de evaluar la variabilidad existente en el germoplasma que constituirá el material base a usarse como recurso inicial (Poehlman y Sleper, 1995). La fuente inicial puede ser diversa, entre ellas, semillas o material vegetativo, como también, recursos locales, cultivares, poblaciones mejoradas, híbridos, etc. (Falconer, 1981; Nguyen y Sleper, 1983; Ferrari Usandizaga *et al.*, 2015).

En base a estos antecedentes se plantearon las siguientes hipótesis, de la que derivan los objetivos específicos planteados:

Hipótesis

1. Existe variabilidad en caracteres relacionados a tolerancia a salinidad en la población que constituye el germoplasma base de materiales de *P. coloratum*.
2. La variabilidad en los caracteres relacionados a la salinidad en el germoplasma base, tiene un componente genético aditivo, que puede ser usado para obtener un avance por selección.

Objetivos Específicos

1. Determinar si existe variabilidad entre materiales de *P. coloratum* para el crecimiento en salinidad en condiciones de campo y constituir una población base destinada al mejoramiento genético para tolerancia a la salinidad.
2. Estimar parámetros genéticos en caracteres relacionados con la tolerancia a salinidad a partir de la progenie de medios hermanos de *P. coloratum* de la población base, y en base a estos predecir el avance genético que se obtendría de realizar una selección con una intensidad del 15 %.

Materiales y Métodos

Los ensayos descritos en este capítulo comparten la metodología de multiplicación vegetativa de los materiales colectados de *P. coloratum* descrita previamente.

Objetivo específico 1

Evaluación de los materiales colectados de *P. coloratum* en condiciones de campo

El objetivo de este ensayo fue comparar la acumulación de materia seca y forma de matas entre materiales creciendo en condiciones de campo, sobre suelo con marcada salinidad en las cercanías de la localidad de Chascomús.

Para ello, se trasplantaron 15 materiales colectados de *P. coloratum* var. *coloratum* con 12 repeticiones por cada material, en una parcela de 200 m² usando un diseño completamente al azar con una distancia de 1 m entre plantas y 1 m entre surcos.

El trasplante se realizó el 19 de diciembre del 2013 en la Chacra Experimental Integrada Chascomús, INTA-MAA, con un suelo de tipo Natracualf. En el mes del trasplante la conductividad eléctrica media del suelo fue de 4.7 dS/m y el pH 9.5.

Acumulación de forraje

Para comparar la acumulación de materia seca de los materiales en condiciones de campo, se pesó en fresco el total aéreo de la mata; una alícuota de ésta se pesó en fresco y fue llevada a estufa hasta peso constante. Luego se pesó la alícuota y se obtuvo la materia seca aérea total de la mata. Esta medida se repitió en dos años consecutivos.

En el primer año la cosecha se realizó el 29 de mayo del 2014 en todos los materiales de la parcela, a los 161 días posterior al trasplante. La precipitación acumulada durante ese período fue de 661 mm.

Durante el segundo año, se realizó un corte de emparejamiento el 20 de septiembre de 2014, y luego, se cuantificó la materia seca aérea acumulada desde entonces, el 16 de marzo del 2015, en algunos materiales seleccionados. El período de crecimiento desde el corte de emparejamiento fue de 177 días. La precipitación acumulada durante este período fue de 788 mm.

Estructura de la planta

Antes de la cosecha para obtener acumulación de materia seca de matas durante el primer año, se hizo la valoración de los parámetros referidos a la forma de ésta, se cuantificó altura y diámetro de matas.

La altura se midió dentro de la mata, sobre el vástago más alto, desde la base de la planta hasta la lígula de la lámina de la hoja bandera.

El diámetro de la mata, se midió desde la lígula de la hoja bandera de un extremo hasta la lígula de la hoja bandera del extremo opuesto.

Sincronía de floración y foliosidad

Esta determinación se hizo en el mes de noviembre del segundo año, recorriendo el lote, posterior al corte de emparejamiento hecho en octubre.

La valoración se hizo cualitativamente por mata, sin discriminar por material. A continuación, se detalla las características observadas y su valoración:

- Presencia de flores: Flores iniciales (0), Floración completa (0.5) o Flores tardías (-0.5)
- Matas: foliosa (0.5) o rala (-0.5)

- Relación hoja/tallo: Alta (0.5) o Baja (-0.5)

Con esa valoración se hizo el cálculo de un índice que se denominó IFFT, que tuvo en cuenta el comportamiento de los materiales mediante la sumatoria de las características previamente evaluadas. Este cálculo se realizó por material.

IFFT= presencia de flores + matas + relación hoja/tallo

Este índice principalmente, nos permitió diferenciar materiales que a nivel de campo presentaron floración no sincrónica, por lo tanto, no podían cruzarse entre sí. Por lo que en lo que resta de la tesis, nos focalizamos en aquellos materiales que corresponden al IFFT > 0, y en estos se determinó acumulación de materia seca aérea durante el segundo año.

Objetivo específico 2

Evaluación de la variabilidad de familias de medios hermanos de *P. coloratum* en presencia y ausencia de salinidad

En este ensayo se evaluó el crecimiento de familias de medios hermanos de la progenie de materiales seleccionados en el ensayo “Evaluación de los materiales en condiciones de campo” a nivel de invernadero.

Recapitulando, 15 de los materiales de la colecta inicial de *P. coloratum* fueron multiplicados y llevados a campo, el 30 de diciembre del 2013 a una chacra experimental ubicada en la localidad de Sinsacate (30°56'44.1" S, 64°05'03.9" W), sobre un suelo de tipo Haplustol típico. Se usaron aproximadamente 12 repeticiones por material dispuestos al azar, con separación entre matas de 1 m. Durante el rebrote en el segundo año del trasplante, se hizo un corte de emparejamiento a 20 cm en el mes de octubre. Luego, con los resultados del ensayo hecho en la chacra experimental de la localidad de Chascomus, se descartaron aquellos materiales no sincrónicos para el carácter de floración (4 materiales), quedando a nivel de campo los materiales: 1, 2, 3, 5, 7,10, 11,12, 13 y 16 que constituyen la población base para el mejoramiento por tolerancia a la salinidad. De estos materiales se colectaron semillas preservando la identidad de la madre para construir familias de medios

hermanos. El 28 de enero del 2015 se colocó una trampa por mata para colectar las semillas de manera individual, posterior a una antesis para asegurar la polinización cruzada de los materiales (Imagen 1).



Imagen 1. Trampas para la cosecha de semillas en lote de la localidad de Sinsacate, año 2015.

El 10 de marzo se colectaron las semillas de cada trampa producto del cruzamiento de los 10 materiales sincrónicos de *P. coloratum*, luego se limpiaron de impurezas y se pesaron. Posteriormente, se tomaron al azar muestras de 50 semillas de cada una de las familias de medios hermanos y se colocaron en cajas de Petri con vermiculita. El ensayo en invernadero que se detalla a continuación se realizó sobre plántulas de la progenie que constituyeron 10 familias de medios hermanos. Se trasplantaron 13 plántulas en tubetes forestales de 55 mm de diámetro y 15 cm de alto y fueron regadas con agua corriente cada 2 días.

Fenotipificación de la variabilidad para tolerancia a la salinidad en invernadero

La caracterización de tolerancia a la salinidad se realizó bajo condiciones controladas de invernadero, se usaron plántulas de 2 semanas con 2 hojas verdaderas, sin macollos y de tamaño homogéneo. Las mismas se dispusieron en tubetes forestales de 55 mm de diámetro y 15 cm de alto, con sustrato inerte compuesto de, 1 parte de arena gruesa de río

(previamente lavada) y 2 de perlita gruesa.

El diseño experimental usado en este ensayo fue el de parcela dividida, completamente aleatorizado. La caracterización de las 10 familias de medios hermanos fue realizada en tratamientos de ausencia de salinidad y con el agregado de 200 mM NaCl, y se usaron 13 repeticiones por familias de medios hermanos.

El tratamiento de salinidad aplicado se detalló en el capítulo anterior, y el incremento gradual de salinidad tuvo una duración de 2 semanas.

Este ensayo tuvo un riego mediante un sistema de hidroponía automático, que permitió el ascenso de la solución nutritiva desde la base de las macetas hasta el borde superior, permaneciendo allí durante 12 min. Este ciclo se repitió 3 veces al día durante las horas de luz, con intervalos de 5 horas. Este sistema de riego, permitió que el sustrato de las macetas estuviese a capacidad de campo de manera constante. Una vez por semana se controló la concentración de las soluciones midiendo la conductividad eléctrica del drenaje por bandeja, mediante un termo/conductivímetro digital de mesa marca (Altronix CTX-II, Argentina).

El ensayo duró 20 días y durante el mismo se midieron las siguientes variables:

- a. Tasa de aparición de hojas y macollos (TAH y TAM), número de hojas y macollos finales (NH y NM): El número de hojas y macollos se contó 2 veces por semana, luego se calculó la pendiente de la tasa de aparición de los mismos con relación a los grados días. Se consideró 10 °C la temperatura base de la especie (Ferri *et al.*, 2006). Además, se contabilizó el número de hojas y macollos finales.
- b. Al momento de la cosecha se separó parte aérea de la subterránea, y se determinó el peso fresco aéreo (PFA). Luego las muestras se colocaron en estufa a 70 °C hasta peso constante y se volvió a pesar para obtener el peso seco aéreo (PSA). En esa instancia se midió también el ancho de la última hoja totalmente expandida y la altura de planta.

Análisis de datos

Para el procesamiento estadísticos de los datos se usó el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2013), que cuenta de una interfaz con y “R” realizó un análisis de varianza (ANAVA) con niveles de significancia de $p < 0,05$. En estos análisis, se compararon los datos absolutos por variable. Respecto al ensayo de fenotipificación de la variabilidad en invernadero, se compararon los diferentes tratamientos de salinidad y materiales como efecto fijo. Durante el análisis se tuvo en cuenta el diseño de parcela dividida.

Estimación de parámetros genéticos

Para la estimación de los parámetros genéticos en la población en estudio se realizó un análisis de la varianza para cada carácter, siguiendo un modelo mixto con el paquete estadístico Infostat 2008, que cuenta de una interfaz con “R”

Se evaluaron familias de medios hermanos con un diseño de parcela dividida, en la cual se estimaron los componentes de varianza de estas fuentes de variabilidad. De acuerdo al modelo abajo descrito.

$$Y_{ijk} = [\mu + G_i + R_j + (GR)_{ij} + B_k + (GB)_{ik} + (RB)_{jk} + E_{ijk}]$$

$$i = 1, 2, \dots, n; j = 1, 2, \dots, n; k = 1, 2, \dots, n.$$

Donde μ , es la media general; G, son los efectos de la progenie (genotipo); R, es el efecto de las réplicas; B, corresponde al efecto de la parcela; E, representa el efecto del error experimental.

Para la determinación que se detallan a continuación, se aplicó el método propuesto por Araujo y Coulman (2002).

La varianza fenotípica total σ^2_P se puede expresar como la suma de las varianzas: genética (σ^2_G), ambiental (σ^2_E) y la que surge de la interacción entre genotipo y ambiente (σ^2_{GE}):

$$\sigma^2_P = [\sigma^2_G + \sigma^2_E + \sigma^2_{GE}]$$

La varianza genética está dada por la varianza debida a la progenie y se encuentra integrada por las 3 componentes, la varianza aditiva (σ^2_A), la dominante (σ^2_D) y de interacción no-alélica o epistática (σ^2_I), siendo:

$$\sigma^2_G = [\sigma^2_A + \sigma^2_D + \sigma^2_I]$$

En este trabajo se supone que tanto los efectos dominantes como los epistáticos son pequeños en comparación con los efectos aditivos para la expresión de las características cuantitativas bajo estudio. La varianza aditiva σ^2_A es el resultado de genes con efectos lineales aditivos y es la causa principal del parecido entre parientes. Es también la principal componente de varianza que permite la selección en un programa de mejoramiento.

La componente de varianza dentro de familias de medios hermanos se considera en parte la varianza genética aditiva. Con las varianzas aditiva y fenotípica se puede calcular la heredabilidad en sentido estricto (h^2) y estimar la ganancia genética por ciclo utilizando diferentes métodos e intensidades de selección.

El componente de la varianza debida a la progenie (σ^2_G) representa la varianza genética entre familias de medios hermanos, que es igual a $1/4$ de la varianza genética aditiva (Falconer, 1981).

$$\sigma^2_A = [4 \sigma^2_G]$$

El componente del error de la varianza (σ^2_e) está dado por la varianza ambiental entre parcelas.

Para estimar la heredabilidad en sentido estricto (h^2) se utilizó la ecuación que relaciona la componente aditiva de la varianza sobre la varianza total, siendo

$$h^2 = [\sigma^2_A / \sigma^2_P]$$

La ganancia genética por ciclo de selección en base a plantas individuales, en un año y una localidad, se estimó con la siguiente ecuación:

$$\Delta G = [c k h^2 \sigma_P]$$

Donde; c, es el factor de control parental; k, es el diferencial estandarizado de selección; h^2 , corresponde a la heredabilidad en sentido estricto; σ_P , es la varianza fenotípica. El factor de control parental se consideró equivalente a 0.5, ya que las plantas seleccionadas permanecen en la población original bajo condiciones de polinización abierta, por lo que se realiza una selección maternal. K: se calculó como el cociente entre el diferencial de selección (S: media de la población selecta- media de la población base) y el desvío fenotípico (σ^2_P)

Una heredabilidad de 0 quiere decir que no hay varianza genética aditiva en esa población y en ese ambiente particular; en cuyo caso, la varianza fenotípica se debe enteramente a la variación ambiental y a los componentes no aditivos de la varianza genética.

El análisis estadístico del carácter de pilosidad se hizo con el análisis de las mediciones promedios entre familia de medios hermanos.

Resultados

Evaluación de los materiales colectados de *P. coloratum* en condiciones de campo

El objetivo de esta caracterización fue evaluar si matas colectadas, que habían sobrevivido a intensas sequías y fuertes heladas, presentaban diferencias entre ellas en condiciones de campo con marcada salinidad.

Resultado de esta, se identificaron diferencias significativas entre materiales de *P. coloratum* evaluados en la localidad de Chascomús durante 2 años consecutivos.

Acumulación de forraje

Durante el primer año de implantación, los materiales presentaron diferencias significativas en la acumulación de biomasa aérea. Entre ellos, se destacó al material 2 con mayor acumulación de materia seca por mata (Figura 13). Mientras que los de menor acumulación de biomasa aérea fueron los materiales 10, 6 y 11.

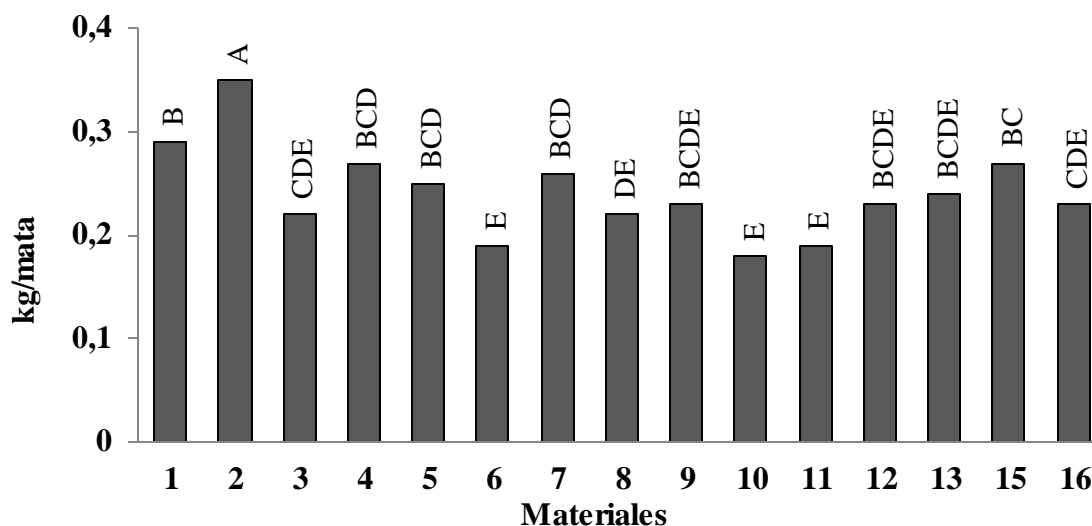


Figura 13. Acumulación de materia seca por mata en materiales de *P. coloratum* a los 161 días del trasplante, en la localidad de Chascomús. Repeticiones por material n=13. Las barras indican valores medios, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según Fisher.

Estructura de la planta, sincronía de floración y foliosidad

Durante el primer año de crecimiento se evaluó la forma de matas en condiciones de campo, determinándose mediante la relación diámetro/altura. Respecto a esto, algunas matas presentaron formas más compactas como los materiales 1, 6 y 10, con diámetro y altura similar. Mientras que las matas 12, 9, 16 y 3 presentaron formas más abiertas y menos compactas, con diámetro superior a la altura. Sin embargo, no se identificaron grandes diferencias entre los materiales en esta relación, ya que esta se encontró entre 1 y 1,5.

Por otra parte, la evaluación de la foliosidad, inicio de floración y relación hoja/tallo por mata (IFFT) permitió establecer que materiales 6, 4 y 8 fueron los que presentaron menor índice IFFT ($< -0,5$).

Por último, se confrontaron estas variables (diámetro/altura vs IFFT), junto a la acumulación de biomasa aérea (Figura 14). Se pudo identificar un grupo de matas, con elevado índice IFFT, diámetro/altura entre 1 y 1,5, y variable acumulación de materia seca.

Dentro de este grupo se destacaron los materiales 1, 7, 2, 5, 16, 12 y 3 con índice IFFT >0, elevada acumulación de materia seca aérea. Los materiales 10, 13 y 11 presentaron índices IFFT bajos entre 0,30 a 0,5, con baja acumulación de materia seca. Por otro parte, los materiales 6, 4, 8, 9 y 15 presentaron un índice IFFT negativo; sin embargo, el material 15 presentó una mayor acumulación de materia seca aérea.

La descripción morfológica de matas se describe en tabla Anexo cap 3 Tabla 1.

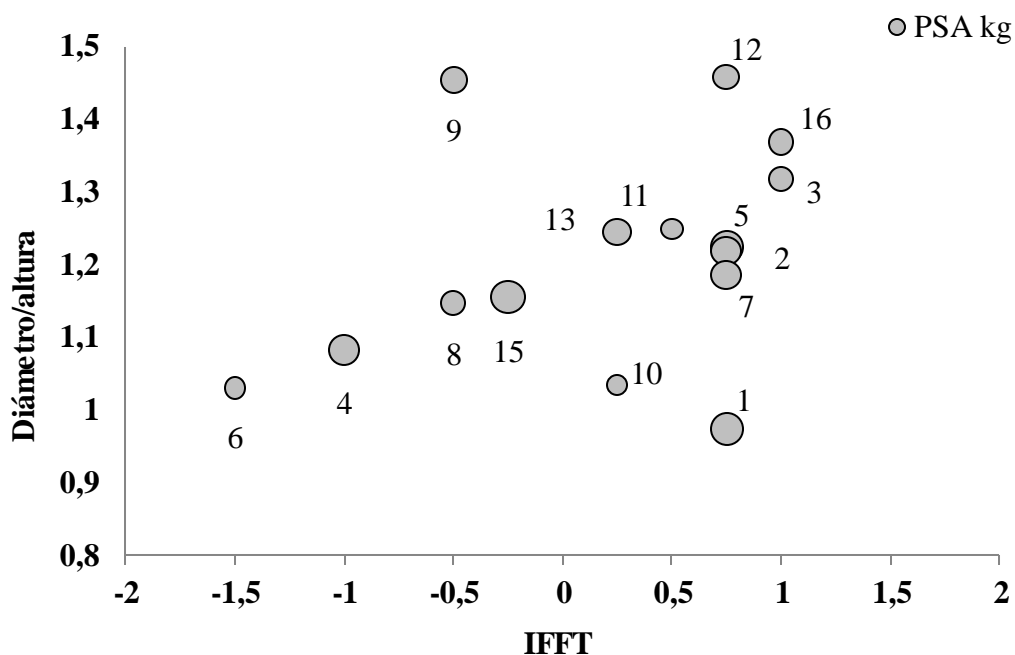


Figura 14. Diámetro/altura en relación al IFFT en matas de materiales de *P. coloratum* crecidos en la localidad de Chascomús. El tamaño del círculo indica la acumulación de materia seca. Repeticiones por material n=13.

Con estos resultados, se seleccionaron materiales para conformar una población base de un programa de mejoramiento. Con la finalidad de no reducir la variabilidad genética, se seleccionaron materiales con índices IFFT superiores a 0 y con relación diámetro/altura entre 1 y 1,5, sin descartar por la acumulación de materia seca. De acuerdo a estos criterios se descartaron los materiales 6, 4, 8, 15 y 9.

Durante el segundo año, se evaluó acumulación de materia seca entre materiales seleccionados. Durante este segundo año se destacaron los materiales 2, 5, 7 y 13 con mayor acumulación aérea, mientras que el material 11 fue el de menor kg/mata (Figura 15).

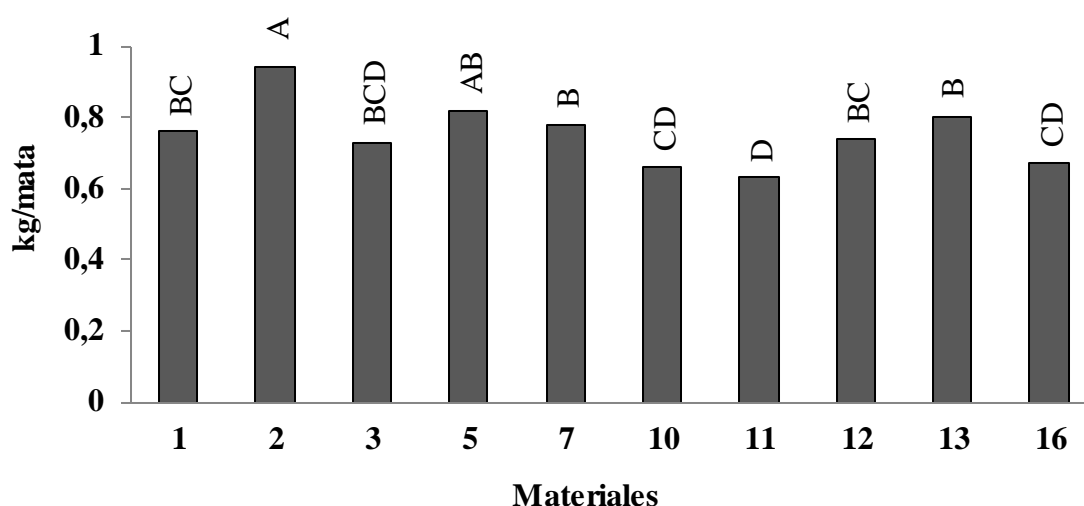


Figura 15. Acumulación de materia seca por mata en materiales de *P. coloratum* a los 104 días de crecimiento, en la localidad de Chascomús. Repeticiones por material n= 8. Las barras indican medias, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según test de Fisher.

Evaluación de la variabilidad de familias de medios hermanos de *P. coloratum* en presencia y ausencia de salinidad

Fenotipificación de la variabilidad para tolerancia a la salinidad en invernadero

En esta instancia se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento vegetativo en la progenie de plantas, producto del cruzamiento al azar de los materiales seleccionados a campo. Esta fue evaluada como familias de medios hermanos en condiciones controladas

de invernadero bajo tratamientos de salinidad de 0 y 200 mM NaCl.

La interacción entre el “tratamiento de salinidad y las familias de medios hermanos” no resultó significativa ($p < 0,05$) para ninguna de las variables analizadas (Tabla 5). Respecto al efecto de la salinidad, la variable TAM mostró diferencias entre tratamientos, ($p < 0,05$) siendo mayor en salinidad (0,44) respecto a la falta de estrés (0,18). Por otro lado, entre las familias de medios hermanos se observaron diferencias entre ellas para la variable de PSA.

Asimismo, la partición por tratamiento de salinidad, mostró diferencias significativas entre familias de medios hermanos para las variables PSA y TAH, en ausencia de salinidad (Anexo cap 3 Tabla 2). En esa condición se distinguen las familias de medios hermanos 10, 13, 5, 2 y 12 del resto para la variable PSA (Anexo cap 3 Figura 1). Mientras que para la variable TAH se distingue los materiales 12, 11, 13, 16, 5 y 1 (Anexo cap 3 Figura 2).

Tabla 5. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre familias de medios hermanos de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en presencia y ausencia de 200 mM NaCl (T) y su interacción, en las siguientes variables de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), número de hojas (NH), número de macollos (NM), tasa de aparición de hojas GD (TAH) y tasa de aparición de macollos (TAM).

	p-valor				
	PSA	TAM	TAH	NH	NM
Familia de medios hermanos ($F_{1/2}$)	0,0133	0,5368	0,0606	0,0779	0,0982
Tratamiento (T)	0,0657	0,0081	0,6253	0,0821	0,0726
$F_{1/2} * T$	0,3853	0,1575	0,1709	0,8253	0,8275

Nota: Repeticiones por familia de medios hermanos $n=14$. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas.

Estimación de parámetros genéticos

Dado que para hacer mejoramiento genético la selección se realiza según las

características de un genotipo en un ambiente en particular, la estimación de los componentes de varianza se determinó diferenciando las condiciones control y salinidad (200 mM NaCl).

En condiciones de ausencia de salinidad, la estimación de los componentes de varianza indicó que la mayor parte de la variación fenotípica total se debe a los efectos del ambiente, siendo la varianza debida a efectos genéticos o de familias de medios hermanos una parte pequeña respecto de la variación total. El mismo patrón de variación, aunque más marcado, se observó entre las plantas que crecieron en presencia de salinidad.

En general, para los caracteres de crecimiento evaluados en las plantas crecidas en condición de salinidad, los valores de heredabilidad fueron bajos o nulos, lo que sugiere que la variabilidad fenotípica observada no corresponde a varianza genética aditiva para estos caracteres. Cabe destacar que los valores de la varianza genética de los caracteres de crecimiento evaluados en plantas creciendo en condiciones control (sin el agregado de NaCl) también son bajos. Esto hace suponer que la mayor parte de la variabilidad fenotípica entre plantas sería debida a efectos del ambiente o surgiría de la interacción entre genotipos y el ambiente. De todas maneras, dado que los niveles de variación fenotípica son también bajos, la proporción del componente aditivo es considerable, lo que permite estimar valores de heredabilidad, aunque también bajos (Tabla 6). Los valores más altos se evidencian en ausencia de estrés para PSA, y para el parámetro TAH en ausencia y presencia de salinidad, donde los valores de heredabilidad obtenidos muestran que una cierta proporción de la varianza podría deberse a efectos genéticos aditivos.

Tabla 6. Varianzas: genética, aditiva, por bloque, del error y fenotípica y heredabilidad estricta entre progenie de *P. coloratum*, en ausencia y presencia de 200 mM NaCl, en los siguientes parámetros de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), número de hojas (NH), número de macollos (NM), tasa de aparición de hojas (TAH) y tasa de aparición de macollos (TAM).

0 mM NaCl					
	PSA	TAH	TAM	NM	NH
Var Genética	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
Var Aditiva	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000
Var Bloque	0,040	0,000	0,001	0,001	0,010
Var E	0,109	0,003	0,005	0,008	0,073
Var Fenotípica	0,189	0,003	0,006	0,009	0,083
Heredabilidad Estricta	0,212	0,121	0,065	0,000	0,000
200 mM NaCl					
	PSA	TAH	TAM	NM	NH
Var Genética	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
Var Aditiva	0,002	0,000	0,004	0,000	0,000
Var Bloque	0,001	0,000	0,006	0,001	0,008
Var E	0,040	0,003	0,029	0,010	0,096
Var Fenotípica	0,043	0,003	0,039	0,011	0,104
Heredabilidad Estricta	0,038	0,138	0,093	0,000	0,000

Predicción del avance genético que se obtendría al realizar selección

En la Tabla 7, se muestran los valores estimados de avance genético que se obtendrían de aplicar una selección del 15% para aumentar los parámetros de crecimiento estudiados, los cuales representan aproximadamente 19 individuos.

En la condición control, se observó un avance genético interesante en lo que se refiere al PSA, lo que indicaría que el germoplasma con el que se cuenta podría introducirse en un programa de mejoramiento para obtener materiales con mayor acumulación aérea en esa condición.

Mientras que, en condiciones de salinidad el avance genético obtenido fue bajo. Este se condice con el bajo valor de heredabilidad estimado (Tabla 6).

Tabla 7. Avance genético y ganancia genética media esperada con 15% de selección (K), en progenies de *P. coloratum*, en ausencia y presencia de 200 mM NaCl; para los siguientes parámetros de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), tasa de aparición de hojas (TAH), tasa de aparición de macollos (TAM), número de macollos (NM), número de hojas (NH).

	0 mM NaCl				
	PSA	TAH	TAM	NM	NH
Media población	0,840	0,220	0,180	6,430	5,050
Media de selección (i 15%)	1,435	0,302	0,304	8,944	8,316
K	3,150	24,747	20,072	279,383	39,394
AG	0,063	0,010	0,008	0,000	0,000
Media esperada	0,903	0,230	0,188	6,430	5,050
Avance esperado en %	6,300	0,990	0,803	0,000	0,000
	200 mM NaCl				
	PSA	TAH	TAM	NM	NH
Media población	0,540	0,210	0,440	4,310	6,670
Media de selección (i 15%)	0,855	0,291	0,731	6,882	8,333
K	7,419	27,949	7,470	235,996	15,963
AG	0,006	0,006	0,013	0,000	0,000
Media esperada	0,546	0,216	0,453	4,310	6,670
Avance esperado en %	0,593	0,559	1,345	0,000	0,000

Discusión

Variabilidad fenotípica de los materiales *P. coloratum* en condiciones de campo

En el mejoramiento genético, los genes disponibles para ser manipulados por los mejoradores mediante métodos convencionales, son aquellos que las especies han acumulado a lo largo de su historia evolutiva. Respecto a *P. coloratum*, en Argentina hay experiencia reciente en el mejoramiento de la var. *makarikariense*, usando como fuente inicial una colección de materiales de diferentes regiones del país (Giordano *et al.*, 2013).

En este trabajo de Tesis, materiales colectados de *P. coloratum* var *coloratum* presentaron amplia variabilidad en acumulación de peso seco aéreo en condición de campo caracterizada por condiciones extremas de pH y marcada salinidad (figura 13 y 15). Esta variabilidad permitió diferenciar aquellos materiales que resultaron más productivos en las condiciones de campo descriptas.

Las matas de *P. coloratum* a nivel de campo presentan diferencias en altura, número de macollos reproductivos, porcentaje de láminas y la relación lámina/tallo (Ferri *et al.*, 2006). Estas diferencias podrían acarrear diferencias en cuanto a la accesibilidad y palatabilidad por parte del animal (Briske, 1991). En Argentina esta especie se introdujo por su alto potencial forrajero, por lo que, durante la selección del ideotipo de mata de *Panicum*, se priorizó una estructura de mata compacta, con relación diámetro/altura entre 1 y 1.5, así como, niveles superiores de hoja/tallo y presencia de flores al momento de la evaluación (Figura 13 y Anexo cap 3 Tabla 1).

Variabilidad de la progenie de *P. coloratum* en condiciones de invernadero

Antes de iniciar un programa de mejoramiento genético, es fundamental contar con

germoplasma de amplia base genética para disponer de mayor variabilidad genética en los caracteres de interés, que pueda ser utilizada para lograr un progreso por selección (Vogel y Burson, 2004).

El comportamiento de las familias de medios hermanos de *P. coloratum* en interacción con los tratamientos de ausencia y presencia de salinidad no mostraron diferencias significativas en las diversas variables de crecimiento vegetativo (tabla 6). Por otra parte, la respuesta de las familias de medios hermanos en las variables de crecimiento, a la presencia de 200 mM NaCl mostró diferencias no significativas, mientras que se observaron diferencias en el tratamiento control. En esta última condición se observaron diferencias en las variables PSA y TAH entre familias de medios hermanos (Anexo cap 3 tabla 2). Se demostró de esta forma, que los materiales evaluados mantienen variación en el crecimiento de las plantas en ausencia de estrés. Por tratarse de una especie alógama es de esperar que la variación se encuentre estructurada y su proporción sea mayor dentro de las familias que entre familias (Hamrick *et al.*, 1990). Por ello resulta difícil detectar diferenciación entre familias de medios hermanos en las características que consideramos. A esto se agrega el hecho que inicialmente se partió de un número reducido de individuos, representado por la población colectada desde la localidad de Chascomús que mostraron variabilidad entre ellos como se demostró por técnicas moleculares (Pittaro *et al.*, 2015). Sin embargo, la selección inicial realizada para constituir la población base de mejoramiento pudo resultar en una reducción adicional de la variabilidad y consecuentemente podrían haberse eliminado genotipos diferentes en cuanto a tolerancia a pesar de que resultaran similares en cuanto a floración. Sin embargo, aunque en baja proporción, se demostró que sería posible incrementar la tolerancia a la salinidad por selección partiendo de un escaso número de individuos previamente seleccionados para confluir en un ideotipo determinado.

Adicionándole a esto el bajo tamaño de la población inicial, así como también, que estas familias provienen del entrecruzamiento de clones ya seleccionados.

Estimación de los componentes de varianza

Una de las formas de cuantificar la variabilidad del germoplasma es a través de la estimación de los componentes de varianza. En este caso, a partir de un análisis de modelos mixtos, se estimaron las varianzas debidas a las familias o varianza genética y la varianza debida al ambiente. A partir de allí se obtuvo el componente de varianza aditiva para cada una de las variables estudiadas. En este caso se analizaron por separado las familias según crecieran en condiciones control o de salinidad, asumiendo que los mismos genotipos pueden presentar fenotipos diferentes de acuerdo a la condición ambiental en la que se desarrollen. Respecto a la evaluación de nuestra progenie, no hubo una relación directa del crecimiento en ausencia de estrés respecto a la presencia de salinidad. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en especies como trigo (Bhutta y Hanif, 2008).

El tamaño de la colección de germoplasma con la que se inicia un programa puede a veces no contener la variabilidad suficiente para lograr progresos mediante la selección. *P. coloratum* por tratarse de una especie alotetraploide, alógama y altamente heterogénea se supone, tendría suficientes variaciones morfológicas entre plantas que harían suponer una variabilidad genética suficiente (Young, 1994). Sin embargo, la mayoría de los trabajos que desarrollan el método de selección recurrente, entre ellos el de Ashraf *et al.* (1986), indican que se deben usar poblaciones base superiores en variabilidad para obtener respuestas significativas durante la selección. En este estudio, se comprobó que la variación genética para los caracteres de interés en el germoplasma base de la var. *coloratum* cuando crece en condición de salinidad resultó escasa, lo que determinó que el avance genético estimado que se obtendría por selección sería extremadamente bajo. Es por esto que resulta recomendable incrementar la base genética del germoplasma incluyendo nuevos genotipos de diversos orígenes buscando la variabilidad necesaria para obtener progresos significativos.

El conocimiento de la varianza genética aditiva, respecto a la varianza genética total, es importante a la hora de planificar el programa de mejoramiento genético en forraje perenne (Hill, 1977). El avance genético esperable, depende de la variación genética en la población, la heredabilidad de la característica, la intensidad de la selección y la eficiencia

en el cruzamiento entre parentales (Falconer 1981; Empig *et al.*, 1972; Hallauer y Miranda, 1981; Nguyen y Sleper, 1983).

Por otro lado, la dificultad para lograr incrementos en tolerancia al estrés abiótico ha sido motivo de preocupación entre los investigadores. Hasta el momento se sugirió que la domesticación y los trabajos intensos de mejoramiento en especies de cultivo, han estrechado la base genética del germoplasma, por lo que se ha reducido enormemente el potencial para lograr ganancias genéticas considerables en tolerancia al estrés (Munns *et al.*, 2016).

En forrajeras perennes, las ganancias genéticas estimadas para caracteres cuantitativos pueden resultar bajas (Brummer y Casler, 2009), lo que se explica por los bajos valores de heredabilidad o por los amplios desvíos fenotípicos con que se cuentan en las poblaciones frecuentemente. Young (1994) expuso que, en una colección de materiales de *Panicum coloratum* cv 'Klein', se calcularon que se obtendrían bajos porcentajes de avances genéticos en caracteres referidos a la producción de forraje. Sin embargo, Potts y Holt (1967), pudieron cuantificar ganancias considerables para 6 características referidas a la producción de forraje en la misma especie.

De acuerdo a nuestros resultados, en presencia como en ausencia de salinidad, se identificaron escasos a nulos avances genéticos para la gran mayoría de las variables morfológicas y de crecimiento, en las progenies de *P. coloratum*; en consonancia con los expresados por Young (1994).

Panicum coloratum var. *coloratum* fue introducido en EEUU como una pastura perenne, con características atractivas para ser usada como forraje (Potts y Holt, 1967). Según USDA-NRCS (Carr, 2014), los resultados del mejoramiento genético de esta especie en EEUU comenzaron a partir del 1969 con la liberación del cultivar 'Selección 75', seleccionado por la producción de forraje; luego le siguió el material 'Verde' en 1982 elegido para aumentar el tamaño de la semilla. 'OKPC-1' en 1982, fue seleccionado por su mayor tolerancia al frío. 'TEM-LDI' en 1991, a partir de la 'Selección 75' seleccionado por su rápida germinación y 'TEM-SRI', liberado en 1992, con elevada resistencia a la dehiscencia de semillas.

Además del mejoramiento genético referido a la producción de biomasa, buena parte de los trabajos realizados en *P. coloratum*, se abocaron a la producción de semillas y el establecimiento de plántulas (Tischler y Young, 1987; Young y Tischler, 1989; Young, 1991; Young, 1993; Giordano *et al.*, 2013). En estos casos fue posible obtener avances después de efectuar selección para cambiar los atributos del material. Sin embargo, no se encontraron referencias sobre programas de mejoramiento cuyo objetivo fuera modificar la tolerancia a algún tipo de estrés por selección genética de la especie, por lo que este trabajo constituiría una contribución original.

Mejoramiento para tolerancia a salinidad

Para modificar la tolerancia a la salinidad en un cultivo es necesario tener suficiente variación genética en respuesta a la misma. Esta variación hace posible la selección y posterior mejoramiento (Irshad-ul-Haq *et al.*, 2010). Esto se considera un requisito indispensable para un buen desenlace en un programa de mejoramiento (Ashraf *et al.*, 1986). En nuestra población de estudio, se identificó crecimiento diferencial en condiciones de salinidad (Pittaro *et al.*, 2015). Tal como se discutió en el capítulo 2, esto se debió a cambios en la actividad SOD y en la concentración de iones K^+ en las secciones láminas y vainas jóvenes entre materiales de tolerancia contrastante. En los párrafos siguientes se discute si este crecimiento diferencial puede ser usado en un posterior mejoramiento genético.

Las familias de medios hermanos de *P. coloratum*, no presentaron suficientes efectos genéticos aditivos como para identificar diferencias significativas en las variables analizadas, en tolerancia a salinidad. Young (1994) sugiere que los caracteres morfológicos como el ancho de lámina son difíciles de ser modificados a través de la selección directa y propone el estudio más exhaustivo de esta característica, así como, su relación con otros caracteres.

En esta tesis, no se detectaron diferencias entre familias de medios hermanos de *P. coloratum* en los tratamientos de salinidad para las variables de crecimiento y criterios morfológicos. Diferente a lo que observaron Irshad-ul-Haq *et al.* (2010) en poblaciones de

maíz, que presentaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos de salinidad evaluados, para las variables de germinación, longitud de tallo y raíz, concentración de Na^+ , K^+ y relación K^+/Na^+ . Estos autores expresan que esas diferencias se deben a efectos genéticos aditivos que controlan dichas características. De acuerdo a nuestra población de medios hermanos y a lo expuesto anteriormente, no sería esperable tener varianza genotípica aditiva. Nuestra población en estudio muestra escasa variabilidad genética y consecuentemente baja varianza aditiva. Esta característica de la población en estudio podría deberse a varias razones: por un lado, la población fue colectada por haber sobrevivido a condiciones de sequía y helada, lo que sin duda expuso los individuos a selección natural y posiblemente redujo considerablemente su varianza genética, y por otro lado, la selección por ejercida buscando materiales sincrónicos podría haber reducido aún más la varianza genética entre los individuos.

Singh *et al.* (2010) consideran que en crucíferas la tolerancia a los estreses abióticos está relacionada a la mayor actividad de las enzimas antioxidantes, presentando alta varianza genotípica con bajos avances genéticos; por lo que proponen que la regulación de las características antioxidantes está determinada por genes no aditivos. Estos autores concluyen que la actividad antioxidante sirve como marcador bioquímico confiable para identificar los genotipos promisorios; sin embargo, no puede ser usado en técnicas de mejoramiento convencional. En nuestra investigación, se identificaron escasos avances genéticos esperables para variables morfológicas y de crecimiento en la población de medios hermanos de *P. coloratum*. El uso de otros parámetros, entre ellos fisiológicos, podría evidenciar otros avances genéticos en la población de estudio. Sin embargo, de acuerdo a lo planteado por Singh *et al.*, (2010), los avances genéticos no cambiarían significativamente.

Respecto a la selección de materiales promisorios, Tester y Bacic (2005) concluyen que no es suficiente el uso de parámetros de crecimiento como único criterio en un programa de mejoramiento de tolerancia a salinidad. Por otro lado, Rosielle y Hamblin (1980), proponen que existe una correlación opuesta entre tolerancia y rendimiento. Sin embargo en este sentido, Cattivelli *et al.*, (2008) justifican que en la selección de progenitores tolerantes a sequía en maíz se use el criterio del rendimiento.

Respecto a lo citado en el párrafo anterior, en este trabajo, se usó como población base

materiales colectados de *P. coloratum* que habían presentado tasa de crecimiento superior que el cv comercial 'Klein' en presencia de 200 mM NaCl. Por otro lado, los materiales presentaron variabilidad entre ellos en tolerancia a salinidad, alcalinidad y frío, así como en algunos parámetros fisiológicos referidos a estos. Además, presentaron diferencias en criterios referidos a la estructura de matas y la acumulación de materia seca. Sin embargo, la variabilidad existente no permitió obtener avances genéticos significativos en mejoramiento de tolerancia a salinidad.

Conclusiones generales

En este trabajo se estudió una población de materiales de *P. coloratum* var. *coloratum*, proveniente de la localidad de Chascomús, que habían sobrevivido a intensas sequías y fuertes heladas. Trabajos previos, sobre estos materiales, mostraron variabilidad para estrés por salinidad, pero se desconocían cuáles eran los mecanismos fisiológicos involucrados.

En el inicio de esta investigación, la población de materiales de *P. coloratum* presentó menor crecimiento vegetativo en presencia de salinidad respecto al control no expuesto a salinidad. Se planteó como primer objetivo específico en el segundo capítulo determinar tolerancia a salinidad en materiales de *P. coloratum* sobrevivientes a sequía y heladas en condiciones de campo, y en el cultivar comercial 'Klein'. Respecto de este objetivo, los materiales colectados en presencia de salinidad presentaron mayor tasa de crecimiento relativo que el cultivar comercial 'Klein' de la misma especie. Además, se observó variabilidad en el crecimiento entre materiales colectados en presencia de salinidad.

En esta investigación se planteó caracterizar la tolerancia a helada y alcalinidad en materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* con crecimiento diferencial en condiciones de salinidad; de acuerdo a esto,

- En general, la alcalinidad no alteró la tasa de crecimiento de los materiales colectados de *P. coloratum*. Sin embargo, en algunos materiales, la presencia de salinidad junto a alcalinidad afectó aún más la tasa de crecimiento respecto a ambos estreses por separado.
- Entre materiales de *P. coloratum*, se identificó que la exposición de bajas temperaturas de tipo sub-óptimas no indujeron cambios en el potencial osmótico, acumulación de azúcares totales y prolina. Sin embargo, se identificaron diferencias en el daño de membrana luego de la aplicación de

helada. Por lo que, para explicar las diferencias en tolerancia a helada entre materiales, se propone evaluar otras respuestas, entre ellas, cambios estructurales en la membrana luego de la aclimatación al frío.

El tercer objetivo específico fue el de evaluar la actividad fotosintética, la acumulación foliar de Na^+ , K^+ , así como de compuestos osmocompatibles, y la actividad antioxidante de materiales de *P. coloratum* cultivados en presencia o ausencia de salinidad. Respecto a dicho objetivo específico, se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

- Los caracteres fisiológicos entre materiales de tolerancia contrastante a salinidad, tales como, potencial osmótico y CRA no mostraron diferencias. Esto indicó que el ajuste osmótico no sería el causal de las diferencias en crecimiento de los materiales de *P. coloratum* en condiciones de salinidad.
- Asimismo, los materiales de *P. coloratum* presentaron similar acumulación de sacarosa, prolina y glicina-betaína en presencia de salinidad.
- Por otra parte, los materiales de *P. coloratum* con tolerancia contrastante a la presencia de 200 mM NaCl, presentaron diferencias en la concentración de K^+ en vaina/lámina de la última hoja totalmente expandida respecto al control. El material susceptible presentó menor concentración de K^+ en vaina/lámina en presencia de salinidad respecto a la ausencia de esta condición. Diferente a lo observado en el material tolerante a salinidad.
- Se observó una correlación positiva de la tolerancia diferencial a la salinidad en *P. coloratum*, respecto al incrementó la actividad de la enzima antioxidante SOD a las 24 h de exposición a 200 mM NaCl. Esta se propone como la responsable de las diferencias posteriores en crecimiento entre materiales en presencia de salinidad.

- Por otro lado, el agregado de buffer alcalino a la solución salina, no alteró la concentración de Na^+ en materiales de tolerancia contrastante a la salinidad, así como tampoco se modificó la concentración de K^+ .
- Finalmente, no se identificaron diferencias entre el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila y la tolerancia diferencial a la salinidad entre materiales de *P. coloratum*.

Por último, de acuerdo a los objetivos específicos del tercer capítulo: Determinar si existe variabilidad entre materiales de *P. coloratum* para el crecimiento en salinidad en condiciones de campo, además de estimar parámetros genéticos en una población base a través del estudio de familias de medios hermanos de *P. coloratum* y predecir el avance genético que se obtendría de realizar una selección con una intensidad del 15 %.

- Se determinó que se obtendrían escasos avances genéticos para la gran mayoría de las variables de crecimiento, de realizarse selección en la población en estudio de *P. coloratum*. Dicha afirmación fue determinada en condiciones tanto de presencia como en ausencia de salinidad. Los bajos valores de varianza genética aditiva estimadas en la población podrían deberse, entre otras causas, a las condiciones de crecimiento en el lugar donde fueron colectados los materiales, lo cual podría haber ocasionado reducciones en la varianza genética y fenotípica y consecuentemente bajos valores de heredabilidad. Esto a su vez explicaría los valores mínimos de avance que se esperarían de realizar selección para aumentar la tolerancia a la salinidad en esta población.
- No se detectaron diferencias significativas entre familias de medios hermanos de *P. coloratum* cuando las plantas crecieron en condiciones de salinidad. Se propone que lo anterior se debería a bajos niveles de variación genética entre las familias para dichas características.

ANEXOS

Anexo cap 2. Tabla 1. Materiales usados en ensayos I y II de tolerancia a helada por etapas.

Distribución de salinidad		Etapas I		Etapas II		Etapas III	
		Salinidad					
		0.2 M	0 M	0.2 M	0 M	0.2 M	0 M
Ensayo I	Uniforme	2 y 3	2 y 3	4, 16 y 3	4, 16 y 3	14 y 15	14 y 15
Ensayo II	Azar	2, 16 y 3	2, 16 y 3	14, 4 y 8	14, 4 y 8	15 y Klein	15 y Klein

Anexo cap 2 Tabla 2. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en presencia y ausencia de salinidad (200 mM NaCl) (T) y su interacción, en las siguientes variables de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA), número de hojas (NH), número de macollos (NM), tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de aparición de hojas GD (TAH) y tasa de aparición de macollos (TAM).

	p-valor					
	PSA	NH	NM	TCR	TAH	TAM
Materiales (M)	<0,0001	0,1444	<0,0001	0,0036	0,0022	0,0091
Tratamiento (T)	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
M y T	<0,0001	0,0043	0,3353	<0,0001	0,0067	0,0566

Nota: Repeticiones por material n=8. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla 3. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M) en presencia de salinidad respecto al control (200 mM NaCl) y su interacción, en las variables de crecimiento vegetativo: % peso seco aéreo (% PSA), % número de hojas (%NH), % número de macollos (% NM), % tasa de crecimiento relativo (% TCR), % tasa de aparición de hojas GD (% TAH) y % tasa de aparición de macollos (%TAM).

	p-valor					
	PSA	NH	NM	TCR	TAH	TAM
Material (M)	<0,0001	<0,0001	0,0721	<0,0001	<0,0001	0,0397

Nota: Repeticiones por material n=8. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla 4. Probabilidad de que el % daño de membrana sea igual entre materiales de *P. coloratum* (M), con y sin el agregado de 200 mM NaCl (T) y su interacción, luego del estrés por helada.

	p-valor
	% daño de membrana
Material (M)	0,0666
Tratamiento (T)	0,0548
M y T	0,0441

Nota: Repeticiones por material en tratamientos, salinidad n=10 y ausencia de salinidad n=8. Valores de $p > 0,05$ indica diferencias no significativas.

Anexo cap 2 Tabla 5. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en tratamientos control, 200 mM NaCl, alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + 200 mM NaCl y su interacción en las variables de crecimiento vegetativo: Peso seco aéreo (PSA), número de macollos (NM), número de hojas (NH), tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de aparición de hojas GD (TAH), tasa de aparición de macollos (TAM), eficiencia del FII (EF II) y % de daño de membrana (% Daño).

	p-valor						
	PSA	NM	NH	TCR	TAH	TAM	FSII
Mat (M)	0,0714	0,012	0,0002	<0,0001	0,0969	0,2438	0,4912
Trat (T)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,4852
M y T	0,1896	0,7323	0,194	0,0089	0,0271	0,1089	0,6216

Nota: Repeticiones por material y tratamiento, control n=5; pH 9n=8; pH 9 + 200 mM NaCl n=8 y 200 mM NaCl n=8. Valores de p>0,05 indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla 6. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en tratamientos referidos al control (T): 200 mM NaCl/control, alcalinidad/control; alcalinidad + 200 mM NaCl/alcalinidad y su interacción, en las variables de crecimiento vegetativo: % Peso seco aéreo (% PSA), % número de macollos (% NM), % número de hojas (% NH), % tasa de crecimiento relativo (% TCR), % tasa de aparición de hojas GD (% TAH) y % tasa de aparición de macollos (% TAM).

	% control						
	p-valor						
	PSA	NM	NH	TCR	TAH	TAM	
Material (M)	0,171	0,0001	<0,0001	0,0325	0,0096	0,0445	
Tratamiento (T)	<0,0001	<0,0001	0,0032	<0,0001	<0,0001	0,0203	
M y T	0,7289	0,8741	0,831	0,0121	0,0746	0,5788	

Nota: Repeticiones por material y tratamiento n=8. Valores de p>0,05 indican diferencias no significativas para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla 7. Probabilidad de que el contenido relativo de agua (CRA) y contenido de proteínas corregido por CRA (mg de proteína/g PF) sean iguales entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en tratamientos control y 200 mM NaCl (T) y su interacción.

	p-valor		
	CRA	Proteína	Proteína corregido CRA
Material (M)	0,2181	<0,0001	0,0048
Tratamiento (T)	0,0387	0,0161	0,0028
M y T	0,7413	<0,0001	0,0282

Nota: Repeticiones por material n=3. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla 8. A. Probabilidad que los resultados sean iguales para los diferentes criterios de clasificación y su interacción, en parámetros de fluorescencia de la clorofila cuantificados a las 24 de aplicado diferentes niveles de salinidad y a los 7 días de aplicado el nivel superior de salinidad. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable. B. Probabilidad que los resultados sean iguales en parámetros de fluorescencia de la clorofila en la condición 0-50 mM NaCl por criterio de clasificación. C. Probabilidad que los resultados sean iguales en la condición 0-100 mM NaCl por criterio de clasificación. D. Probabilidad que los resultados sean iguales en la condición 0-200 mM NaCl a las 24 h de aplicado este nivel de salinidad, por criterio de clasificación. E. Probabilidad que los resultados sean iguales en la condición 0-200 mM NaCl a los 7 días de aplicado este nivel de salinidad, por criterio de clasificación.

A.

	p-valor						
	0- 50 mM NaCl (24 h)						
	Fv/Fm	Vj	ABS/Rc	Dio/Rc	Tro/Rc	Eto/Rc	Pi abs
Material (M)	0,0826	0,4110	0,0001	0,0001	0,0001	<0,0001	0,3050
Trat (T)	0,0252	0,2140	0,2220	>0,9999	0,1200	0,8750	0,4800
M y T	0,2349	0,5450	0,4360	0,4170	0,5400	0,1290	0,8840
	0- 100 mM NaCl (24 h)						
Material (M)	0,0347	0,9190	0,0160	0,0130	0,0230	0,0003	0,1240
Trat (T)	0,5426	0,0040	0,7010	0,6230	0,7770	0,0004	0,0480
M y T	0,6973	0,8030	0,9160	0,7410	0,9890	0,7310	0,7530
	0- 200 mM NaCl (24 h)						
Material (M)	0,1733	0,0001	0,0650	0,1040	0,0460	0,0020	0,7330
Trat (T)	0,4151	0,8910	0,9720	0,7370	0,7760	0,8190	0,6260
M y T	0,5956	0,1140	0,9450	0,8150	0,7160	0,3470	0,4360
	0- 200 mM NaCl (7 días)						
Material (M)	0,2100	0,1840	0,1260	0,7070	0,2800	0,3490	0,2450
Trat (T)	0,4608	0,0002	0,3870	0,3790	0,2000	0,3110	0,0140
M y T	0,3233	0,5940	0,0910	0,5260	0,2400	0,0730	0,7340

B.

0 - 50 mM NaCl (24 h)

Material	Medias	E.E.		
Vj				
15	1,3900	0,0200	A	
4	1,2000	0,0200		B
Dio/				
15	0,3200	0,0100	A	
4	0,2700	0,0100		B
Tro/Rc				
15	1,0700	0,0200	A	
4	0,9400	0,0200		B
Eto/Rc				
15	0,6100	0,0100	A	
4	0,5100	0,0100		B
Trat				
	Medias	E.E.		
fv/fm				
0	0,7800	0,0023	A	
50	0,7700	0,0023		B

C.

0- 100 mM NaCl (24 h)

Material	Medias	E.E.		
ABS/Rc				
15	1,6500	0,0800	A	
4	1,3700	0,0700		B
Dio/Rc				
15	0,4000	0,0300	A	
4	0,3000	0,0200		B
Tro/Rc				
15	1,2500	0,0500	A	
4	1,0700	0,0500		B
Eto/Rc				
15	0,6800	0,0200	A	
4	0,5800	0,0100		B
fv/fm				
15	0,7600	0,0100		B
4	0,7800	0,0100	A	
Trat				
	Medias	E.E.		
Vj				

0	0,4900	0,0200	A	
100	0,4000	0,0200		B
Trat	Medias	E.E.		
Piabs				
0	2,5100	0,3500		B
100	3,6200	0,3800	A	
Eto/Rc				
0	0,5800	0,0100		B
100	0,6800	0,0200	A	

D.

0- 200 mM NaCl (24 h)

Material	Medias	E.E.		
Vj				
15	0,4000	0,0100	A	
4	0,3200	0,0100		B
Tro/Rc				
15	1,2300	0,0700		B
4	1,4400	0,0700	A	
Eto/Rc				
15	0,7400	0,0400		B
4	0,9800	0,0500	A	

E.

0- 200 mM NaCl (7 días)

Trat	Medias	E.E.		
Vj				
0	0,4200	0,0100	A	
200	0,3500	0,0100		B
Piabs				
200	4,8300	0,3400	A	
0	3,4500	0,3600		B

Nota: materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M) y tratamientos de salinidad (T) 0, 50, 100 y 200 mM NaCl. Letras diferentes indican diferencias significativas según LSD Fisher.

Anexo cap 2 Tabla 9. Probabilidad de que los resultados sean iguales para el potencial osmótico, concentración de azúcares solubles totales y prolina entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en condiciones de ausencia o presencia de 200 mM NaCl (S), aclimatadas o no al frío (F) y su interacción.

	p-valor		
	Potencial osmótico	Azúcares	Prolina
Material (M)	0,1361	0,0176	0,0106
Aclimatación al Frío (F)	0,2525	0,179	0,4309
Salinidad (S)	0,0001	0,0001	<0,0001
S y F	0,2523	0,2347	0,0023
M y S	0,9009	0,5736	0,1469
F y M	0,9434	0,2669	0,253
S y F y M	0,823	0,1247	0,287

Nota: Repeticiones por material n=3. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla10. Probabilidad de que las concentraciones de prolina y glicina-betaína sean iguales entre materiales de *P. coloratum* var. *coloratum* (M), en tratamientos de ausencia de estrés, 200 mM NaCl, pH 9 y pH 9 + 200 mM NaCl (T) y su interacción.

	p-valor	
	Prolina	Glicina-betaína
Material (M)	0,647	0,8289
Tratamiento (T)	<0,0001	<0,0001
M y T	0,2568	0,2581

Nota: Repeticiones por material y tratamiento, control n=5, 200 mM NaCl n= 8, pH 9 n=8 y pH 9 + 200 mM NaCl n=8. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla 11. Probabilidad de que la concentración de iones K^+ y Na^+ , en las secciones lámina y vaina sean iguales entre materiales de *P. coloratum* (M), en condiciones de (T) ausencia de estrés, presencia de: 200 mM NaCl, alcalinidad (pH 9), alcalinidad + 200 mM NaCl (pH 9 + 200) y su interacción.

	p-valor			
	Lámina		Vaina	
	Na^+	K^+	Na^+	K^+
Material (M)	0,0929	0,1517	0,6281	0,0027
Tratamiento (T)	0,0311	0,0103	0,5255	0,0953
M y T	0,1693	0,6311	0,6783	0,3544

Anexo cap 2 Tabla 12. Probabilidad de que los resultados sean iguales entre materiales 4 y 15 de *P. coloratum* (M) en tratamientos de ausencia de estrés, salinidad (200 mM NaCl), alcalinidad (pH 9) y alcalinidad + salinidad (pH 9 + 200 mM NaCl) y su interacción, para los iones Na^+ y K^+ en la relación vaina/lámina.

	p-valor	
	Vaina/ lamina	
	Na^+	K^+
Material (M)	0,3492	0,0009
Tratamiento (T)	0,1279	0,1197
M y T	0,2907	0,0001

Nota: Repeticiones por material n=3. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.

Anexo cap 2 Tabla 13. Análisis OJIP usando los datos de la fase rápida de emisión de fluorescencia.

Parámetros Técnicos	
Fluorescencia a 50 us	F _o
Fluorescencia máxima	F _m
Fluorescencia variable a 2ms	F _v : F _m -F _o
Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)	
Absorción por RC	ABS/RC : (M _o /V _j)/(1-F _o /F _m)
Atrapamiento por RC	TR _o /RC : M _o / V _j : (A B S
Disipación por RC	DI _o /RC : (ABS/RC) - (TR _o /RC)
Transporte electrónico por RC	ET _o /RC : (T R o / R C) φ c
Índice	
Índice de funcionamiento	PI _{ABS} : [R C / A B S -] φP o [φo/ 1-φo]

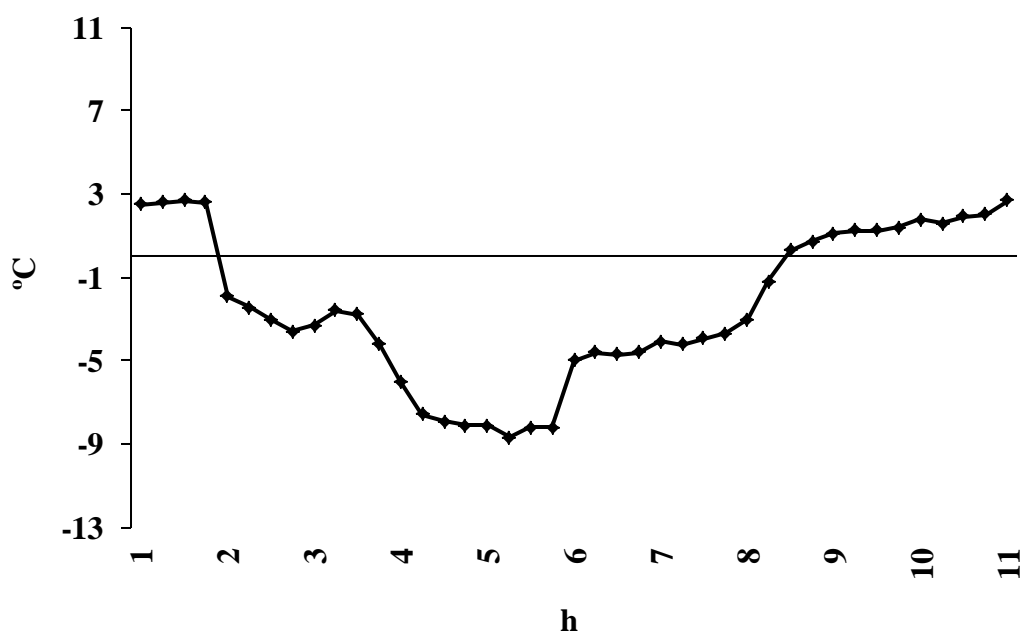
Anexo cap 3 Tabla 1. Apreciación de matas de *P. coloratum* var. *coloratum* en Chascomús 20/11/15 por material.

Material	Características de matas
1	Erecta, tallo grueso, con flor
2	Foliosa, petisa, con flor inicial
3	Foliosa, abierta, con flor
4	Rala, con flor tardía
5	Foliosa, petisa, con flor inicial
6	Rala, tallo grueso, con flor tardía
7	Foliosa, con flor inicial
8	Rala, abierta, con flor tardía
9	Rala, abierta
10	Rala, flor inicial
11	Algunas ralas, algunas foliosas, con flor
12	Foliosa, con flor inicial
13	Algunas ralas, algunas foliosas, con flor inicial
15	Rala, con flor inicial
16	Foliosa, abierta, con flor

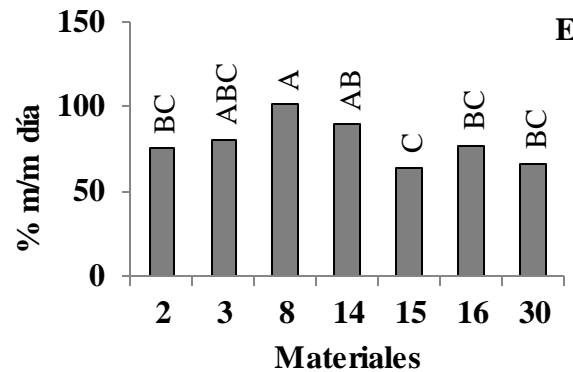
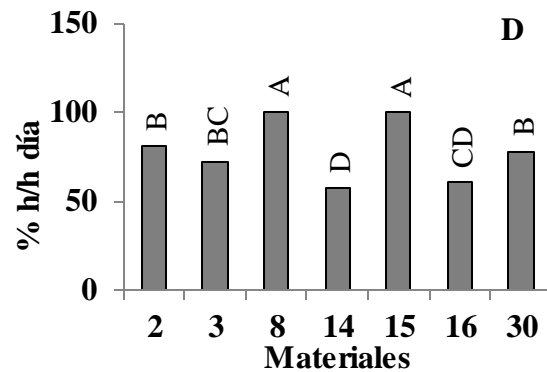
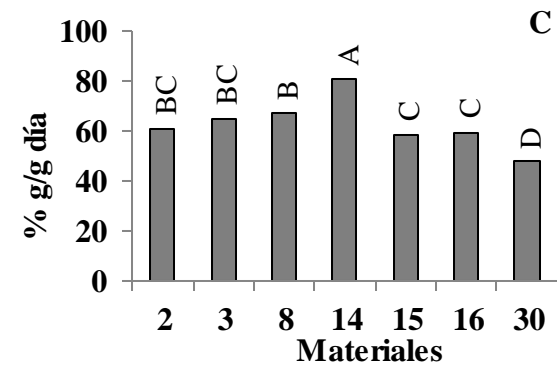
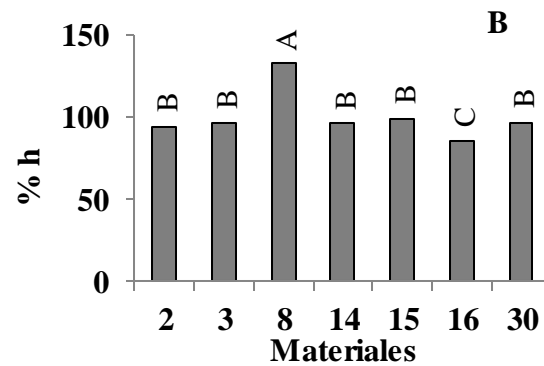
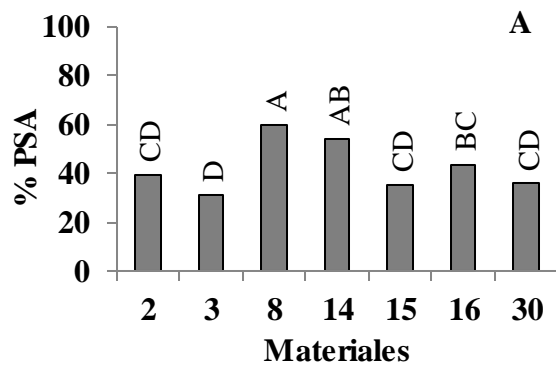
Anexo cap 3 Tabla 2. Probabilidad de que los resultados sean iguales para familias de medios hermanos, particionado por tratamiento, en las siguientes variables de crecimiento vegetativo: peso seco aéreo (PSA); número de hojas (NH); número de macollos (NM); tasa de aparición de hojas GD (TAH), tasa de aparición de macollos (TAM).

Familia de medios hermanos	p valor				
	0				
	PSA	TAH	TAM	NH	NM
	0,0382	0,0376	0,1605	0,5691	0,6148
Familia de medios hermanos	200				
	0,3401	0,2721	0,276	0,3583	0,3706

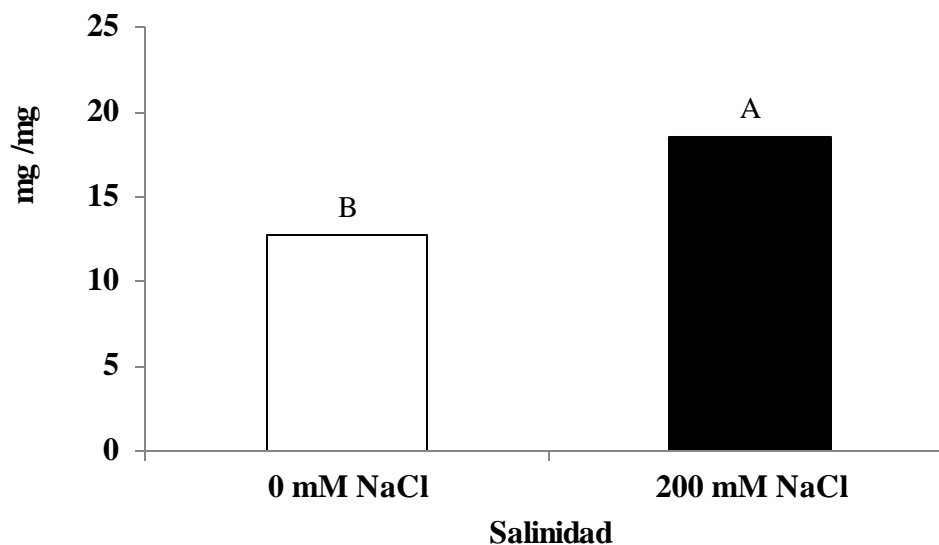
Nota: Repeticiones por familia de medios hermanos $n = 14$. Valores de $p > 0,05$ indican diferencias no significativas entre tratamientos para cada variable.



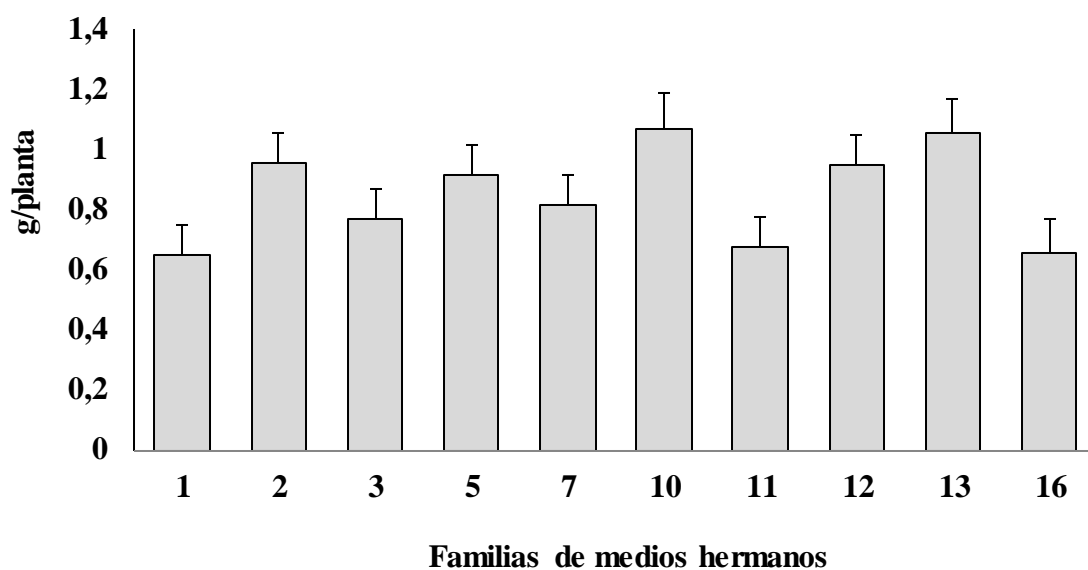
Anexo cap 2 Figura 1. Dinámica de descenso de temperatura por hora en helada.



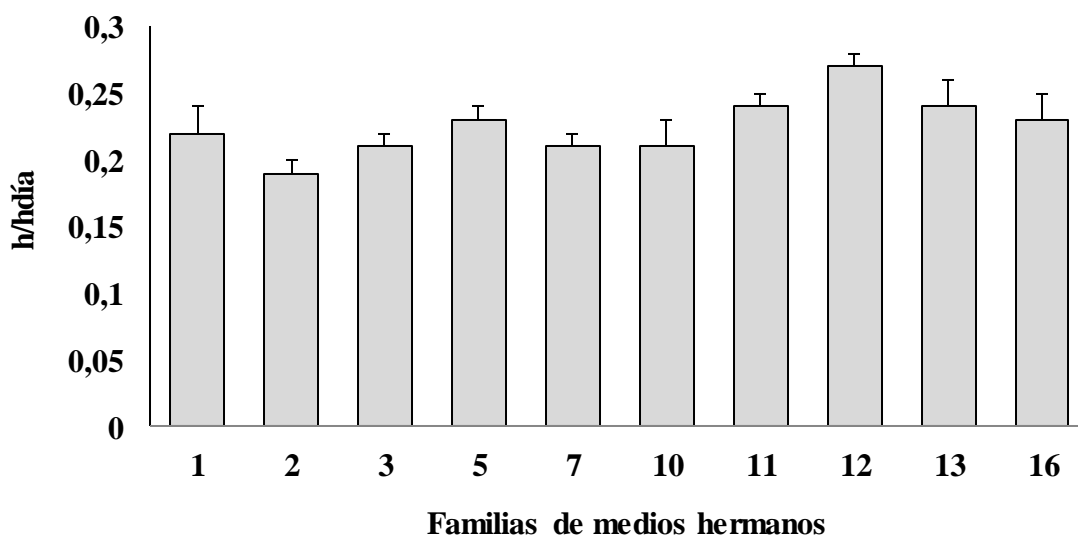
Anexo cap 2 Figura 2. Tolerancia a la salinidad sobre diversas variables de crecimiento en materiales de *P. coloratum* var *coloratum* y el cultivar 'Klein' y su porcentaje respecto a la condición no salina. En cada panel, las barras indican medias de las variables, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según test LSD. Variables por recuadro: A. % Peso seco aéreo (% PSA), B. % número de hojas por planta (% NH), C. % Tasa de crecimiento relativa por día (% g/g día), D. % Tasa de aparición de hojas medida en día (% h/h día) y E. % Tasa de aparición de macollos medida por día (% m/m día).



Anexo cap 2 Figura 3. Concentración de azúcares solubles totales en base al PF en presencia y ausencia de 200 mM NaCl, en macollos de materiales 2, 3, 4, 14 y 15 de *P. coloratum* de plantas aclimatadas y no aclimatadas al frío. Repeticiones por tratamiento n=5. Las barras indican valores medios. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según LSD.



Anexo cap 3 Figura 1. Acumulación de materia seca por familias de medios hermanos en ausencia de estrés por salinidad. Repeticiones por material n=13. Las barras indican medias y EE.



Anexo capítulo 3. Figura 2. Tasa relativa de aparición de hojas (h/h día) en familias de medios hermanos, en ausencia de estrés. Repeticiones por material n= 13. Las barras indican medias y EE (n=13).

BIBLIOGRAFIA

- Abdelgawad, Z., Khalafaallah, A. Abdallah, M.** (2014). Impact of methyl jasmonate on antioxidant activity and some biochemical aspects of maize plant grown under water stress condition. *Agricultural Sciences*, **5 (2)**: 1077-1088.
- Adams, P., Thomas, J. C., Vernon, D. M., Bohnert, H. J., Jensen, R. G.** (1992). Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol*, **33 (8)**:1215–1223
- Aebi, H.** (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, **105**: 121–126.
- Ahmad, M. S. A., Ashraf, M., Ali, Q.** (2010). Soil salinity as a selection pressure is a key determinant for the evolution of salt tolerance in Blue Panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **205 (1)**: 37-45.
- Ahmad, P., John, R., Sarwat, M., Umar, S.** (2012). a. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*, **2 (4)**: 353-366.
- Ahmad, P., Azooz, M. M., Prasad, M. N. V.** (2012). *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer Science & Business Media. London.
- Al-Khatib, M., Mcneilly, T., Collins, J. C.** (1993). The potential of selection and breeding for improved salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, **65 (1)**: 43–51
- Allen, S. K., Dobrenz A. K., Schonhorst, M. H., Stoner, J. E.** (1985): Heritability of NaCl tolerance in germinating alfalfa seeds. *Agronomy Journal*, **77 (1)**: 99-101.
- Alscher, R. G., Hess, J. L.** (1993). *Antioxidants in higher plants*. Boca Raton: CRC Press.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L. S.** (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53 (372)**: 1331–1341.
- Apel, K., Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 373–399
- Araújo, M. R. A., Coulman, B. E.** (2002). Genetic variation, heritability and progeny testing in meadow bromegrass. *Plant Breeding*, **121 (5)**: 417-424.
- Armando, L. V., Carrera, A. D., Tomas, M. A.** (2013). Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **60 (5)**: 1737–1747.
- Ashraf, M., McNeilly, T.** (1989). Effect of salinity on some cultivars of maize. *Maydica*, **34**: 179–189.
- Ashraf, M., Mc Neilly, T., Bradshaw, A. D.** (1986). Tolerance of sodium chloride and its genetic basis in natural population of four grass species. *New Phytologist*, **103 (4)**: 725-734.
- Ashraf, M.** (1994). Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. *Biologia Plantarum*, **36 (2)**: 255–259
- Ashraf, M. Y., Wu, L.** (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **13 (1)**: 17-42.
- Ashraf, M.** (2002). Salt tolerance of cotton: some new advances. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21 (1)**: 1-30.
- Ashraf, M.** (2002). a. Exploitation of genetic variation for improvement of salt tolerance in spring wheat. In: *Prospects for saline agriculture*. Springer Netherlands. pp 113-121
- Ashraf, M.** (2004). *Flora Review* Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **199 (5)**: 361-376.
- Ashraf, M., Harris, P. J. C.** (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance

- in plants. *Plant science*, **166** (1): 3-16.
- Ashraf, M., Foolad, M. R.** (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, **59** (2): 206–216.
- Badawi, G.H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kubo, A., Tanaka, K.** (2004). Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum*, **121** (2): 231–238.
- Ball, M.** (1988). Ecophysiology of mangroves. *Trees*, **2** (3): 129–142.
- Bannister, W. H., Bannister, J. V., Barra, D., Bond, J., Bossa, F.** (1991). Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copperzinc enzyme. *Free Radical Research Communications*, **12–13**: 349–361
- Barnett, N. M., Naylor, A. W.** (1966). Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology*, **41** (7): 1222–1230.
- Bartels, D., Sunkar, R.** (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24** (1): 23–58.
- Bates, C. J., Prynne, C. J., Levene, C. I.** (1972). Ascorbate-dependent differences in the hydroxylation of proline and lysine in collagen synthesized by 3T6 fibroblasts in culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **278** (3): 610-616.
- Beauchamp, C.O., Fridovich, I.** (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, **317** (1): 50-64.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarai, T.** (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, **32** (3): 501–510.
- Belkhodja, B. R., Morales, F., Abadia, A., Gomez-Aparisi, J., Abadia, J.** (1994). Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology*, **104** (2): 667-673.
- Benzie, I. F., Strain, J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a antioxidant capacity measure: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239** (1): 70–76.
- Blum, A.** (1988). *Plant breeding for stress environments*. Boca Raton, Florida, pp 223.
- Blumwald, E.** (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current opinion in cell biology*, **12** (4): 431-434.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Shabala, S.** (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **65** (5): 1241–1257.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., Asada, K.** (1994). Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, **13** (3): 199–218
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2): 248-254.
- Brestic, M., Zivcak, M.** (2013). PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In *Molecular stress physiology of plants*. Chapter 4. Springer India. pp 87-131.
- Briske, D. D.** (1986). Plant response to defoliation: morphological considerations and allocation priorities. In: *Rangelands: a resource under siege*. Joss, P. J. Lynch P. W. William P. B. eds. pp 426-427.
- Briske, D. D.** (1991). Developmental morphology and physiology of grasses. In: *Grazing management: an ecological perspective*. Timber Press, Portland, OR. pp 85-108.
- Bromham, L., Saslis-Lagoudakis, C. H., Bennett, T. H., Flowers, T. J.** (2013). Soil alkalinity and salt tolerance: adapting to multiple stresses. *Biology Letters*, **9** (5): 642.

- Brown, P. W., Tanner C. B.** (1981). Alfalfa water potential measurement: a comparison of the pressure chamber and leaf dew-point hygrometers. *Crop Science*, **21**:240-244.
- Brugnoli, E. Lauteri, M.** (1991). Effects of Salinity on Stomatal Conductance, Photosynthetic Capacity, and Carbon Isotope Discrimination of Salt-Tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and Salt-Sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 Non-halophytes. *Plant Physiology*, **95** (2): 628-635.
- Bui, E.** (2013). Possible role of soil alkalinity in plant breeding for salt-tolerance. *Biology letters*, **9** (5): 566
- Brummer, E. C., Casler, M. D.** (2009). Improving selection in forage, turf, and biomass crops using molecular markers. In *Molecular breeding of forage and turf* Springer New York. pp. 193-210.
- Buol, S. W., Southard, R. J., Graham, R. C., McDaniel, P. A.** (2011). US soil taxonomy. *Soil Genesis and Classification, Sixth Edition*. Chapter 7, pp 207-232.
- Burkart, S. E., Garbulsky, M. F., Ghera, C. M., Guerschman, J. P., León, J. C. R., Oosterheld, M., Paruelo, J. M. Perelman, S. B.** (2005). Las comunidades potenciales del pastizal pampeano bonaerense. En: *La Heterogeneidad de la Vegetación de los Agroecosistemas*. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. pp 430.
- Bhutta, W. M., Hanif, M.** (2008). Variation and heritability of sodium chloride tolerance in spring wheat at early stage of plant development. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **39** (19-20): 2785 -2794.
- Cai, Q., Wang, S., Cui, Z., Sun, J., Ishii, Y.** (2004). Changes in Freezing Tolerance and its Relationship with the Contents of Carbohydrates and Proline in Overwintering Centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* Munro Hack.). *Plant Production Science*, **7** (4): 421-426.
- Carr, B. C.** 2014. Plant Guide for Kleingrass (*Panicum coloratum* L.). USDA-Natural Resources Conservation Service, James E. “Bud” Smith Plant Materials Center, Knox City, TX, 79529.
- Casal, J. J. Deregibus, V. A. Sanchez, R. A.** (1985). Variation in tiller dynamics and morphology in *Lotium muttflorum* Lam. vegetative and reproductive plants as affected by differences in red/far-red irradiation. *Annals of Botany*, **56** (4): 553-559.
- Castelli, S. L., Grunberg, K., Muñoz, N., Griffa, S., Colomba, E. L., Ribotta, A., Biderbost, E., Luna, C.** (2010). Oxidative damage and antioxidant defenses as potential indicators of salt-tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **205** (9): 622-626.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A., Stanca, A. M.** (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, **105** (1): 1-14.
- Cauhepé, M. A. Hidalgo, L. G.** (2005). La Pampa Inundable, el uso ganadero como base de la sustentabilidad social, económica y ambiental. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, pp 430.
- Chaneton, E. J., Lemcoff, J. H. Lavado, R. S.** (1996). Nitrogen and phosphorus cycling in grazed and ungrazed plots of a temperate subhumid grassland in Argentina. *Journal of Applied Ecology*, **33** (2): 291-302.
- Chaparzadeh, N.; Khavari-Nejad, R. A.; Navari-Izzo, F. Izzo, A.** (2003). Water relations and ionic balance in *Calendula officinalis* L. under salinity conditions. *Agrochimica*, **47** (1-2): 69-79
- Chen, H., Jiang, J. G.** (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental

- changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, **18**: 309-319.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. K., Sunkar, R.** (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology*, **639**: 39-55.
- Chung, J. S., Zhu, J. K., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., Shi, H.** (2008). Reactive oxygen species mediate Na⁺-induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **53** (3): 554-565.
- Cook B. G., Pengelly, B. C., Brown, S. D., Donnelly, J. L., Eagles, D. A., Franco, M. A., Hanson, J., Mullen, B. F., Partridge, I. J., Peters, M. Schultz, R.** (2005). Tropical forages: an interactive selection tool [CD-ROM]. Brisbane, Australia: CSIRO Sustainable Ecosystems, Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), International Livestock Research Institute (ILRI).
- Costa, P. H. A., Dias Dias de Azevedo Neto, A., Bezerra, M. A., Prisco, J. T.** (2005). Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17** (4): 353–361.
- Cram, W. J.** (1976). Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume, and nutrient supply. In: *Transport in Plants II*. Luttge, U. Pitman, M. G., Eds. Springer Berlin, pp 284.
- Cramer, G. R.** (2002). Response of abscisic acid mutants of Arabidopsis to salinity. *Functional Plant Biology*, **29** (5): 561–67
- Davenport, R., James, R.A., Zakrisson-plogander, A., Tester, M., Munns, R.** (2005). Control of Sodium Transport in *Durum Wheat*. *Plant Physiology*, **137** (3): 807–818.
- De Lacerda, C. F., Cambraia, J., Oliva, M. A., Ruiz, H. A., Prisco, J. T.** (2003). Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, **49** (2): 107-120
- De Luca M., Seffino L. García, Grunberg K., Salgado M., Córrdoba A., Luna C., Ortega L., Rodríguez A., Castagnaro A., Taleisnik E.** (2001). Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar. *Australian Journal of Agricultural Research*, **52** (9): 903-910.
- Deregibus, V. A., Sanchez, R. A. Casal, J. J.** (1983). Effects of height quality on tiller production in *Lotium* spp. *Plant Physiology*, **72** (3): 900-912.
- Di Nucci de Bedendo, E., Spada, M. del C., Sevilla, G. H., Valentinuz, O. R.** (2011). Crecimiento de alfalfa en tres ambientes de la región centro de Argentina. AAPA. Balcarce. AR. Revista Argentina de Producción Animal, **31** (1): 90.
- Di Rienzo, J. Di, Macchiavelli, R., Casanoves, F.** (2010). Modelos mixtos en Infostat. Cordoba, Argentina, Editor. Brujas
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., M., B., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.** (2013). InfoStat versión 2013.
- Dudley, J., Moll, R.** (1969). Interpretation and use of estimates of heritability and genetics variances to plant breeding. *Crop Science*, **9** (3): 257–262.
- Ellouzi, H., Ben Hamed, K., Cela, J., Munné-Bosch, S., Abdelly, C.** (2011). Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiologia Plantarum*. **142** (2): 128-143.
- Empig, L. T.; Gardner, C. O., Compton, W. A.** (1972). Theoretical gains for different population improvement procedures. Lincoln, Nebraska: Agric. Exp. Stn. Bull. 26. pp 22.
- Falconer, D. S.** (1981). Introduction to quantitative genetics. New York: Longman Stapf. *Grass and Forage Science*, **70** (4): 695-704

- Falest, F. W.** (1951). The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, **193** (1): 113-124.
- Ferrari Usandizaga, S. C., Brugnoli, E. A., Weiss, A. I., Zilli, A. L., Schedler, M., Pagano, E. M., Acuña, C. A.** (2015). Genetic and morphological characterization of *Acroceras macrum* Stapf. *Grass and Forage Science*, **70** (4): 695-704.
- Ferri, C.M., Brizuela, M.A., Cid, M.S., Stritzle, N. P.** (2006). Dinámica De Acumulación De Láminas Foliares Y Estructura Del Forraje Diferido De *Panicum coloratum* L. **66**: 1–8.
- Flowers, T. J., Troke, P. F., Yeo, A. R.,** (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, **28** (1): 89-121.
- Flowers, T. J., Hajibagheri, M. A., Yeo, A. R.** (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell and Environment*, **14** (3): 319-325.
- Foyer, C. H., Noctor, G.** (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, **28** (8): 1056–1071.
- Fricke, W., Peters, W. S.** (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology*, **129** (1): 374–88
- Fry, J. D., Lang, N. S. Clifton, G. P.** (1991). Freezing resistance and carbohydrate composition of 'bratam' S t. A ugustinegrass. *H ortS ciencia* **26** (12): 1537-1539.
- Gholizadeh, A., Kohnehrouz, B. B.** (2010). Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt-challenged maize leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **22** (4): 217–223.
- Gilmour, A.R., Cullis, B.R., Verbyla, A.P., Verbyla, A. P.** (1997). Accounting for natural and extraneous variation in the analysis of field experiments. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, **2** (3): 269 -293.
- Gilmour, S. J. Zarka, D. G. Stockinger, E. J. Salazar, M. P. Houghton, J. M. Thomashow, M. F.** (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal*, **16** (4): 433–442.
- Giordano, M., Bertone, G., Tomas, M.** (2013). Selection by seed weight improves traits related to seedling establishment in *Panicum coloratum* L. var. *makarikariense*. *Plant Breeding*, **132** (6): 620-624.
- Greenway, H., Munns, R.** (1980). Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of Plant Physiology*, **31** (1) : 149–190
- Greenway, H., Munns, R.** (1983). Interactions between growth, uptake of Cl⁻ and Na⁺, and water relations of plants in saline environments. II. Highly vacuolated cells. *Plant, Cell and Environment*, **6** (7): 575-589.
- Grieve, C. M., Grattan, S. R.** (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, **70** (2): 303-307.
- Gong, Q., Li, P., Ma, S., Indu Rupassara, S., Bohnert, H. J.** (2005). Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **44** (5): 826–839.
- Gupta, B., Huang, B.** (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics*. Vol 2014.
- Guy, C. L.** (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual review of plant biology*, **41** (1): 187–223.
- Hallauer, A. R., Miranda, J. B.** (1981). Quantitative genetics in maize breeding. In

Maize. Springer USA. pp 3-98

- Hamrick, J. L., Godt, M. W., Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L., Weir, B. S.** (1990). Allozyme diversity in plant species. In Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates Inc. pp 43-63.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R., Zhu, J.-K., Bohnert, H.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **51** (1): 463–499.
- Hefny, M., Abdel-Kader, D. Z.** (2009). Antioxidant-enzyme system as selection criteria for salt tolerance in forage sorghum genotypes (*Sorghum bicolor* L. Moench). In Salinity and Water Stress. Springer Netherlands pp 25-36.
- Hernandez, J. A., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Río, L. A., Sevilla, F.** (1993). Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. Physiologia Plantarum, **89** (1): 103–110.
- Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., del Río, L. A.** (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. Plant Science, **105** (2): 151–167.
- Hernandez, J. A., Almansa, M. S.** (2002). Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. Physiologia Plantarum, **115** (2): 251–257.
- Hill, R. R.** (1977). Quantitative genetics of forages: potentials and pitfalls. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomists.
- Hsiao, T. C.** (1973). Plant responses to water stress. Annual review of plant physiology, **24** (1): 519-570.
- Hisano, H., Kanazawa, A., Kawakami, A., Yoshida, M., Shimamoto, Y., Yamada, T.** (2004). Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. Plant science, **167** (4): 861-868..
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I.** (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, 2nd edit. **347**: 1–32.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., Prange, R. K.** (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, **207** (4): 604-611.
- Imaz, J. A., Giménez, D. O., Grimoldi, A. A., Striker, G. G.** (2013). The effects of submergence on anatomical, morphological and biomass allocation responses of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum* at seedling stage. Crop and Pasture Science, **63** (12): 1145-1155
- Imaz, J., Giménez, D., Grimoldi, A., Striker, G.** (2015). Ability to recover overrides the negative effects of flooding on growth of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum*. Crop and Pasture Science, **66** (1): 100–106.
- INDEC** (2008)
http://www.indec.gov.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=3&id_tema_2=8&id_tema_3=87
- I.N.T.A.** (1990). Atlas de Suelos de la República Argentina I, Bs. As. pp 83-202
- Irshad-ul-Haq, M., Ajmal, S. U., Munir, M., Gulfaraz, M.** (2010). Gene action studies of different quantitative traits in maize. Pakistan Journal Botany, **42** (2): 1021-1030.
- Itai, C., Benzioni, A.** (1976). Water stress and hormonal response. In Water and plant life. Springer Berlin Heidelberg. pp 225-242.
- Jajoo, A.** (2013). Changes in photosystem II in response to salt stress. In Ecophysiology

- and Responses of Plants under Salt Stress. Springer New York. pp 149-168
- James, R., Munns, R., Caemmerer, S. V., Trejo, C., Miller, C., Condou, T. A.G.** (2006). Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na^+ , K^+ and Cl^- in salt affected barley and durum wheat. *Plant Cell Environment*, **29** (12): 2185–2197
- Janska, A., Marsik, P., Zelenkova, S., Ovesna, J.** (2010). Cold stress and acclimation: what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology*, **12** (3): 395–405
- Kalaji, H. M., Govindjee Bosa, K., Koscielniak, J., Górska, K. Z.** (2011). Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO_2 assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany*, **73**: 64–72
- Kemble, A. R., Macpherson, H. T.** (1954). Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Canadian Journal of Botany*, **56** (6): 676-679.
- Kempa, S., Rozhon W., Šmjí, J., Erban, A., Bala F., Becker, T., Haselmayer, J., Schleiff, E., Kopka, J., Hirt, H., Jonak, C.** (2007). A plastid-localized glycogen synthase kinase 3 modulates stress tolerance and carbohydrate metabolism. *The Plant Journal*. **49** (6): 1076–1090
- Koyro, H., Hussain, T., Huchzermeyer, B., Khan, M. A.** (2013). Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, **91**: 22–29.
- Kosmala, A. Bocian, A. Rapacz, M. Jurczyk B., Zwierzykowski, Z.** (2009) (a). Identification of leaf proteins differentially accumulated during cold acclimation between *Festuca pratensis* plants with distinct levels of frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **60** (12): 3595–3609.
- Kosmala, A. Bocian, A. Zwierzykowski, Z.** (2009) (b). Activities of proteolytic enzymes during cold acclimation of *Festuca pratensis*. In: Genetics and Genomics in Crop Improvement – From a Model Plant to a New Cultivar. Krajewski, P., Kachlicki, P. Naganowska, B. eds.
- Krasensky, J., Jonak, C.** (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, **63** (4): 1593–1608.
- Kubota, F., Matsuda, Y., Agata, W., Nada, K.** (1994). The relationship between canopy structure and high productivity in Napier grass, *Pennisetum purpureum* Schumach. *Field Crops Research*, **38** (2): 105-110.
- Lakshmi, A., Ramanjulu, S., Veeranjaneyulu, K., Sudhakar, C.** (1996). Effect of NaCl on photosynthesis parameters in two cultivars of mulberry. *Photosynthetica* **32** (2): 285–289.
- Larcher, W.** (2003). *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer, Berlin.
- Lavado R.S., Taboada M. A.** (1988). Soil water, salts, and sodium dynamics in a Natraquoll of Argentina. *Catena*, **15** (6): 577-594.
- Lemaire, G., Da Silva, S. C., Agnusdei, M., Wade, M., Hodgson, J.** (2009). Interactions between leaf lifespan and defoliation frequency in temperate and tropical pastures: A review. *Grass Forage Science*, **64** (4): 341–353
- León, R. J. C.** (1992). Río de la Plata grasslands. Regional sub-divisions. Pp. 376-407 in: RT Coupland (ed.). *Ecosystems of the World 8A: Natural grasslands*. Elsevier. Amsterdam.
- Levitt, J.** (1982). Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol II Water, radiation, salt, and other stresses, **70**: 696–697.

- Liu, M., Osborne, C. P.** (2008). Leaf cold acclimation and freezing injury in C3 and C4 grasses of the Mongolian Plateau. *Journal of Experimental Botany*, **59** (15): 4161–4170.
- Loveless, M., Hamrick, J.** (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**: 65–95.
- Lugan, R., Niogret, M. F., Leport, L., Guégan, J. P., Larher, F. R., Savouré, A., Bouchereau, A.** (2010). Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal*, **64** (2): 215-229.
- Luo Q, Takano T, Liu S.** (2012). Proteomic analysis of *Chloris virgata* leaves under carbonate stress. *Cell Biology and Biophysics*. **1**: 1–7.
- Luna, F., Aguirre, A., Pittaro, G., Bustos, D., Ciacci, B., and Taleisnik, E.** (2016). Nutrient deficiency and hypoxia as constraints to *Panicum coloratum* growth in alkaline soils. *Grass and Forage Science*.
- Maas, E. V., Lesch, S. M., Francois, L. E., Grieve, C. M.** (1994). Tiller Development in Salt-Stressed Wheat. *Crop science*, **34** (6): 1594–1603.
- Maas, E. V., Hoofman, G. J.** (1977). Crop salt tolerance. *Journal of the irrigation and drainage division*. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*, **103** (2): 115-134.
- Marcum, K. B.** (1999) Salinity Tolerance Mechanisms of Grasses in the Subfamily Chloridoideae. *Crop Science*, **39** (4): 1153-1160.
- Maxwell, K., Johnson, G. N.** (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51** (345): 659–668.
- Mc Cue, K. F., Hanson, A. D.** (1990). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Molecular Biology*, **18** (1): 1-11.
- Mehta, P., Allakhverdiev, S. I., Jajoo, A.** (2010). Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynthesis Research*, **105** (3): 249-255.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7** (9): 405–410
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, **9** (10): 490–498.
- Miller, A. K., Galiba, G., Dubcovsky, J.** (2006). A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-A m 2 in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics*, **275** (2): 193-203.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R.** (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, **133** (3): 481–489.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-yilmaz, S., Mittler, R. O. N.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling. *Plant, cell and environment*, **33** (4): 453-467.
- Munns, R.** (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment*, **16**(1): 15–24.
- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environmental*, **25** (2): 239–250.
- Munns, R., James, R. A.** (2003). Screening Methods for SalinityTolerance: A Case Study with Tetraploid Wheat. *Plant and Soil*, **253** (1): 201–218.
- Munns, R., James, R. A., Läuchli, A.** (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, **57** (5): 1025-1043.
- Munns, R., Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of plant Biology*, **59**: 651–81.

- Munns, R., James, R. A., Gilliam, M., Flowers, T. J., Colmer, T. D.** (2016). Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*, **43(12)**: 1103-1113.
- Nakano, Y., Asada, K.** (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and cell physiology*, **22(5)**: 867-880.
- Naidoo, G., Naidoo, Y., Achar, P.** (2012). Ecophysiological responses of the salt marsh grass *Spartina maritima* to salinity. *African Journal of Aquatic Science*, **37 (1)**: 81-88.
- Nemati, I., Moradi, F., Gholizadeh, S., Esmaceli, M. A., Bihamta, M. R.** (2011). The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environmental*, **57 (1)**: 26-33.
- Nguyen, H. T., Sleper, D. A.** (1983). Theory and Application of Half-sib Matings in Forage Grass Breeding. *Theoretical and applied genetics*, **64(3)**: 187-196.
- Nishiuchi, S., Fujihara, K., Liu, S., Takano, T.** (2010). Analysis of expressed sequence tags from a NaHCO₃-treated alkali-tolerant plant, *Chloris virgata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48 (4)**: 247-255.
- Noble, C. L., Halloran, G. M., West, D. W.** (1984). Identification and selection for salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Crop and Pasture Science*, **35(2)**: 239-252.
- Noble, C. L., Rogers, M. E.** (1992). Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Plant and Soil*, **146 (1-2)**: 99-107
- Noctor, G., Foyer, C. H.** (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49 (1)**: 249-279.
- Otondo, J.** (2011). Efectos de la introducción de especies megatérmicas sobre características agronómicas y edáficas de un ambiente halomórfico de la Pampa Inundable. Tesis de Maestría. pp 70.
- Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., Dhindsa, R. S.** (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: Role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*, **23(6)**: 785-794.
- Panigatti, J. L.** (2010). Argentina: 200 años, 200 suelos. INTA ed. pp 345
- Parida, A. K., Das, A. B.** (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Ecotoxicology and Environmental Safety*, **60 (3)**: 324-349.
- Passioura, J. B., Munns, R.** (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Functional Plant Biology*, **27 (10)**: 941-48
- Pearce, R. S.** (2001). Plant freezing and damage. *Annals of Botany*, **87 (4)**: 417-424.
- Percival, N. S.** (1977). Survey of Paspalum in New Zealand pastures. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, **5 (3)**: 219-226.
- Petruzzi, H. J., Stritzler, N. P., Adema, E. O., Ferri, C. M.** (2003). Mijo perenne-*Panicum coloratum*. pp 1-28.
- Poehlman, J. M., Sleper, D. A.** (1995). Methods in Plant Breeding. *Breeding Field Crops*, 172-174.
- Pittaro, M. G.** (2014). Caracterización fenotípica y genotípica de germoplasma de *Panicum coloratum* L var. *coloratum* para la tolerancia a la salinidad. Tesis Maestría pp 98.
- Pittaro, G., Otondo, J., Peman, R., Taleisnik, E.** (2014). a Caracterización de materiales de *P. coloratum* a campo, con tolerancia diferencial a la salinidad. Simposio de recursos genéticos, mejoramiento y biotecnología de especies forrajeras, dentro del 37° Congreso Argentino de Producción Animal.
- Pittaro, G., Bruno, C., Tom, A., Bustos, D., Monteoliva, M., Ortega, L., and Taleisnik,**

- E. (2015). Grass and Forage Science Salt tolerance variability among stress-selected *Panicum coloratum* cv. Klein plants. Grass Forage Science, **71**: 683–698.
- Potts, H. C., Holt, E. C.** (1967). Parent-Offspring Relationships in Kleingrass, *Panicum coloratum* L. Crop Science, **7** (2): 145-148.
- Rajendran, K., Tester, M., Roy, S. J.** (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. Plant, Cell and Environment, **32** (3): 237-249.
- Rapacz, M., Wolanin, B., Hura, K., Tyrka M.** (2008). The effects of cold acclimation on photosynthetic apparatus and the expression of COR14b in four genotypes of barley (*Hordeum vulgare*) contrasting in their tolerance to freezing and high-light treatment in cold conditions. Annals of botany, **101**(5): 689-699.
- Rasmussen, S., Parsons, A.J., Jones, C. S.** (2012). Metabolomics of forage plants: A review. Annals of botany, **110** (6): 1281-1290.
- Robinson, G. G., Whalley, R. D. B.** (1991). Competition among three agronomic types of the *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees complex and three temperate pasture grasses on the Northern Tablelands of New South Wales. Crop and Pasture Science, **42** (2): 309-316
- Rosielle, A. A., Hamblin, J.** (1980). Theoretical Aspects of Selection for Yield in Stress and Non-Stress Environment. Crop science, **21** (6): 943-946
- Rizhsky, L., Liang, H. J., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R.** (2004). When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. Plant Physiology, **134** (4): 1683–1696
- Rossi, C.** (2005). “Mejoramiento de la Condición Forrajera en Bajos Alcalino-Sódicos con Especies Subtropicales en la Cuenca del Salado”. Sitio Argentino Prod. Anim. pp 1–8.
- Rowley, J. A.** (1976). Development of Freezing Tolerance in Leaves of C₄ Grasses. Functional Plant Biology, **3** (5): 597-603.
- Sabir, P., Ashraf, M.** (2007). Screening of local accessions of *Panicum milaceum* L. for salt tolerance at the seedling stage using biomass production and ion accumulation as selection criteria. Pakistan Journal Botany, **39** (5): 1655–1661.
- Salazar Lea Plaza, J. C., Moscatelli, G.** (1989). Mapa de Suelos de la Provincia de Buenos Aires. Escala 1:500.000. SEAGyP - INTA, Buenos Aires. pp 527.
- Sanchez, D. H., Siahpoosh, M. R., Roessner, U., Udvardi, M., Kopka, J.** (2008). Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. Physiologia Plantarum, **132** (2): 209–219.
- Sandve, S.R., Kosmala, A., Rudi, H., Fjellheim, S., Rapacz, M., Yamada, T., Arne, O.** (2011). Plant Science Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. Plant Science, **180** (1): 69–77.
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., Dhindsa, R. S.** (2001). Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca⁺² influx. The Plant Journal, **27** (1): 1-12.
- Schaedle, M., Bassham, J. A.** (1977). Chloroplast Glutathione Reductase. Plant Physiol, **59** (5): 1011–1012.
- Scoppa, C. O., Di Giacomo, R. M.** (1985). Distribución y características de los suelos salinos y/o alcalinos en la Argentina. IDIA pp 437-440.
- Shabala, S., Cuin, T. A., Prismall, L., Nemchinov, L. G.** (2007). Expression of animal CED-9 anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. Planta, **227** (1): 189-197.
- Shannon, M. C., Grieve, C. M.** (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. Scientia Horticulturae, **78** (1): 5-38.
- Shennan, C., Hunt, R., Macrobbe, E. A. C.** (1987). Salt tolerance in *Aster tripolium* L. I.

- The effect of salinity on growth. *Plant, Cell & Environment*, **10(1)**: 59-65.
- Shi, D. C., Yin, L. J.** (1993) Difference between salt (NaCl) and alkaline (Na₂CO₃) stresses on *Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scribn. et Merr. plants. *Acta Botanica Sinica* -Chinese edition, **35**: 144-149,
- Shi, D.C., Zhao, K.F.** (1997) Effects of NaCl and Na₂CO₃ on growth of *Puccinellia tenuiflora* and on present state of mineral elements in nutrient solution. *Acta Pratacu Sin*, **6 (2)**: 51-61.
- Shoresh, M., Spivak, M., Bernstein, N.** (2011). Free Radical Biology & Medicine Involvement of calcium-mediated effects on ROS metabolism in the regulation of growth improvement under salinity. *Free Radical Biology and Medicine*, **51 (6)**: 1221–1234.
- Singh, T. N., Aspinal, D., Paleg, L. G.** (1972). Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: potential metabolic measure of drought resistance. *Nature New Biology*, **236 (67)**: 188–190.
- Singh, J., Johnson-Flanagan, A. M.** (1987). Membrane alterations in winter rye and *Brassica napus* cells during lethal freezing and plasmolysis. *Plant Cell Environ*, **10 (2)**: 163–168.
- Singh, B. K., Sharma, S.R., Singh, B.** (2010). Antioxidant enzymes in cabbage: Variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae*, **124 (1)**: 9–13.
- Singh, R. K., Flowers, T. J.** (2011). Physiology and molecular biology of the effects of salinity on rice. In *Handbook of plant and crop stress*. Pessarakli, M. ed. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 899–939
- Smallwood, M., Bowles, D. J.** (2002). Plants in a cold climate. *Biological Sciences*, **357 (1423)**: 831–847.
- Smirnoff, N.** (1995). Antioxidant system and plant responses. In: *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*. N. Smirnoff ed. Bios Scientific Publishers, Oxford. pp. 217- 243.
- Sollenberger, L. E., Burns J. C.** (2001). Canopy characteristics, ingestive behaviour and herbage intake in cultivated tropical grassland. XIX Internacional Grassland Congress Sao Pedro, Sao Paulo, Brasil. Brazilian Society of Animal Husbandry, Sociedade Brasileira de Zootecnia, Piracicaba, Brasil. pp. 321-327.
- Soriano, A.** (1980). Ecofisiología del estrés. *Facultad de Agronomía*, **1 (1)**: 1-12.
- Steponkus, P. L.** (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold-acclimation. *Plant Physiology*, **35 (1)**: 543–584.
- Stewart, G. R, Lee, J. A.** (1974). Role of proline accumulation in halophytes. *Planta*, **120 (3)**: 279–289
- Suzuki, N., Miller, G., Morales J., Shulaev, V., Torres M. A. Mittler, R.** (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **14 (6)**: 691–699.
- Taboada, M. A., Micucci, S. N.** (2009). Respuesta de las propiedades físicas de tres suelos de La Pampa deprimida al pastoreo rotativo. *Ciencia del. suelo* [online]. **27 (2)**: 147-157.
- Takahashi, M. A., Asada, K.** (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **226 (2)**: 558–566
- Taiz, L., Zeiger, E.** (2002). *Plant physiology*, 3rd Edition. – Sinauer Assoc., Sunderland
- Taleisnik, E., Pérez, H., Córdoba, A., Moreno, H., García Seffino, L., Arias, C., Grunberg, K., Bravo, S., Zenoff, A.** (1998). Salinity effects on the early

- development stages of *Panicum coloratum*: Cultivar differences. Grass Forage Science, **53** (3): 270–278.
- Tellman B.** (2002). Invasive exotic species in the Sonoran Desert region. Tellman B. eds. Arizona: University of Arizona Press
- Tester, M., Davenport, R.** (2003). Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. Annals of botany, **91** (5): 503–527.
- Tester, M., Bacic, A.** (2005). Abiotic Stress Tolerance in Grasses. From Model Plants to Crop Plants. Plant Physiology, **137** (3): 791–793.
- Thomashow, M. F.** (1999). Plant cold acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. Plant Biology, **50** (1): 571–599.
- Tischler, C. R., Young, B. A.** (1987). Development and characteristics of a kleingrass population with reduced post-harvest seed dormancy. Crop science, **27** (6):1238-1241.
- Tischler, C. R., Ocumpaugh, W. R.** (2004). Kleingrass, Blue Panic, and Vine Mesquite. In Warm-season (C4) grasses. American Society of Agronomy. pp 623-649.
- Tuyen, D. D., Lal, S. K., Xu, D. H.** (2010). Identification of a major QTL allele from wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) for increasing alkaline salt tolerance in soybean. Theoretical and Applied Genetics, **121** (2): 229–236.
- Urano, K. Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. The Plant Journal, **57** (6): 1065–1078.
- Usadel, B., Blasing, O. E., Gibon, Y., Poree, F., Hohne, M., Gunter, M., Trethewey, R., Kamlage, B., Poorter, H., Stütt, M.** (2008). Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in Arabidopsis rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. Plant, Cell and Environment, **31** (4): 518–547.
- Valliyodan, B., Nguyen, H. T.** (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology, **9** (2): 189–195
- Vervoorst F. B.** (1967). Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado (Prov. De Buenos Aires). INTA. Buenos Aires, Argentina. pp 219.
- Vogel, K. P., Burson B. L.** (2004). Breeding and genetics. In: Warm - season (C₄) grasses. Moser, L. E., Burson, B. L. Sollenberger, L. E. eds. Agronomy monograph, **45**: 51-94.
- Vranová, E., Inzé, D., Van Breusegem, F.** (2002). Signal transduction during oxidative stress. Journal of Experimental Botany, **53** (372): 1227–1236.
- Wanner, L. A., Junttila, O.** (1999). Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. Plant Physiology, **120** (2): 391-399.
- Wang, Y, Ying, Y., Chen, J., Wang, X. C.** (2004). Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt tolerance. Plant Science, **167** (4): 671–677
- Wang, H., Wu, Z., Chen, Y., Yang, C., Shi, D.** (2011). Effects of salt and alkali stresses on growth and ion balance in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil Environmental, **57** (6): 286-294.
- Wang, L., Fang, C., Wang, K.** (2015). Physiological responses of *Leymus chinensis* to long-term salt, alkali and mixed salt-alkali stresses. Journal of Plant Nutrition, **38** (4): 526–540.
- Woodward, F. I.** (1987). Climate and plant distribution. Cambridge: Cambridge University Press. pp188.

- Wyn Jones, R. G.** (1980). An assessment of quaternary ammonium and related compounds as osmotic effectors in crop plants. In: Genetic Engineering of Osmoregulation, Rains, D. W., Valentine, R. C., Hollaender, A., eds. Plenum Press, New York. pp155.
- Wyn Jones, R. G.** (1981). Salt tolerance in Physiological Processes Limiting Plant Productivity, Johnson,. In: Johnson, C.B. (ed.): Physiological processes limiting plant productivity. Butterworths, London, 271–292.
- Yang, C., Chong, J., Li, C., Kim, C., Shi, D., Wang, D.** (2007). Osmotic adjustment and ion balance traits of an alkali resistant halophyte *Kochia sieversiana* during adaptation to salt and alkali conditions. *Plant and Soil*, **294 (1-2)**: 263–276.
- Yang, X., Liang, Z., Wen, X., Lu, C.** (2008). Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, **66 (1-2)**:73–86
- Yang, C., Shi, D., Wang, D.** (2008) (a). Comparative effects of salt and alkali stresses on growth, osmotic adjustment and ionic balance of an alkali-resistant halophyte *Suaeda glauca* (Bge.). *Plant Growth Regulation*, **56 (2)**: 179–190.
- Yang, C. W., Wang, P., Li, C. Y., Shi, D. C., Wang, D. L.** (2008) (b). Comparison of effects of salt and alkali stresses on the growth and photosynthesis of wheat. *Photosynthetica*, **47 (1)**: 107–114.
- Yang, J. Y., Zheng, W., Tian, Y., Wu, Y. Zhou, D. W.** (2012). Effects of various mixed salt-alkaline stresses on growth, photosynthesis, and photosynthetic pigment concentrations of *Medicago ruthenica* seedlings. *Photosynthetica*, **49 (2)**: 275–284.
- Yeo, A. R.** (1994). Physiological criteria in screening and breeding. In: Soil mineral stresses. Approaches to crop improvement. Yeo, A. R., Flowers, T. J. eds. Springer Berlin Heidelberg. pp 37–60
- Yeo, A.** (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, **49 (323)**: 915-929.
- Young, B. A.** (1986). A source of resistance to seed shattering in kleingrass, *Panicum coloratum* L. *Euphytica* **35**: 687–694
- Young, B. A. Tischler, C. R.** (1989). Recurrent selection for seedling vigor in kleingrass (*Panicum coloratum*). In: Agronomy Abstracts. ASA, Madison, WI. pp 107.
- Young, B. A.,** (1991). Heritability of resistance to seed shattering in kleingrass. *Crop Science*, **31 (5)**: 1156- 1158.
- Young, B. A.** (1993). Registration ofTEM-SR1 kleingrass germplasm. *Crop Science*, **33 (6)**: 1423-1423.
- Young, B. A.** (1994). Genetic variation in a *Panicum coloratum* L. population with a limited germplasm base. *Euphytica*, **75 (1-2)**: 71–76.
- Zhu, J. K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Cell Biology*, **6 (5)**: 441–445
- Zimmerman, D. L. Harville, D. A.** (2008). A Random Field Approach to the Analysis of Field-Plot Experiments and Other Spatial Experiments. *International Biometric Society Stable*, **47 (1)**: 223–239.