



Universidad Nacional del Litoral  
Facultad de Ciencias Agrarias

*Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Agrarias*

**Estudios de variabilidad genética en *Panicum coloratum* L. frente  
a condiciones de estrés combinado de salinidad-anegamiento**

Ing. Agr. Mauro Ezequiel Lifschitz

Directora de Tesis: Dra. María Andrea Tomas

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA-CONICET)

Co-Director: Dr. Juan Marcelo Zabala

Facultad de Ciencias Agrarias (UNL)

Instituto de Ciencias Agropecuarias (CONICET-UNL)

**2022**

*“Si he sido capaz de ver más que otros, ha sido encaramándome a  
hombros de gigantes”*

***Isaac Newton***

## Publicaciones y comunicaciones derivadas de esta tesis

- Lifschitz M. E., Guerrero G., Pagnucco M. E., Giordano M, Grunberg K. y Tomas M.A. (2018). Respuesta al estrés combinado de salinidad / hipoxia en *Panicum coloratum* L. 41° Congreso Argentino de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal. vol. 38 supl. 1: pp. 268.
- Lifschitz M. E., Tommasino E., Pagnucco M. E., Giordano M. C., Ribotta A., Zabala J. M., Grunberg K. y Tomas M. A. (2019). Evaluación del daño oxidativo y defensa antioxidante en plántulas de *Panicum coloratum* bajo condiciones de estrés combinado de salinidad y anegamiento. VI Congreso de la Red Argentina de Salinidad. 22-25/7/2019 Buenos Aires, Argentina.
- Lifschitz M. E., Pagnucco M. E., Giordano M.C., Tommasino E., Grunberg K., Zabala J. M. y Tomas, M. A. (2019). Cambios en la producción de biomasa en plántulas de *Panicum coloratum* L. bajo condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia. 42° Congreso Argentino de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal. Vol. (39) supl. 1: pp. 113
- Lifschitz M.E., Zabala J. M., Grunberg K. y Tomas M. A. (2020). Mejora genética por selección individual o familiar para tolerar hipoxia-salinidad en variedades de *Panicum coloratum* L. 43° Congreso Argentino de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal. Vol. (40) supl. 1: pp. 158
- Lifschitz M. E., Grunberg K., Zabala J. M. y Tomas M. A. (2020). Producción de biomasa y contenido de agua en plántulas de *Panicum coloratum* bajo condiciones de salinidad e hipoxia. Información técnica producción vegetal. Publicación Miscelánea - Año VIII N°3. pp. 149-154. ISSN en línea: 2314-3126
- Lifschitz M., Tommasino E., Zabala J. M., Grunberg K., Ramos J. C. and Tomas M. A. (2021). Combined effect of salinity and hypoxia in seedlings of two varieties of *Panicum coloratum*: Morphology, root system architecture, oxidative damage and antioxidant response. Annals of Applied Biology, 1–11. doi: 10.1111/aab. 12733

## **Agradecimientos**

Gracias...

A mi familia, por apoyarme con palabras de aliento en los momentos de mayor debilidad y acompañarme en cada uno de los desafíos asumidos

A Silvana Monteverde, por tomarme de la mano para ingresar al mundo de la genética y estar presente a través de sus consejos

A Alejo Re, por marcar mis primeros pasos y brindarme su apoyo y amistad

A Andrea Tomas, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo y mostrar la grandeza de aquellos que comparten sus conocimientos y su amor por la ciencia. Gracias también por su calidad humana y su amistad para conmigo haciéndome sentir un miembro más de su familia.

A Karina Grunberg, por estar siempre dispuesta a brindar sus conocimientos en pos de esta tesis y mi formación.

A Marcelo Zabala, por aceptar ser parte de esta tesis y colaborar en cada uno de los pasos que fui dando

A Marcelo Pisani, por brindarme sus conocimientos y consejos

Por último a todos aquellos que han pasado por el grupo de mejoramiento genético y producción de semillas de la EEA INTA Rafaela durante mi estadía y a todo su personal: Emilia Pagnucco, Gonzalo Guerrero, Mabel Giordano, Matias Vigroux, Lautaro Cattena, Mario Giergoff, Nihuel Garrote y Luciana Umbriago.

## Índice general

Resumen .....	xiv
Abstract.....	xv
<b>Capítulo 1.</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción general</b> .....	<b>1</b>
Avance de la frontera agrícola y cambio en el uso del suelo.....	1
Salinidad - Anegamiento .....	1
Efecto del estrés por salinidad e hipoxia .....	3
Ganadería en ambientes con limitantes .....	6
<i>Panicum coloratum</i> L.....	7
Mejoramiento genético para tolerancia a estrés.....	9
Hipótesis .....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos .....	12
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>13</b>
<b>Estudio de la respuesta fisiológica y oxidativa a condiciones de salinidad e hipoxia en <i>Panicum coloratum</i> L.</b> .....	<b>13</b>
Introducción .....	13
Hipótesis .....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos .....	17
Materiales y Métodos .....	17
Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	17
Variables bioquímicas y fisiológicas evaluadas .....	19
Temperatura foliar .....	19
Análisis de daño oxidativo y defensa antioxidante.....	19
Cuantificación del contenido de Malondialdehído (MDA).....	19

Cuantificación del poder reductor total (FRAP).....	19
Determinación de la actividad Catalasa (CAT) .....	20
Determinación de la actividad Superóxido dismutasa (SOD) .....	20
Cuantificación de iones Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .....	20
Análisis estadístico .....	21
<b>Resultados</b> .....	<b>21</b>
Efectos de la hipoxia, salinidad y el estrés combinado .....	21
Temperatura foliar .....	22
Daño oxidativo y respuesta antioxidante .....	24
Contenido de malondialdehido (MDA) .....	24
Poder reductor total (FRAP).....	24
Actividad Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasa (SOD) .....	25
Contenido de Prolina .....	26
Concentración de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .....	27
Relación K <sup>+</sup> : Na <sup>+</sup> .....	28
Discusión .....	30
Conclusiones.....	34
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>36</b>
<b>Estudio de la respuesta morfológica y acumulación de biomasa en condiciones de salinidad e hipoxia en <i>Panicum coloratum L.</i></b> .....	<b>36</b>
Introducción .....	36
Hipótesis .....	38
Objetivo general.....	38
Objetivos específicos .....	39
Materiales y Métodos .....	39
Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	39

Variables de morfología aérea .....	39
Variables de morfología radicular .....	40
Análisis estadístico .....	40
Interacción entre condiciones de estrés .....	40
Resultados.....	42
Efectos de la hipoxia, salinidad y el estrés combinado en el crecimiento ..	42
Estrés combinado y su interacción.....	48
Discusión .....	49
Diferencias entre variedades.....	53
Conclusiones.....	54
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>55</b>
<b>Variabilidad y ganancia genética por dos métodos de selección para incrementar la tolerancia a salinidad-hipoxia en dos variedades de <i>Panicum coloratum L.</i> .....</b>	<b>55</b>
Introducción.....	55
Hipótesis .....	58
Objetivo general.....	58
Objetivos específicos .....	58
Materiales y métodos .....	59
Material vegetal y condiciones de crecimiento .....	59
Variables morfológicas .....	60
Métodos de selección.....	60
Variabilidad genética .....	61
Estimación de ganancia genética .....	63
Correlaciones genéticas .....	63
Co-heredabilidad y ganancia genética indirecta .....	64
Resultados.....	64

Distribución de la variabilidad.....	64
Heredabilidad en sentido estricto.....	65
Diferencial de selección.....	66
Avance genético.....	66
Correlación genética .....	69
Co-heredabilidad.....	69
Respuesta directa e indirecta .....	70
Discusión .....	72
Aproximación experimental para evaluar variabilidad genética .....	72
Estructura genética de la población y heredabilidad .....	73
Avance genético.....	75
Selección directa e indirecta .....	75
Conclusiones.....	77
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>79</b>
<b>Conclusiones generales y perspectivas futuras .....</b>	<b>79</b>
Bibliografía .....	82

### Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> (A) <i>Panicum coloratum</i> var. <i>makarikariense</i> ; (B) Distribución en la república Argentina de la var. <i>makarikariense</i> ; (C) <i>Panicum coloratum</i> var. <i>coloratum</i> ; (D) Distribución en la república Argentina de la var. <i>coloratum</i> .....	9
--	---

<b>Figura 2.1.</b> Plántulas de <i>Panicum coloratum</i> creciendo bajo un sistema de hidroponía.....	21
---	----

<b>Figura 2.2.</b> Temperatura foliar en dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> creciendo durante 22 días en condiciones salinas y no salinas .....	23
---	----

<b>Figura 2.3.</b> Método de medición de temperatura foliar con termómetro infrarrojo 22 días posteriores al comienzo del período de estrés.....	23
--	----

<b>Figura 2.4.</b> Valor FRAP ( $\mu\text{mol.gPF-1}$ ) de dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salino-aireado, no salino-hipoxia, salino-aireado y salino-hipoxia durante 72 hs .....	24
<b>Figura 2.5.</b> Concentración de Superóxido dismutasa en dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salino-aireado, no salino-hipoxia, salino-aireado y salino-hipoxia durante 72 hs .....	25
<b>Figura 2.6.</b> Actividad Catalasa en plántulas de dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , creciendo durante 72 hs en condiciones de aireado e hipoxia .....	26
<b>Figura 2.7.</b> Contenido de prolina en dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo durante 10 días en condiciones no salino-aireado (NS-A), no salino-hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H) .....	27
<b>Figura 2.8.</b> Concentración de sodio (A) y potasio (B) de dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salinas y salinas durante 22 días .....	28
<b>Figura 2.9.</b> Relación $\text{K}^+:\text{Na}^+$ en dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo durante 22 días bajo condiciones no salino-aireado, no salino-hipoxia, salino-aireado y salino-hipoxia.....	29
<b>Figura 3.1.</b> Tasa de crecimiento relativa de dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , Kapivera INTA y Klein, creciendo durante 22 días en condiciones de: A: aireado e hipoxia; B: no salino y salino. ....	43
<b>Figura 3.2.</b> Peso seco aéreo de plántulas de <i>Panicum coloratum</i> creciendo bajo condiciones no salinas y salinas durante 22 días .....	44
<b>Figura 3.3.</b> Peso seco radicular de plántulas de <i>Panicum coloratum</i> creciendo bajo condiciones: (A) no salinas y salinas; (B) aireado e hipoxia durante 22 días .....	45
<b>Figura 3.4.</b> Plantas de <i>P. coloratum</i> luego de 22 días de tratamientos no salino-aireado (NS-A), salino-aireado (S-A), no salino-hipoxia (NS-H), salino-hipoxia (S-H). .....	45
<b>Figura 3.5.</b> Número de macollos (A) y número de hojas (B) de dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> , Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salinas y salinas durante 22 días .....	46

**Figura 3.6.** Diámetro radicular de dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo por 22 días en condiciones no salino-aireado (NS-A), no salino -hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H). ..... 47

**Figura 3.7.** Imagen scanner “Epson Expression 11000XL” sistemas radiculares de *Panicum coloratum* bajo condición no salino-aireado (NS-A), no salino hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H). ..... 48

**Figura 3.8.** Efecto del estrés combinado en biomasa seca total de dos cultivares comerciales de *P. coloratum* Kapivera INTA (KA) y Klein (KL). ..... 49

**Figura 4.1.** Familias de medios hermanos de *Panicum coloratum* previo al trasplante a condiciones de hidroponia. .... 60

**Figura 4.2.** Familias de medios hermanos de *Panicum coloratum* creciendo en condiciones de salinidad-hipoxia en hidroponia ..... 61

### Índice de tablas

<b>Tabla 2.1.</b> <i>Tabla de ANOVA</i> variables bioquímicas y fisiológicas .....	22
<b>Tabla 3.1.</b> <i>Tabla de ANOVA</i> variables morfológicas .....	42
<b>Tabla 3.2.</b> Parámetros de arquitectura radicular: longitud, número de bifurcaciones y volumen de dos cultivares de <i>Panicum coloratum</i> (Kapivera INTA y Klein) creciendo durante 22 días en condiciones no salino-aireado (NS-A), no salino-hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H) .....	48
<b>Tabla 4.1.</b> Estimación de componentes de varianza .....	65
<b>Tabla 4.2.</b> Componentes genéticos <i>P. coloratum</i> var. <i>makarikariense</i> .....	67
<b>Tabla 4.3.</b> Componentes genéticos <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i> .....	68
<b>Tabla 4.4.</b> Correlaciones genéticas en <i>P. coloratum</i> var. <i>makarikariense</i> creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia. 69	
<b>Tabla 4.5.</b> Correlaciones genéticas entre pares de caracteres en <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i> creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia. ....	69

**Tabla 4.6.** Heredabilidad en sentido estricto (en diagonal y negrita) y Coheredabilidad entre pares de caracteres en *P. coloratum* var. *makarikariense* ..... 70

**Tabla 4.7.** Heredabilidad en sentido estricto (en diagonal y negrita) y Coheredabilidad entre pares de caracteres en *P. coloratum* var. *coloratum* ..... 70

**Tabla 4.8.** Ganancia directa sobre el carácter seleccionado (en diagonal y negrita) y efecto indirecto sobre el resto de los caracteres en *P. coloratum* var. *makarikariense* 71

**Tabla 4.9.** Ganancia directa sobre el carácter seleccionado (en diagonal y negrita) y efecto indirecto sobre el resto de los caracteres en *P. coloratum* var. *coloratum* ..... 71

## Abreviaturas

$\mu\text{l}$ : micromol	$\text{K}^+$ : Ion potasio
$^{\circ}\text{C}$ : Grados Celsius	KA: Kapivera INTA
ADN: Ácido desoxirribonucleico	KL: Klein
$\text{Ca}^{2+}$ : Ion calcio	m: metro
CAT: Catalasa	MDA: Malondialdehido
CE: Conductividad eléctrica	mg: miligramo
Cl <sup>-</sup> : Ion cloruro	$\text{Mg}^{2+}$ : Ion magnesio
cm: centímetro	min: minuto
cv: Cultivar	mmol: milimol
DMS: Diferencia mínima significativa	$\text{N}_2\text{O}$ : Óxido nitroso
dS: Decisiemens	$\text{Na}^+$ : Ion sodio
ERO: Especies reactivas del oxígeno	NaCl: Cloruro de sodio
$\text{Fe}^{+2}$ : Ion ferroso	NBT: nitro blue tetrazolium
$\text{Fe}^{+3}$ : Ion férrico	NH: Número de hojas
FMH: Familia de medios hermanos	nm: nanómetro
FRAP: Capacidad reductora férrica del plasma	NM: Número de macollos
g: gramo	$\text{NO}_3^-$ : Nitratos
gl: Grados de libertad	NS-A: No salino aireado
$h^2$ : Heredabilidad en sentido estricto	NS-H: No salino hipoxia
$\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de hidrógeno	$\text{O}_2^-$ : Ion superóxido
IC: Intervalo de confianza	OH <sup>-</sup> : Radical hidroxilo
	PF: Peso fresco
	PFR: Peso fresco radicular
	PFT: Peso fresco total
	PS: Peso seco

PSA: Peso seco aéreo	SFI: Selección fenotípica individual
PSI: Porcentaje de sodio de intercambio	SGPP: Selección genotípica por prueba de progenie
PSR: Peso seco radicular	S-H: Salino hipoxia
PVPP: polivinilpirrolidona	SOD: Superóxido dismutasa
RAS: Relación de absorción de sodio	TBA: Ácido tiobarbitúrico
Rb: Riboflavina	TCA: Ácido tricloroacético
rpm: revoluciones por minuto	TCA: Tasa de crecimiento relativo
S-A: Salino aireado	

## Resumen

En la Argentina, la ganadería actual se desarrolla en ambientes con limitantes edafo-climáticas, entre ellas, suelos de moderada a alta salinidad combinada con períodos de anegamiento. Numerosas especies forrajeras han sido introducidas con el objetivo de incrementar la oferta en estos ambientes, entre ellas, *Panicum coloratum* una gramínea subtropical. El objetivo de este estudio fue evaluar en dos variedades botánicas de esta especie, var. *makarikariense* y var. *coloratum*, la respuesta a condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación. Se estudiaron las respuestas fisiológicas y oxidativas, así como también los cambios en la morfología y acumulación de biomasa aérea y radicular, en un sistema de hidroponia. Para la mayoría de los caracteres, no se observaron diferencias en los efectos observados en condiciones de salinidad y salinidad e hipoxia combinados. La variedad *makarikariense* resultó más tolerante a condiciones de salinidad que la variedad *coloratum*. Luego, se estimó la variabilidad genética y el avance por selección mediante selección fenotípica individual (SFI) y selección genotípica por prueba de progenie (SGPP). El método más eficiente difirió entre variedades. La SFI sería más exitosa en la variedad *coloratum* mientras que, SGPP para la variedad *makarikariense*. Los resultados muestran que sería posible incrementar la tolerancia a estrés combinado en *Panicum coloratum*.

Palabras claves: Estrés abiótico, tolerancia, mejoramiento genético, forraje, *Panicum coloratum*.

## Abstract

In Argentina in the last decades, livestock has moved to areas with soil restrictions such as salinity. In addition, these landscapes are prone to waterlogging. Forage species have been introduced to increase the supply in these environments, including *Panicum coloratum*, a subtropical forage grass. The objective of this study was to evaluate the effect of salinity conditions, hypoxia and their combination on two botanical varieties of this species, var. *makarikariense* and var. *coloratum*. Physiological and oxidative responses were evaluated, as well as changes in morphology and accumulation of aerial and root biomass of seedlings growing in a hydroponic system. For most traits, no differences were observed between salinity and combined stress conditions. *Makarikariense* was more tolerant to salinity conditions than *coloratum*. After that, genetic variability and genetic gain were estimated by individual phenotypic selection (IFS) and genotypic selection (SGPP). The most efficient method was different between varieties. SFI would be more efficient than SGPP for *coloratum* variety and SGPP would be more efficient than SFI for *makarikariense* variety. The results show that it would be possible to increase combined stress tolerance in plants of *Panicum coloratum*.

Keywords: Abiotic stress, tolerance, forage, breeding, *Panicum coloratum*.

## Capítulo 1.

### Introducción general

#### *Avance de la frontera agrícola y cambio en el uso del suelo*

A partir de la década de los 90' el incremento del precio de los commodities, la flexibilización en las normas de arrendamiento y la incorporación de nuevas tecnologías ha provocado el avance de la frontera agrícola en la Argentina (Auer et al., 2019). En la región pampeana, la expansión de la superficie cultivada se produjo a expensas de tierras ocupadas por cultivos forrajeros perennes y de pastizales naturales, mientras que en la región chaqueña este avance se produjo a expensas del monte nativo (Paruelo et al., 2006). Esto ha provocado no sólo, la homogenización de los ecosistemas y la pérdida de biodiversidad (Stephan, 2016) sino también, cambios a nivel de suelo (Amdan et al., 2013). La expansión de la frontera agrícola en la región pampeana Argentina, es ejemplo de esto, existen vastas evidencias que denotan su relación con el incremento en la frecuencia y severidad de períodos de anegamiento, debido al cambio en el flujo de carga y descarga del agua subterránea (Jobbagy et al., 2003; Nosetto et al., 2015). Por otra parte, con el ascenso del nivel freático se produce el ascenso de las sales disueltas en la solución del suelo y producto de ello se acumulan sales en la zona de exploración de raíces (Jayawickreme et al., 2011), dificultando el desarrollo de los principales cultivos agrícolas en estas regiones.

Una de las consecuencias más notorias del avance de la frontera agrícola, ha sido el desplazamiento de la producción ganadera hacia zonas con bajo potencial para la agricultura. Estas zonas suelen tener restricciones edáficas como salinidad, alcalinidad y problemas asociados, como períodos de alternancia de sequía-inundación (Paruelo et al., 2006; Manuel-Navarrete et al., 2009). Lo expuesto deja en claro el rol protagónico que tienen las tierras afectadas por sales y acumulación de agua en la pérdida de rentabilidad agrícola-ganadera Argentina, no solo por la superficie afectada  $\approx 15$  Mha (Lavado, 2007), sino también, por su efecto negativo sobre los cultivos.

#### *Salinidad - Anegamiento*

La salinización de los suelos es uno de los estreses abióticos de mayor importancia para la producción agrícola en regiones áridas y semiáridas del mundo debido a su efecto negativo sobre el crecimiento de los cultivos. Aproximadamente el 20% del área cultivada y el 50% del área irrigada mundial, se encuentra afectada por dicho estrés y, se prevé que

para el año 2050, más del 50% de todas las tierras agrícolas presentarán diferentes niveles de salinización (Wang et al., 2003). En Latinoamérica, Argentina es el país que lidera en porcentaje de tierras salino-sódicas (Pla Sentís, 2021), y la región chaqueña y del noroeste es la más afectada por esta problemática.

El estudio de los suelos salinos involucra los suelos afectados por sales, los suelos alcalinos y los afectados por la combinación de salinidad y alcalinidad, por lo que su análisis resulta muy complejo. La salinidad se mide por medio de la conductividad eléctrica (CE) en la solución del suelo, y el umbral para considerar que un suelo es salino se ha establecido en  $CE > 4$  dS/m, siendo en general, el cloruro de sodio (NaCl) la principal fuente de salinidad de estos suelos. Por otra parte, un suelo es considerado sódico cuando el porcentaje de sodio de intercambio (PSI) es  $> 15\%$  o la relación de absorción de sodio (RAS), que es la relación entre el  $Na^+$  y los cationes  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  de la solución del suelo es  $> 13\%$ . En el caso de los suelos denominados sódicos la CE se mantiene por debajo de 4, y en caso de que este valor sea superado se denominan salino-sódicos. A menudo, los suelos sódicos poseen altos valores de pH. En suelos sódicos existe una concentración elevada de sales sódicas capaces de sufrir hidrólisis alcalina como carbonato y bicarbonato de sodio. Estas sales producen incrementos del pH del suelo a valores mayores o iguales a 8,5 produciendo una disminución en la disponibilidad de nutrientes por menor solubilidad y además, una caída en la actividad biológica (Taboada, 2009; Courel, 2019).

Estos suelos sódicos que pueden presentarse en una gran variedad de situaciones, poseen un horizonte Bt nátrico en profundidad. Esto quiere decir, un horizonte B con alto porcentaje de arcilla y estructura de tipo columnar que lo convierte en un subsuelo con baja permeabilidad (Taboada, 2009). Como el sodio impide la floculación, este tipo de suelos son propensos a la caída en la infiltración debido a los fenómenos de encostramiento y dispersión de arcilla (Pita, 2017).

Suelos clasificados taxonómicamente como Natralboles, Natraquoles o Natraqualfes, entre otros, cuentan con las características mencionadas (Imhoff y Panigatti, 2021), donde además de la salinidad presente, estas tierras son propensas a presentar condiciones de anegamiento.

Se entiende como anegamiento al perfil de suelo saturado con agua, lo que genera, en suelos con presencia de sales, condiciones de hidro-halomorfismo. Estas condiciones pueden originarse, ya sea, por la existencia de un nivel freático salino cercano a la

superficie, o por la acumulación de agua debido a la reducida infiltración en suelos salino-sódicos.

En condiciones de anegamiento el aire presente en los poros del suelo es reemplazado por agua, esto determina una caída del nivel de  $O_2$  en el suelo debido su baja tasa de difusión en agua (Ponnamperuma, 1972). Poco tiempo después de que el suelo sufre un proceso de anegamiento, la respiración de raíces y la actividad de los microorganismos consumen el oxígeno remanente y provocan una condición de hipoxia (Blom y Voesenek, 1996). Una consecuencia asociada a la hipoxia es la caída del potencial redox, por lo que ocurren aumentos en la disponibilidad de algunos nutrientes y disminución en la disponibilidad de otros. En primer lugar, los nitratos ( $NO_3^-$ ) se reducen a formas de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) y óxido nitroso ( $N_2O$ ) en un proceso conocido como desnitrificación (Illarze et al., 2018). En segundo lugar, cuando un suelo se encuentra saturado con agua, el fósforo forma compuestos con hierro ferroso y manganeso reducido. Las fracciones minerales de fósforo unidas al hierro y al manganeso son más solubles que cuando estos compuestos están en estado oxidado lo que incrementa la disponibilidad de este elemento para las plantas (Taboada et al., 2009). Por otro lado, a medida que incrementa el tiempo en que el suelo se encuentra saturado, las concentraciones de dióxido de carbono incrementan junto al etileno, a causa de la respiración radicular.

Las principales áreas de la Argentina en donde las condiciones de salinidad y anegamiento confluyen con frecuencia, son la “Pampa Deprimida” en la provincia de Buenos Aires y los bajos submeridionales en la provincia Santa Fe y Chaco donde alcanzan, entre estas dos zonas, alrededor de 15 Mha (Lavado, 2007). En estas regiones ante un evento de precipitación, la frágil estructura de los suelos sódicos provoca la acumulación de agua en superficie que sumado a la salinidad presente provocan un estrés combinado por salinidad e hipoxia en las plantas creciendo en estos ambientes.

#### *Efecto del estrés por salinidad e hipoxia*

La salinidad en el suelo afecta negativamente el crecimiento y el desarrollo de las plantas, debido a la alteración de los principales procesos fisiológicos y bioquímicos tales como fotosíntesis, síntesis de proteínas, metabolismo lipídico y energético (Zhang y Blumwald, 2001; Ashraf, 2004; Munns, 2005; Parida and Das, 2005). Frente a una situación de estrés salino, las plantas manifiestan diversas respuestas en dos fases sucesivas a través del tiempo (Munns and Tester, 2008). La primera fase, osmótica,

comienza inmediatamente cuando se eleva la concentración de sal en el medio ocasionando una reducción del potencial hídrico. La segunda fase, ión-específica, implica la respuesta de la planta a la acumulación de niveles tóxicos de sal ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) en los tejidos (Munns and Tester, 2008). Estos iones pueden ser transportados ya sea por simplasto o aposplasto y pueden ingresar a las raíces a través de apoplasto sin que intervenga una selectividad biológica entre el exterior y el xilema en regiones de la raíz que carezcan de la protección brindada por la exodermis y / o endodermis o bien no se hayan formado o se vean interrumpidas. Los iones son removidos del xilema hacia el interior de la célula donde pueden ser secuestrados dentro de las vacuolas. Prevenir o reducir el flujo de iones hacia el xilema mediante barreras exo y / o endodérmicas es fundamental para que las plantas limiten el transporte de sal a los brotes en condiciones de salinidad (Yeo et al., 1987; Cui et al., 2021). Muchas plantas pueden excluir hasta cerca del 98% de la sal presente en la solución de suelo, permitiendo que sólo un 2% sea transportado en el xilema hacia los brotes (Munns, 2005). En algunos casos, los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  que ingresan a las células de la raíz, son expulsados nuevamente hacia el medio a través de transportadores de membrana, siendo este mecanismo, de un costo energético muy elevado para las plantas (Munns y Tester, 2008).

Aquellos iones que ingresan a la planta pueden ascender por el torrente transpiratorio hacia las hojas, donde se acumulan y generan los mayores daños. De esta manera, como se mencionara previamente, comienza la “fase iónica” que ocurre en una segunda etapa luego de la exposición a la salinidad. Los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  alteran la estructura de enzimas, provocan daño en organelas celulares y, además, inducen la deficiencia de ciertos iones como potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Peng et al., 2008; Sade et al., 2018).

En respuesta al bajo potencial osmótico, se acumulan solutos osmocompatibles en el citosol, éstos permiten a las plantas realizar un ajuste osmótico y, a su vez, balancear la presión osmótica entre la vacuola (donde son compartimentalizados  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y el citoplasma (Munns y Tester, 2008). Los osmolitos compatibles más comunes son azúcares solubles, prolina, glicinabetaína y poliaminas (Hoque et al., 2008).

La toxicidad metabólica del  $\text{Na}^+$  está asociada con perturbaciones en la membrana celular y con la competencia por los sitios de ingreso del  $\text{K}^+$ , esencial para el metabolismo (Cerdá et al., 1995; Wu et al., 2015). Una alta concentración de  $\text{Na}^+$  desplaza los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  de los sitios de enlace de la membrana celular en la raíz y altera su permeabilidad, lo

que causa una salida de  $K^+$  de las células y favorece la entrada de  $Na^+$  (Cramer et al., 1994). Mantener la homeostasis celular de  $K^+$  y  $Na^+$  es importante para mantener la actividad de enzimas relacionadas al metabolismo de los carbohidratos y conservar un potencial de membrana adecuado que garantice la presión de turgencia necesaria para la expansión celular (Munns y Tester, 2008; Barret-Lennard y Shabala, 2013). En este sentido, la tolerancia a la salinidad depende de la habilidad del genotipo para controlar la absorción y el transporte de  $Na^+$  y  $Cl^-$  al tejido fotosintético, manteniendo una alta relación de  $K^+ : Na^+$  en la hoja. Esta relación por lo tanto, se considera como un indicador importante de la tolerancia a la salinidad (Greenway y Munns, 1980; Cerdá et al., 1995; White y Broadley, 2001; Paz et al., 2012; Barret-Lennard y Shabala, 2013; Ribotta et al., 2013).

En el caso del anegamiento, el estrés que sufren las plantas está dado por un déficit en la disponibilidad de oxígeno en el sistema radicular (Capon et al., 2009; Colmer y Voesenek, 2009; Striker, 2012) que impacta en forma directa en la supervivencia y crecimiento de este sistema e indirectamente en la parte aérea (Yin et al., 2010). La falta de oxígeno es producto de la caída drástica en la tasa de intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera provocada por la película de agua sobre el suelo (Ponnamperuma, 1972). Frente a este tipo de estrés las plantas responden a través de cambios fisiológicos, anatómicos y morfológicos relacionados con la supervivencia bajo tales condiciones (Colmer y Voesenek, 2009). Entre los cambios anatómicos de mayor relevancia se encuentra la formación de aerénquima y de raíces adventicias, que favorecerían el transporte interno de oxígeno desde los órganos aéreos hacia los tejidos sumergidos (Teakle et al., 2011; Striker, 2012). Entre las respuestas morfológicas se menciona, entre otras, la modificación de la asignación de recursos hacia una mayor relación tallo: raíz (Imaz et al., 2012; Striker, 2012). Con respecto a las modificaciones fisiológicas, el anegamiento incrementa la absorción y transporte de iones y disminuye la conductancia estomática, en consecuencia, las tasas de transpiración y fotosíntesis se ven afectadas (Teakle et al., 2007). Estos cambios fisiológicos foliares impactan directamente, disminuyendo la acumulación de biomasa por parte de las plantas (Colmer y Flowers, 2008; Mollard et al., 2010; Striker, 2012) siendo esto relevante en el caso de especies forrajeras ya que afecta directamente el forraje disponible para el ganado.

Bajo condiciones ambientales favorables, el metabolismo oxidativo se encuentra en equilibrio entre producción y degradación de especies reactivas del oxígeno (ERO)

como, ión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), entre otras (Choudhury et al., 2017). Bajo condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico, existen reportes indicando la acumulación de EROs, provocando lo que se conoce como estrés oxidativo (Castelli et al., 2010; Tommasino et al., 2018). Para la eliminación de las EROs los organismos cuentan con un sistema de detoxificación, tanto enzimático como no enzimático. El sistema enzimático está conformado por varias enzimas antioxidantes, entre ellas, Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD) y Ascorbato peroxidasa (APX) (Gill y Tuteja, 2010a). En cuanto al sistema de detoxificación no enzimático, se compone de alcaloides, tocoferoles y carotenoides, además de osmolitos compatibles mencionados previamente como, prolina y glicina betaína, involucrados en la protección de las plantas frente a las EROs, protegiendo la estructura de membranas y estabilizando proteínas (Ashraf y Foolad, 2007; Choudhury et al., 2017).

Resumiendo, cuando un suelo salino sufre un proceso de anegamiento, las plantas se encuentran sometidas a un estrés combinado por salinidad e hipoxia que interactúa en sus efectos, a los que las plantas responden mediante modificaciones en caracteres fisiológicos, morfológicos y de daño oxidativo (Barret-Lennard, 2003; Imaz et al., 2012; Striker et al., 2015). En los últimos años, uno de los caminos para evaluar el efecto de la combinación de estreses en el crecimiento de las plantas es comparar el impacto del estrés separadamente y luego combinado (Striker et al., 2015; Menon-Martínez et al., 2021). De esta manera es posible comprender y establecer diferencias en el efecto que produce la combinación de estreses frente a aquellos observados con un estrés en particular. Aunque en el pasado, se ha generado información acerca de las respuestas de las plantas a condiciones de estrés por salinidad y anegamiento, estos resultados no pueden ser utilizados para inferir los efectos de su combinación (Zandalinas et al., 2018). Por lo tanto, la combinación de diferentes condiciones de estrés debe ser tratada como un nuevo estrés abiótico y generar información en torno a esta nueva condición resulta relevante.

#### *Ganadería en ambientes con limitantes*

Los pastizales que se encuentran en regiones afectadas por salinidad y anegamiento forman parte de la principal oferta forrajera para el ganado, están conformados por valiosas especies nativas y naturalizadas, en particular gramíneas, leguminosas y amarantáceas adaptadas a condiciones de estrés salino e hídrico, producto de miles de años de evolución (Pensiero y Zabala, 2017). Entre las más importantes se

encuentran especies del género *Atriplex* sp., *Trichloris* sp., *Paspalum* sp., *Cynodon* sp., *Elymus* sp., *Melilotus* sp., entre otras (Marinoni et al., 2019).

Los pastizales son extremadamente importantes desde el punto de vista ambiental ya que evitan la erosión del suelo y juegan un papel vital en el secuestro de carbono. Además, son una reserva de biodiversidad y un valioso hábitat de vida silvestre (Lemaire et al., 2005). Por otra parte, desempeñan un papel importante para la producción animal ya que constituyen la base de alimentación del ganado (Batello et al., 2008). Sin embargo, el sobrepastoreo, producto de la alta carga animal y la falta de planificación de períodos de utilización y descanso, ha provocado la degradación del pastizal natural y la pérdida de especies de alta calidad forrajera (Marino et al., 2020).

Con el objetivo de aumentar la receptividad de los sistemas ganaderos extra-pampeanos y complementar a las especies presentes en el pastizal natural, se han introducido numerosas especies de gramíneas forrajeras subtropicales (Qadir et al., 2007; Avila et al., 2014). Una de estas especies es *Panicum coloratum*, introducida en nuestro país para ser utilizada en regiones afectadas por condiciones edafo-climáticas adversas, como suelos de moderada a alta salinidad combinada en algunos casos con anegamiento (Petruzzi et al., 2003). En este contexto, surge la necesidad de generar conocimientos referidos a caracteres y procesos fisiológicos involucrados en la tolerancia al estrés combinado salinidad-anegamiento en esta especie que resulten orientativos para definir los pasos a seguir en la definición de un plan para la obtención de nuevo germoplasma mejorado en su capacidad productiva. El germoplasma superior impactará en los sistemas ganaderos al aumentar la oferta de forrajes en situaciones poco productivas y, consecuentemente, generando un incremento en la rentabilidad de los mismos.

#### *Panicum coloratum* L.

*Panicum coloratum* L., es una gramínea perenne de crecimiento estival con metabolismo fotosintético C4. Originaria del continente africano, está adaptada a zonas subtropicales y tropicales (Armando et al., 2013). Es una especie alógama que presenta diferentes niveles de ploidía, siendo la forma más común la autotetraploide ( $2n=4X=36$ ) (Armando et al., 2017). Pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Panicoideae, tribu Paniceae (Tischler y Ocumpaugh, 2004).

En Argentina, las variedades más frecuentemente introducidas son *coloratum* y *makarikariense*, diferentes en morfología y en sus requerimientos (Lloyd, 1981; Armando

et al., 2013) (Figura 1.1). La variedad *coloratum* se desarrolla en ambientes con un rango de precipitaciones de 450 mm – 800 mm anuales, es tolerante a las heladas y a la sequía, y se desarrolla en suelos arenosos. Presenta hojas de color verde brillante y 0.5 - 0.8 cm de ancho. En el mercado encontramos el cv. Klein, liberado en Estados Unidos en el año 1982 (US Department of Agriculture, 1982) y mejorada por mayor peso de semillas. La variedad *makarikariense* crece en ambientes con un rango de precipitaciones de 600 mm – 1000 mm anuales. Su mejor comportamiento lo manifiesta en suelos arcillosos pesados. Sus hojas presentan color verde azulado, con una nervadura central blanca prominente y un ancho de 1 – 1.3 cm. Esta variedad presenta mayor capacidad de propagación vegetativa a través de estolones que la variedad *coloratum*. Los cultivares registrados en el país son cv. Bambatsi, desarrollado en Sudáfrica a partir de un ecotipo local colectado en el año 1946 (West, 1952) y cv. Kapivera INTA, seleccionado por mayor peso de semilla y mejor capacidad de implantación en 2016 y liberado en Argentina (Giordano et al., 2013). Existen reportes previos para ambas variedades de esta especie que destacan su tolerancia a condiciones de anegamiento y salinidad (Imaz et al., 2012, 2015; Pittaro et al., 2015; Cardamone et al., 2018).

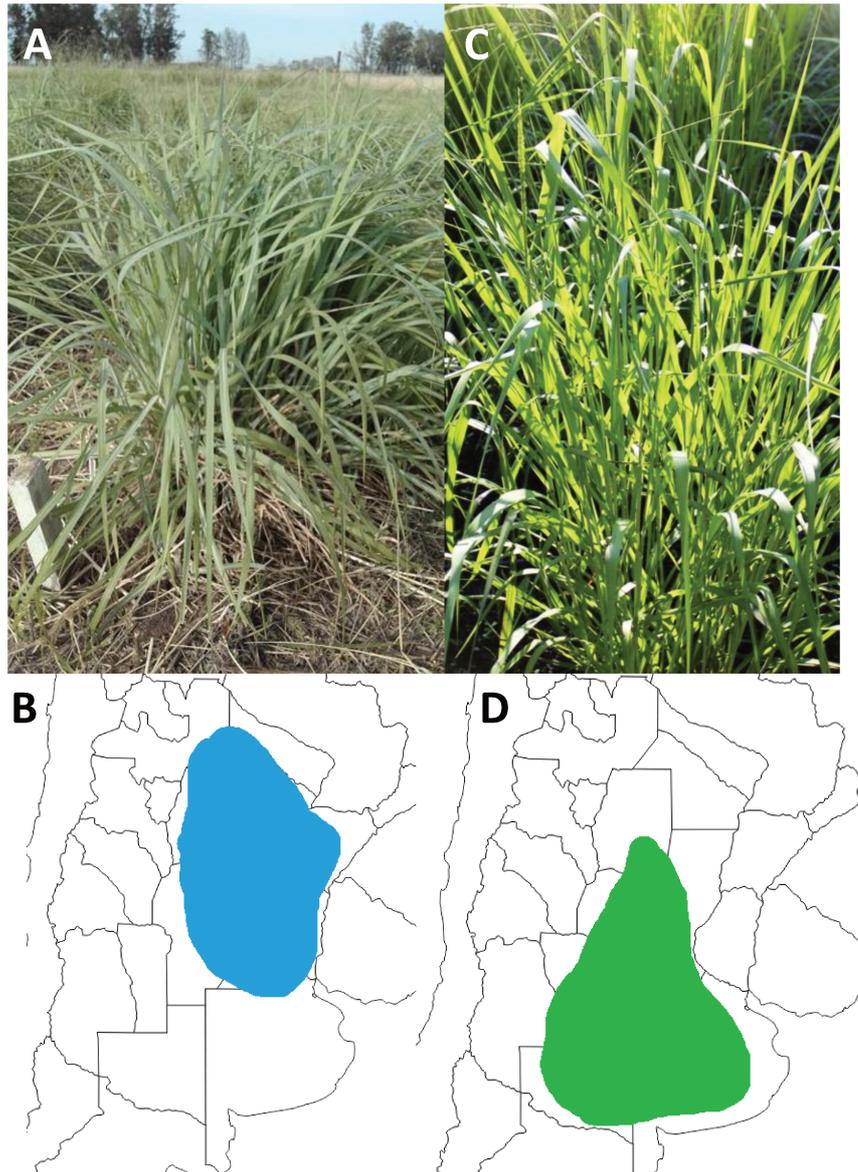


Figura 1.1. (A) *Panicum coloratum* var. *makarikariense*; (B) Distribución en la república Argentina de la var. *makarikariense*; (C) *Panicum coloratum* var. *coloratum*; (D) Distribución en la república Argentina de la var. *coloratum*. Elaboración propia en base a Ávila et al. (2014)

#### *Mejoramiento genético para tolerancia a estrés*

El mejoramiento genético de especies forrajeras ha enfocado sus esfuerzos en diferentes rasgos a lo largo de la historia, como incremento en el vigor de plántulas (Tischler et al., 1989), aumento en la producción de biomasa (Dhaliwal, 2009) aumento en el peso (Giordano et al., 2013) y retención de semillas (Young, 1986). Sin embargo, el mejoramiento en tolerancia a estreses abióticos ha tomado lugar en los últimos años (Atlin et al., 2017) y en particular a salinidad (Schrauf et al., 2017). Esto se debe a que, si bien

pueden encontrarse soluciones para la problemática que conlleva un suelo salinizado, las medidas preventivas o de restauración de los mismos para su recuperación en suelos productivos, implican soluciones costosas y de corto plazo (Lavado, 2007). Por esto, bajo la hipótesis de que es posible aumentar la capacidad productiva de una especie sometida a estrés mediante mejoramiento genético, se ha trabajado en obtener germoplasma tolerante a diversos factores de estrés a través de selección (Carloni et al., 2017; Cardamone et al., 2018).

Si bien, la adaptación y mejoramiento de especies forrajeras pretende ser la mejor solución para el incremento de la oferta forrajera, este proceso no resulta sencillo, y esto se ve reflejado en el escaso aporte, por parte del mejoramiento genético, al incremento en el rendimiento de forraje en las últimas décadas (Lamb et al., 2006; Kingston-Smith et al., 2013).

Los programas de mejoramiento genético en forrajeras alógamas culminan, en general, con la obtención de una variedad sintética o una población mejorada de polinización abierta. Dado que, caracteres de interés en forrajeras, como rendimiento y calidad nutricional se heredan en forma cuantitativa, el método de mejoramiento más utilizado es la selección recurrente, cuyo objetivo es incrementar la frecuencia de alelos favorables en una población, aislando y apareando entre sí, sus mejores individuos en ciclos repetidos.

Los individuos de una población son evaluados y seleccionados a través de observaciones fenotípicas. El fenotipo, es la carga genética contenida por un individuo sumada a la interacción con los efectos ambientales que modelan su expresión (Falconer y Mackay, 1996; Mariotti y Collavino, 2014). Resulta así, imprescindible cuantificar que proporción de la variación fenotípica observada se debe a efectos genéticos. En otras palabras, determinar si las diferencias que se observan entre los individuos de una población se deben al genotipo o al ambiente o en qué proporción a uno y a otro. En este sentido, la heredabilidad es un parámetro ampliamente utilizado en el mejoramiento de cultivos ya que permite conocer esta proporción en cada uno de los caracteres de interés.

La heredabilidad en caracteres relacionados a la tolerancia a diferentes estreses ha sido estudiada previamente en especies forrajeras (Warkad et al., 2008; Ebrahimiyan et al., 2013), incluso en *P. coloratum* (Cardamone, 2019; Pittaro et al., 2021), sin embargo, no existen reportes acerca de la heredabilidad en caracteres involucrados en la tolerancia a estrés combinado de salinidad y anegamiento en esta especie. Es importante destacar

que la estimación de heredabilidad y consecuentemente el avance genético por selección deben calcularse de acuerdo con el método de selección propuesto y aplicarse a la población de referencia apropiada (Nguyen y Sleper, 1983). Por esto, resulta importante, previo a determinar un método de selección, estudiar cuál resulta más adecuado para el objetivo de mejoramiento.

Los diferentes métodos de selección difieren entre sí, por la unidad que será elegida para su entrecruzamiento y posterior cosecha. Entre ellos, la selección fenotípica individual y genotípica por prueba de progenie son dos métodos que han sido utilizados en el mejoramiento genético de especies forrajeras (Basigalup D. y Rossanigo R., 2007) y particularmente en *P. coloratum* (Giordano et al., 2013; Pittaro et al., 2021). En la selección fenotípica individual, los individuos se seleccionan en base a sus valores fenotípicos. En cuanto a la selección genotípica por prueba de progenie, los individuos se seleccionan en base al valor medio de su progenie y es considerado un tipo de selección familiar (Falconer y Mackay, 1996).

Se ha trabajado en estudiar que método es el más adecuado para incrementar la producción de biomasa en diferentes especies forrajeras (Casler, 2008; Marcón et al., 2020). Sin embargo, poco se conoce sobre que método resulta más eficiente en el incremento de la tolerancia a estrés en *P. coloratum*.

En base a lo anterior, se plantean las siguientes hipótesis:

### **Hipótesis**

Las plantas de las variedades *coloratum* y *makarikariense* de *P. coloratum* presentan diferencias en la expresión de caracteres morfológicos, fisiológicos y de daño oxidativo cuando crecen expuestas a estrés combinado de salinidad e hipoxia.

Es posible incrementar la frecuencia de genes asociados a la tolerancia al estrés combinado en *P. coloratum*, mediante el cruzamiento de genotipos seleccionados como más promisorios.

### **Objetivo general**

El objetivo general es estudiar la respuesta al estrés combinado de salinidad e hipoxia en dos variedades de *P. coloratum* mediante caracteres morfológicos, fisiológicos y de daño oxidativo, y en base al cálculo de parámetros genéticos, determinar el mejor

método de selección para lograr poblaciones con tolerancia incrementada a estrés por salinidad-anegamiento.

### **Objetivos específicos**

Comparar la respuesta fisiológica y oxidativa en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum*. (Capítulo 2).

Comparar la respuesta morfológica y la acumulación de biomasa aérea y radicular en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum*. (Capítulo 3).

Con la finalidad de incrementar la frecuencia de genes asociados a la tolerancia al estrés combinado se plantea:

Estimar parámetros genéticos en caracteres relacionados a la respuesta al estrés combinado en una muestra al azar de familias de medios hermanos de *P. coloratum* por selección fenotípica individual. (Capítulo 4)

Estimar parámetros genéticos en caracteres relacionados a la respuesta al estrés combinado en una muestra al azar de familias de medios hermanos de *P. coloratum* por selección genotípica por prueba de progenie. (Capítulo 4)

Estimar y comparar el avance genético por selección individual y prueba de progenie luego de un ciclo de selección (Capítulo 4)

## Capítulo 2

### Estudio de la respuesta fisiológica y oxidativa a condiciones de salinidad e hipoxia en *Panicum coloratum* L.

#### Introducción

La expansión de la frontera agrícola provocó la relocalización de la producción ganadera a zonas con restricciones edafo-climáticas, entre ellas, suelos de moderada a alta salinidad combinada en algunos casos con anegamiento (Paruelo et al., 2006; Manuel-Navarrete et al., 2009). Para incrementar la oferta forrajera, en estos ambientes, se han incorporado especies capaces de tolerar estas condiciones, entre ellas, *P. coloratum*, una gramínea perenne de crecimiento estival (Petruzzi et al., 2003).

La salinidad impacta negativamente en el crecimiento de las plantas, la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la zona de exploración del sistema radicular produce dos efectos. Un efecto directo que comienza inmediatamente después del incremento en la concentración de sales alrededor de la zona de raíces (efecto osmótico), reduciendo la disponibilidad de agua para las plantas (Munns y James, 2003; Munns y Tester, 2008). El segundo efecto es debido a la toxicidad que se produce a causa de la acumulación, dentro de la planta, de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . En el interior de la célula, la toxicidad iónica depende de su ubicación subcelular. La acumulación de iones en un tejido vegetal puede exceder la capacidad de las células para compartimentarlos en la vacuola (Møller y Tester, 2007). En este último caso, la acumulación de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma provoca un desbalance osmótico y toxicidad metabólica afectando la presencia de elementos esenciales como  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^+$  en el citoplasma (Greenway y Munns, 1980; Munns y Tester, 2008). El  $\text{K}^+$  está involucrado en el balance iónico del citoplasma, la activación de reacciones enzimáticas y la regulación de la presión de turgencia. Debido a las similitudes fisicoquímicas con el  $\text{Na}^+$ , estos iones compiten por sus sitios de ingreso a la célula culminando en muchos casos con la deficiencia intracelular de  $\text{K}^+$ . En genotipos de *Triticum aestivum* se encontró una correlación entre la relación  $\text{K}^+ : \text{Na}^+$  y el grado de tolerancia a la salinidad (Sairam et al., 2002). Incluso, Cardamone et al., (2018) demostró la existencia de variabilidad genética en la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en plántulas de *P. coloratum* var *makarikariense* creciendo en condiciones de salinidad. Pittaro et al., (2015) arribó a resultados similares hallando variabilidad en la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* creciendo en medio salino. Por este motivo la relación

K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup> resulta importante como un indicador de la tolerancia a estrés salino (Munns, 1985).

En respuesta a este estrés, existen diferentes rasgos de adaptación por parte de las plantas que les permiten mantener el crecimiento bajo estas condiciones. Entre ellos, restricción al ingreso de iones potencialmente tóxicos y acumulación de solutos orgánicos como prolina y glicina-betaína, tanto en citosol como en vacuola, lo que permite mantener la turgencia celular (Munns y Tester, 2008; Munns et al., 2020). Otra respuesta directa generada por el estrés osmótico provocado por la salinidad, incluso previo a que el NaCl comience a acumularse a niveles altos en las hojas, es la reducción en la conductancia estomática (Munns y James, 2003), lo que provoca la caída en la tasa fotosintética y por consiguiente en la tasa de crecimiento. La reducción de la conductancia estomática provoca una menor tasa de transpiración y a raíz de esto, menor pérdida de calor, provocando un incremento en la temperatura foliar (Pallas et al., 1967). En este sentido, Tian et al., (2020) observaron incrementos en la temperatura del canopeo en pasturas de *Medicago sativa* creciendo en condiciones de salinidad. En el pasado, ya se ha discutido la utilización de la temperatura del canopeo como criterio de selección, razonando que las plantas con temperaturas más frías en el dosel están transpirando a tasas más altas y, de esta manera, son capaces de alcanzar tasas fotosintéticas, crecimiento y rendimiento relativamente altos (Pinter et al., 1990). En *P. coloratum*, hasta el momento, no existen reportes acerca de la influencia de la salinidad en la temperatura foliar.

En cuanto a la hipoxia, efecto directo producto de la caída en la concentración de oxígeno en suelos anegados, provoca que el metabolismo aeróbico de producción de energía cambie a una respiración anaeróbica o fermentativa mucho menos eficiente en la producción de ATP (Voeselek et al., 2006). Esta crisis energética puede provocar un incremento en la absorción y transporte de iones por parte de las raíces (Jackson et al., 1981). Para contrarrestar estos efectos, existe una respuesta común a nivel anatómico que es la generación de tejido arenquimático (Colmer y Voeselek, 2009). Este tejido consiste en una serie de espacios interconectados que facilitan el transporte de oxígeno desde los brotes hacia las raíces permitiendo mantener la respiración aeróbica y consecuentemente su crecimiento (Striker, 2012). Existen especies que poseen un aerénquima constitutivo, es decir, presentan este tipo de tejido incluso previo a enfrentarse a una situación de estrés por hipoxia (Colmer, 2003). Además, estas plantas son capaces de incrementar el porcentaje de tejido arenquimático frente a la hipoxia. Este es el caso de *P. coloratum*,

donde se ha observado la presencia de aerénquima constitutivo y la capacidad de incrementar la proporción de este tejido frente a condiciones de estrés por anegamiento (Imaz et al., 2015).

Al igual que en condiciones de salinidad, se ha reportado además, que en plantas creciendo en condiciones de hipoxia, puede caer la conductancia estomática y las tasas de transpiración y fotosíntesis (Striker et al., 2005; Teakle et al., 2007). En relación con esto, se han registrado incrementos en la temperatura foliar de plantas de *Arabidopsis thaliana* creciendo en condiciones de anegamiento, debido a una reducción en la conductancia estomática (Xu et al., 2019). Sin embargo, en una especie tolerante a condiciones de hipoxia como *Paspalum dilatatum*, Insausti et al., (2001) observaron incrementos en la tasa de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática, como así también una menor temperatura foliar, en plantas de esta especie creciendo en condiciones de anegamiento. Todos estos cambios tienen un impacto directo en la acumulación de biomasa por parte de las plantas.

Ante condiciones de estrés abiótico, como el caso de salinidad y anegamiento, numerosas investigaciones muestran el aumento del estrés oxidativo, fenómeno de ocurrencia normal en la planta que incluye la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como, ión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), (Ashraf y Foolad, 2007; Ashraf, 2009). El aumento de los niveles de EROs conduce al daño oxidativo de proteínas, ADN y lípidos (Mittler, 2002; Farooq et al., 2009; Gill y Tuteja, 2010b). Para mantener este balance las plantas presentan compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que les permiten contrarrestar los efectos fitotóxicos causados por las EROs (Gill y Tuteja, 2010a). La actividad de las enzimas Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasa (SOD) han sido estudiadas para describir la respuesta antioxidante enzimática frente a condiciones de estrés por salinidad, sequía, anegamiento y altas temperaturas (Castelli et al., 2010; Jimenez et al., 2012; Tommasino et al., 2018). La enzima SOD cataliza la dismutación del ión superóxido ( $O_2^-$ ) en oxígeno ( $O_2$ ) y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), mientras que la enzima CAT, cataliza la descomposición del  $H_2O_2$  en oxígeno ( $O_2$ ) y agua ( $H_2O$ ). Del mismo modo, la respuesta antioxidante no enzimática comprendida por compuestos como Glutatión reductasa, Ascorbato peroxidasa, Carotenoides, entre otros, ha sido estudiada a partir de la capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) para determinar el poder reductor total. En esta

técnica, se mide la reducción del ión férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) en la presencia de componentes antioxidantes (Benzie y Strain, 1996).

En condiciones de estrés donde el equilibrio entre producción y eliminación de especies reactivas del oxígeno se interrumpe, es posible cuantificar el daño oxidativo a través del contenido de malondialdehído (MDA), un producto de la peroxidación de lípidos de membrana. El valor de MDA ha sido usado como un buen indicador del daño provocado por radicales libres en la membrana celular (Castelli et al., 2010; López Colomba et al., 2013). Incluso, se ha planteado la posibilidad de realizar selección de genotipos tolerantes a condiciones de estrés mediante la cuantificación del contenido de MDA (Tommasino et al., 2012).

Además de comprender la respuesta fisiológica frente a condiciones de estrés, se ha trabajado en estudiar la existencia de variabilidad genética en este tipo de respuesta. Así, la identificación de genotipos tolerantes permite hacer comparaciones entre individuos contrastantes y estudiar los mecanismos de tolerancia. En genotipos de *Triticum turgidum* y *Thynopirum sp.* se ha observado que aquellos que presentan mayor tolerancia a salinidad son los que logran una mayor exclusión de  $\text{Na}^+$  manteniendo los niveles de  $\text{K}^+$  (Munns, 2005; Jenkins et al., 2010). En plántulas de *Cenchrus ciliaris* se observó menor daño oxidativo y mayor respuesta antioxidante en genotipos tolerantes a salinidad (Castelli et al., 2010). Incluso en *P. coloratum* se reportaron diferencias en la respuesta antioxidante frente a condiciones de estrés salino entre genotipos tolerantes y susceptibles de la var. *makarikariense* (Cardamone, 2019). Si bien como se mencionara previamente, existen reportes de la respuesta antioxidante frente a condiciones de anegamiento y salinidad, hasta el momento, no existen registros acerca de la activación de la maquinaria antioxidante en gramíneas expuestas a la combinación de estos estreses.

Como se mencionó en el capítulo 1, las dos variedades de *P. coloratum* introducidas como forraje al país presentan un rango óptimo de utilización diferente (e.g. la var. *coloratum* tendría una distribución de uso recomendado en la zona pampeana central con mayor desarrollo en la parte semiárida, mientras que la var. *makarikariense* lo haría en la zona sub-húmeda de clima subtropical. Estas diferencias entre variedades podrían estar relacionadas también a diferencias en la tolerancia a estreses abióticos, por lo que resultaría interesante evaluar la existencia de variabilidad genética entre las mismas a través de su respuesta al estrés oxidativo. Si existieran tales diferencias entre variedades y si fuera posible detectarlas a través de la respuesta fisiológica al estrés oxidativo, estos

caracteres podrían constituirse como parámetros para discriminar individuos tolerantes que podrían luego ser incluidos como germoplasma base en programas de mejoramiento genético. Bajo estas premisas se plantearon las siguientes hipótesis:

#### *Hipótesis*

Las plantas de las variedades *coloratum* y *makarikariense* de *P. coloratum* presentan diferencias en la expresión de caracteres fisiológicos y de daño oxidativo cuando crecen expuestas a estrés combinado de salinidad y anegamiento.

#### *Objetivo general*

Comparar la respuesta fisiológica y oxidativa en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum*.

#### *Objetivos específicos*

Evaluar el cambio en la temperatura foliar en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Evaluar el daño oxidativo a través del contenido de MDA en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Evaluar la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Evaluar la acumulación de Prolina en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Evaluar la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

## **Materiales y Métodos**

### *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Se evaluaron dos cultivares comerciales de *P. coloratum* pertenecientes a dos variedades botánicas diferentes. El cultivar Klein (KL) perteneciente a la variedad

*coloratum* y el cultivar Kapivera INTA (KA) perteneciente a la variedad *makarikariense*. Las semillas de los dos cultivares se germinaron en macetas en invernadero durante septiembre - octubre de 2018 a 26,4°C / 18,1°C (día / noche) de temperatura con luz natural. Las plántulas al estadio de tres hojas se colocaron en bandejas de plástico de 4 litros llenas de solución nutritiva Hoagland aireada (Hoagland y Arnon, 1950). Las plántulas se mantuvieron durante cinco días en estas condiciones. Luego, se impusieron cuatro tratamientos durante 22 días: no salino-aireado (NS-A); no salino-hipoxia (NS-H); salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H). Para los tratamientos salinos, se aumentó gradualmente la concentración de sal (mediante la adición de NaCl en incrementos de 50 mM por día) hasta que se alcanzó una concentración final de 150 mM para macetas S-A y S-H. La concentración final se decidió a partir de resultados obtenidos en estudios previos evaluando diferentes concentraciones de NaCl (Lifschitz et al., 2018). En los tratamientos de hipoxia, la aireación se detuvo 24 horas antes de reemplazar la solución por una solución nutritiva de agar estancado desoxigenado para evitar un choque de anoxia (agar disuelto al 0.1% p / v agregado a la solución nutritiva) (Striker et al., 2015). El agar al 0,1% evita los movimientos convectivos en la solución y permite la acumulación de etileno generado por las plantas, tal como ocurre en suelos anegados (Wiengweera et al., 1997). Las bandejas asignadas a los tratamientos aireados (NS-A, S-A) continuaron burbujeándose con aire (aireador “Hailea ACO-6604”). Se utilizaron bandejas aireadas no salinas para la condición de control. El diseño experimental fue en bloques completamente aleatorizados con 2 variedades, 4 condiciones de crecimiento y 6 réplicas con 10 plántulas en cada bandeja (réplica), totalizando 480 plantas. Las bandejas se distribuyeron completamente al azar dentro de cada bloque, y los bloques se distribuyeron en el invernadero según el gradiente lumínico. Las bandejas se rellenaron semanalmente con solución nutritiva Hoagland según fuera necesario. La conductividad eléctrica se controló cada dos días y se mantuvo en torno a  $15 \pm 2,03 \text{ dS.m}^{-1}$  en tratamientos salinos y  $3 \pm 1,72 \text{ dS.m}^{-1}$  en tratamientos no salinos. De la misma manera, se midió periódicamente la concentración de oxígeno disuelto en la solución que resultó en promedio de  $2 \pm 0,89 \text{ mg.l}^{-1}$  en hipoxia y de  $8 \pm 0,76 \text{ mg.l}^{-1}$  en bandejas aireadas.

## **Variables bioquímicas y fisiológicas evaluadas**

### *Temperatura foliar*

La temperatura foliar fue medida mediante un termómetro infrarrojo manual (Unit 300S) sobre la hoja más joven completamente expandida al final del período de estrés (día 22). Las mediciones fueron realizadas en cuatro plantas por repetición.

### *Análisis de daño oxidativo y defensa antioxidante*

Tiempo de Muestreo: Setenta y dos horas después de que se establecieron los tratamientos, se recolectaron 4 plántulas por repetición de las condiciones de control y cada situación de estrés para evaluar el contenido de malondialdehído (MDA), el poder reductor total (FRAP) y la defensa antioxidante enzimática a través de la actividad Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasa (SOD).

### *Cuantificación del contenido de Malondialdehído (MDA)*

El contenido de **MDA** fue evaluado de acuerdo con la técnica descrita por (Heath y Packer, 1968). Se utilizaron 100 mg de muestra vegetal congelada que fueron molidos con nitrógeno líquido con 1,5 ml de ácido tricloroacético 0,1% (TCA). Posteriormente fue centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos. Luego se mezclaron 0,5 ml del extracto obtenido con 0,5 ml de una solución de 20 % de TCA con 0,5 % de ácido tiobarbitúrico (TBA) y se incubó durante 20 minutos a 90 °C en baño térmico. Posteriormente se realizó un centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue medido a 532 nm. Las mediciones se corrigieron para la turbidez inespecífica restando la absorbancia a 600 nm. Para cada muestra se realizó un control sin TBA. La concentración de MDA fue calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### *Cuantificación del poder reductor total (FRAP)*

El poder antioxidante fue evaluado mediante la medición de **FRAP** según Benzie y Strain (1996). La solución reactiva de FRAP consistió en 525 ml de buffer acetato de potasio (300 mmol / l pH 3,6), 50 ml de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazin (10 mmol / L), y 25 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  (200 mmol / l). Del extracto obtenido utilizando 100 mg de hojas molidas con 1 ml de alcohol al 80%, se utilizaron - 38 - 30  $\mu\text{l}$  que fueron mezclados con 270  $\mu\text{l}$  de solución reactiva de FRAP. Luego se incubaron las muestras durante 40 minutos y se midió la densidad óptica a 600 nm.

### *Determinación de la actividad Catalasa (CAT)*

La actividad de la enzima CAT fue medida mediante la cinética de consumo de peróxido de hidrógeno a 240 nm (Aebi, 1984). Se utilizaron 100 mg de muestra de hojas molidas y homogeneizadas en 1,5 ml con 50 mM de buffer fosfato de potasio (pH 7,4) conteniendo 1 mM de EDTA (ácido etileno di amino tetra-acético) y 1% (25 mg) de PVPP (poli vinil poli pirrolidona). Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C utilizando el sobrenadante para cuantificar la concentración de proteína y la actividad enzimática. La unidad de actividad enzimática CAT se definió como la cantidad de enzima requerida para catalizar la conversión de 1  $\mu$ mol de peróxido en agua por minuto. El contenido de proteína del extracto enzimático fue determinado de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). El contenido de proteína soluble se calculó mediante la fórmula obtenida de la curva patrón de albúmina de suero bovino. Los resultados de la actividad CAT fueron expresados en micro moles de peróxido consumido por minuto por miligramo de proteína ( $\mu$ mol / min\*mg Proteína).

### *Determinación de la actividad Superóxido dismutasa (SOD)*

La actividad enzimática de SOD fue determinada por el método descrito por Beauchamp y Fridovich, (1973) el cual se basa en la habilidad de la enzima en inhibir la reducción del nitro blue tetrazolium (NBT). Para ello fueron colocados en cada cuba 180  $\mu$ l de agua, 400  $\mu$ l de Mix (buffer de fosfato de potasio 0,05 M pH 7,8; EDTA 1  $\mu$ M, metionina 13 mM y NBT 75  $\mu$ M), 400  $\mu$ l de Riboflavina (Rb) y 20  $\mu$ l de muestra de tal manera de completar 1 ml y fue medida la absorbancia a 290 nm. La cantidad de Rb fue ajustada previamente. En el control no fue puesto extracto y se completó con agua. Las lecturas fueras hechas cada segundo hasta completar los 60 s. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que causa el 50% de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT y la actividad enzimática específica fue expresada en unidades de SOD/mg de proteína.

### *Cuantificación de iones $Na^+$ y $K^+$*

La concentración de iones  $Na^+$  y  $K^+$  se realizó mediante HPLC (Shimatzu A20). Fueron utilizados 100 mg de muestra molida en mortero con nitrógeno líquido y disuelta en 2 ml de agua milliQ. Luego fue mezclada mediante un vortex durante 10 min y centrifugada a 6000 rpm por 15 min. Por último, se realizó dilución al medio con etanol

calidad HPLC previo a realizar la medición. A partir de la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se calculó la relación  $\text{K}^+ : \text{Na}^+$ .

#### *Análisis estadístico*

Todos los datos fueron evaluados mediante un ANOVA triple con “cultivar”, “salinidad” e “hipoxia” como factores principales. Previo al análisis se comprobaron la normalidad de los errores (Shapiro y Wilk, 1965) y la homogeneidad de las varianzas (Levene, 1960). Los datos fueron transformados a  $\log_{10}$  cuando los supuestos no fueron cumplidos. Se realizó una prueba LSD de Fisher para la comparación de medias mediante el software estadístico InfoStat 2020 (Di Rienzo et al., 2020). Diferencias significativas refieren a  $p < 0.05$ .



Figura 2.1. Plántulas de *P. coloratum* creciendo bajo un sistema de hidroponia utilizado para evaluar las respuestas fisiológicas y bioquímicas bajo diferentes condiciones de crecimiento (control, salinidad, anegamiento y su combinación).

## **Resultados**

### *Efectos de la hipoxia, salinidad y el estrés combinado*

Para evaluar y comparar los efectos de la hipoxia, salinidad y el estrés combinado entre variedades de *P. coloratum*, un experimento exponiendo plántulas de Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) a los efectos de los tratamientos de salinidad e hipoxia fue llevado a cabo en condiciones de hidroponia en invernadero por 22 días. Las significancias estadísticas de los efectos de cultivar, salinidad, hipoxia y sus interacciones

son presentadas en la Tabla 2.1. A continuación se analizan cada una de las variables por separado.

Tabla 2.1. *F*-valor a partir de un ANOVA de tres vías para los efectos de “Cultivar”, “Salinidad” e “Hipoxia” en Temperatura foliar (Fig. 2.2), Contenido de Prolina (Fig. 2.7), Log<sub>10</sub> CAT (Fig. 2.6), Log<sub>10</sub> SOD (Fig. 2.5), Log<sub>10</sub> MDA, FRAP (Fig. 2.4), Na<sup>+</sup> (Fig. 2.8A), K<sup>+</sup> (Fig. 2.8B), K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup> (Fig. 2.9) en 2 cultivares de *Panicum coloratum*. Los grados de libertad para cada fuente de variación son: 1 (Cultivar: C), 1 (Salinidad: S), 1 (Hipoxia: H), 1 (S\*H), 1 (C\*S), 1 (C\*H) y 1 (C\*S\*H). gl: grados de libertad del error. Diferencias significativas: \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.001; ns, *P* > 0.05.

Parámetros	Cultivar (C)	Salinidad (S)	Hipoxia (H)	S*H	C*S	C*H	C*S*H	gl
	F	F	F	F	F	F	F	
Temperatura foliar	3.72	7.04*	0.001	0.26	3.17	0.03	0.001	35
Contenido de prolina	21.9**	65**	11.6**	21.2**	29.3**	1.88	5.24*	35
Log <sub>10</sub> CAT	0.64	1.05	10.4**	1.49	2.42	3.06	2.59	35
Log <sub>10</sub> SOD	13.4*	6.03*	1.15	0.98	2.42	0.13	0.81	35
Log <sub>10</sub> MDA	3.54	1.25	0.29	3.76	0.65	0.02	0.72	35
FRAP	9.34*	10.94*	0.55	0.77	0.17	0.75	0.17	35
Na <sup>+</sup>	216.1**	245.8**	0.15	0.34	167.3**	0.15	1.88	35
K <sup>+</sup>	57.7**	34.1**	17.8**	0.1	23.7**	0.04	0.18	35
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	32.4**	23.3**	0.17	0.01	0.34	0.06	0.49	35

### Temperatura foliar

No se observó interacción significativa para C\*S\*H, S\*H y C\*H (*p*>0.05) (Tabla 2.1). Las hojas de ambas variedades incrementaron su temperatura sólo en respuesta a la salinidad de  $28.1 \pm 0.24$  a  $29.01 \pm 0.24$  ° C en condiciones salinas y no salinas respectivamente (*p*<0.05) (Figura 2.2). No se registraron efectos de la hipoxia en la temperatura foliar (*p*>0.05).

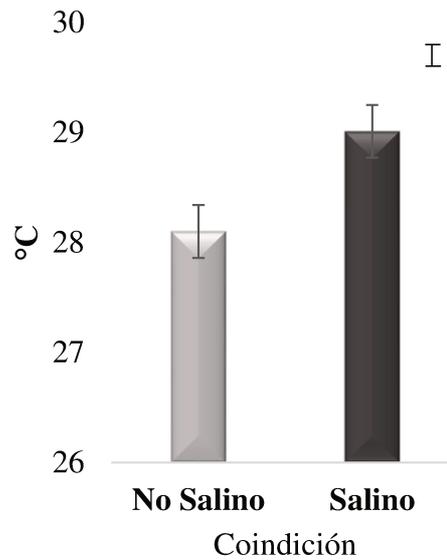


Figura 2.2. Temperatura foliar en dos cultivares de *Panicum coloratum* creciendo durante 22 días en condiciones salinas y no salinas. Los valores representan la media de 6 repeticiones  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ , DMS =  $0.44 \text{ } ^\circ\text{C}$  = 35 (para comparación de medias entre condiciones de crecimiento).



Figura 2.3. Método de medición de temperatura foliar con termómetro infrarrojo 22 días posteriores al comienzo del período de estrés.

## Daño oxidativo y respuesta antioxidante

### Contenido de malondialdehído (MDA)

El daño oxidativo en respuesta a los tratamientos fue determinado a través de la cuantificación del contenido de malondialdehído (MDA) a las 72 hs de comenzado el período de estrés. Todas las interacciones entre los factores resultaron no significativas ( $p > 0.05$ ) para el contenido de MDA (Tabla 2.1) y no se detectaron efectos significativos tanto para cultivares como para condiciones de estrés ( $p > 0.05$ ).

### Poder reductor total (FRAP)

La respuesta antioxidante fue evaluada de igual forma a las 72 hs de comenzado los tratamientos de estrés. El poder reductor total (FRAP) fue 60% superior en KL ( $p < 0.05$ ) respecto de KA ( $0.803 \pm 0.07$  y  $0.497 \pm 0.07 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$  en KL y KA, respectivamente) (Figura 2.4 A). En salinidad, el FRAP incrementó comparado con los tratamientos no salinos ( $0.82 \pm 0.07$  y  $0.49 \pm 0.07 \mu\text{mol.g PF}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 2.4 B).

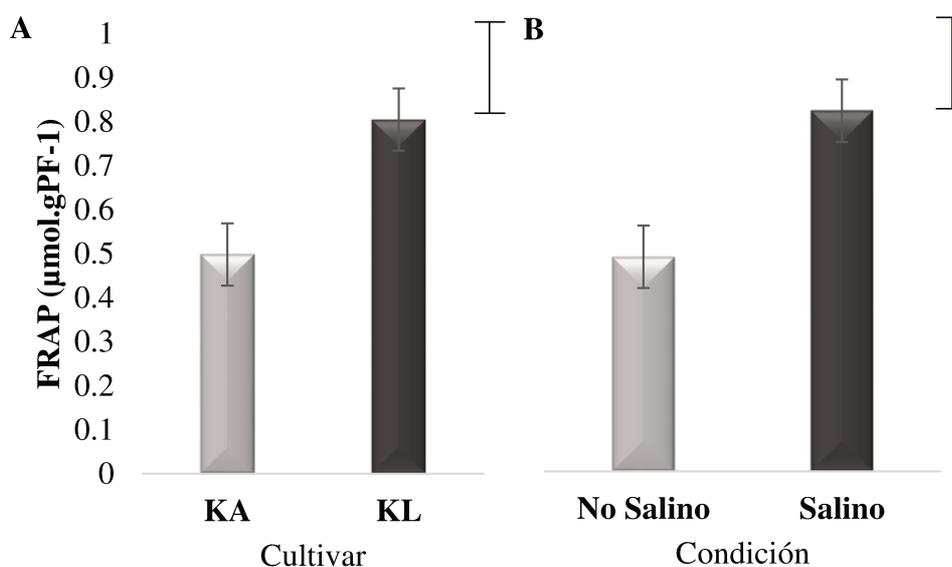


Figura 2.4. Valor FRAP ( $\mu\text{mol.gPF}^{-1}$ ) de dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salino-aireado, no salino-hipoxia, salino-aireado y salino-hipoxia durante 72 hs. (A) Los valores representan las medias para todas las condiciones  $\pm$  e.e de KA y KL. (B) Los valores representan las medias de KA y KL  $\pm$  e.e para las condiciones salinas y no salinas. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS = 0.224  $\text{gl} = 35$  (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

### Actividad Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasa (SOD)

La respuesta enzimática fue estudiada a través de la actividad (CAT) y (SOD). La interacción C\*S\*H fue no significativa para ambas enzimas (Tabla 2.1). En cuanto a la respuesta de SOD, C\*S, C\*H y S\*H fueron no significativas ( $p > 0.05$ ). Plantas de KL presentaron mayor actividad SOD que las plantas de KA ( $35.5 \pm 2.87$  y  $18.2 \pm 2.87$  USOD.mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente  $p < 0.05$ ) (Figura 2.5 A). Por otro lado, las plantas en condiciones de salinidad mostraron un incremento en el nivel de SOD por sobre aquellas creciendo en condiciones no salinas ( $31.6 \pm 2.87$  y  $22.2 \pm 2.87$  USOD.mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente  $p < 0.05$ ) (Figura 2.5 B), mientras que no se detectaron efectos de la condición de hipoxia ( $p > 0.05$ ). Para la actividad CAT, todas las interacciones resultaron no significativas (Tabla 2.1). Sólo se observó efecto de la hipoxia ( $p < 0.05$ ). Plantas creciendo en condiciones de hipoxia incrementaron su actividad CAT comparado con aquellas en condiciones aireadas ( $0.037 \pm 0.004$  y  $0.021 \pm 0.004$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 2.6).

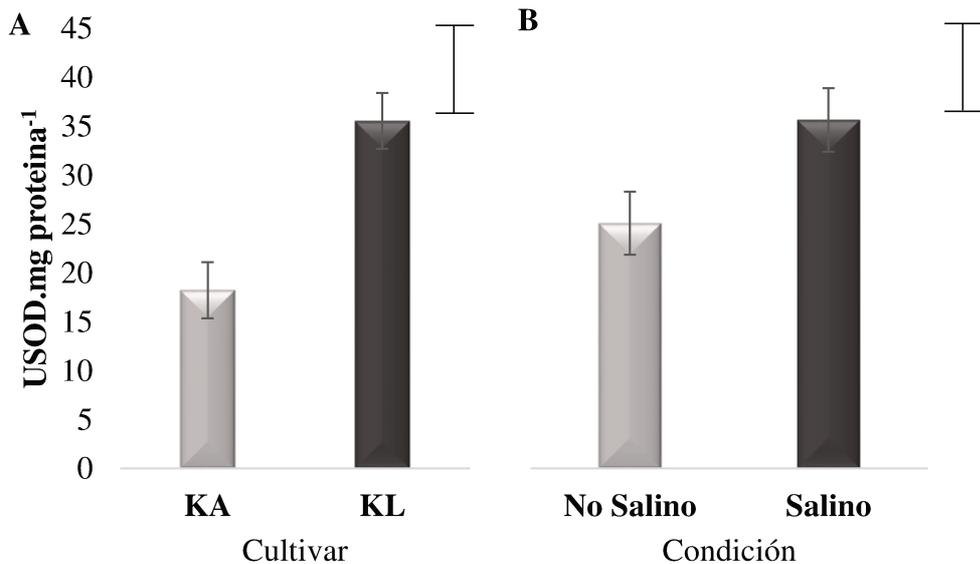


Figura 2.5. Concentración de Superóxido dismutasa en dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salino-aireado, no salino-hipoxia, salino-aireado y salino-hipoxia durante 72 hs. (A) Los valores representan las medias para todas las condiciones  $\pm$  e.e de KA y KL. (B) Los valores representan las medias de KA y KL  $\pm$  e.e para las condiciones salinas y no salinas. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS = 8.25 gl = 35 (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

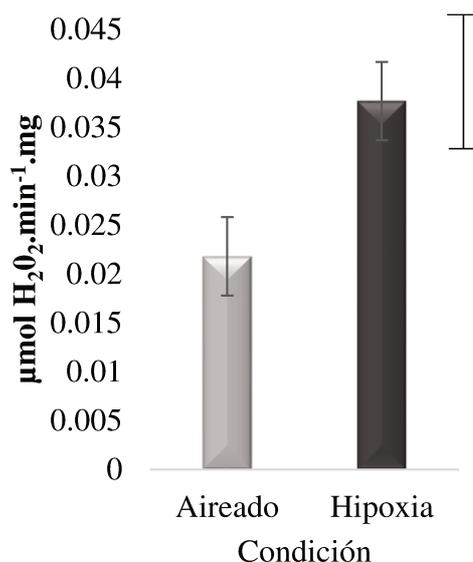


Figura 2.6. Actividad Catalasa en plántulas de dos cultivares de *Panicum coloratum*, creciendo durante 72 hs en condiciones de aireado e hipoxia. Los valores representan la media de 6 repeticiones  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ , DMS = 0.013  $gl = 35$  (para comparación de medias entre condiciones de crecimiento).

#### Contenido de Prolina

El contenido de prolina fue evaluado al día 10, luego de que las condiciones de estrés fueran impuestas. En KL, el contenido de prolina incrementó de  $12.03 \pm 3.38$   $\mu\text{mol.gPF}^{-1}$  en el tratamiento no salino-aireado a  $26.99 \pm 2.93$   $\mu\text{mol.gPF}^{-1}$  en salino-aireado y  $57.07 \pm 3.38$   $\mu\text{mol.gPF}^{-1}$  en salino-hipoxia ( $p < 0.05$ , Figura 2.3). En KA, no se registraron incrementos en el contenido de prolina en salinidad-aireado comparado con condiciones no salinas ( $p > 0.05$ ), sin embargo, se observó un incremento en la plantas creciendo en condiciones de salinidad-hipoxia ( $23.67 \pm 2.93$   $\mu\text{mol.gPF}^{-1}$   $p < 0.05$ , Figura 2.7).

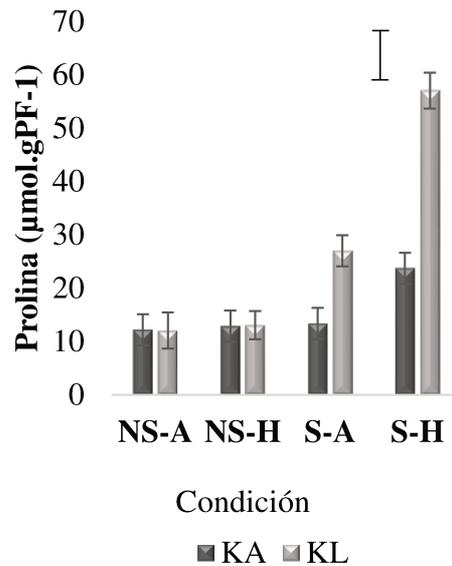


Figura 2.7. Contenido de prolina en dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo durante 10 días en condiciones no salino-aireado (NS-A), no salino-hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H). Los valores representan la media de 6 repeticiones  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ , DMS = 8.95  $\mu\text{mol.gPF-1}$  = 35 (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

#### Concentración de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$

La concentración foliar de sodio y potasio en respuesta a salinidad se muestran en la Figura 1.3. Se observó una interacción significativa C\*S tanto para el contenido de  $\text{Na}^+$  como para el de  $\text{K}^+$   $p < 0.05$ , (Tabla 2.1). La concentración de sodio incrementó en hojas de KA bajo condiciones de salinidad en un 973% comparada con la condición no salina, mientras que el incremento fue no significativo para las plantas de KL ( $p < 0.05$ ) (Figura 2.8 A). En cuanto al contenido de potasio, el mismo se redujo un 52% en KA ( $p < 0.05$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas para KL ( $p > 0.05$ ) (Figura 2.8 B). En cuanto a las condiciones de hipoxia, la concentración de potasio se redujo en un 20% comparado con las condiciones aireadas ( $p < 0.05$ ).

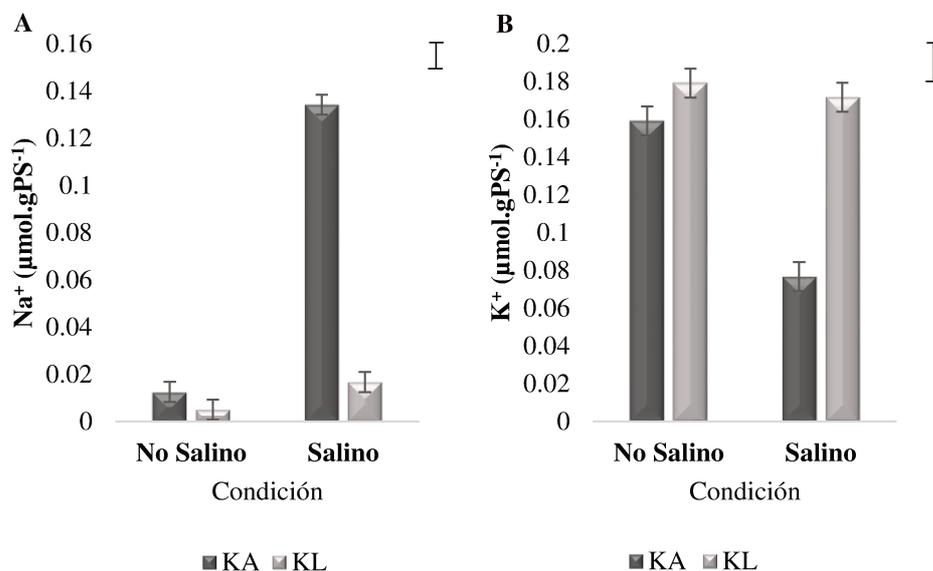


Figura 2.8. Concentración de sodio (A) y potasio (B) de dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salinas y salinas durante 22 días. Los valores representan las medias  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . (A) DMS = 0.012 gl = 35; (B) LSD= 0.02 gl = 35 (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

*Relación K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup>*

La concentración relativa de iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> presentado como K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup> mostró diferencias entre cultivares:  $0.16 \pm 0.05$  en KA y  $0.58 \pm 0.05$  en KL en concordancia con los mayores cambios observados en la concentración de iones del cultivar Kapivera INTA (Figura 2.9 A). Como se esperaba, la relación K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup> fue significativamente reducida por la salinidad comparada con la condición no salina ( $0.2 \pm 0.05$  y  $0.55 \pm 0.05$ , respectivamente) ( $p < 0.05$ ) (Figura 2.9 B).

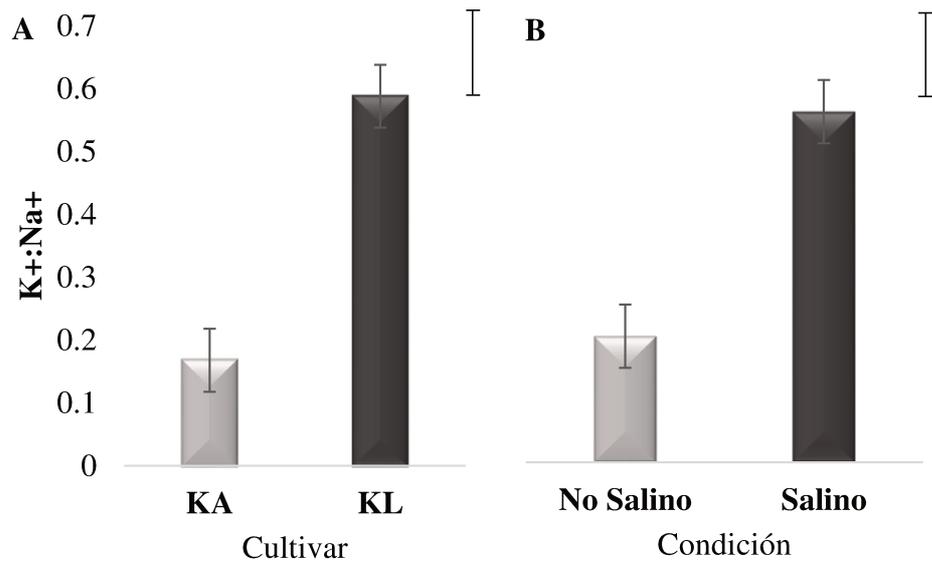


Figura 2.9. Relación K<sup>+</sup>:Na<sup>+</sup> en dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo durante 22 días bajo condiciones no salino-aireado, no salino-hipoxia, salino-aireado y salino-hipoxia. (A) Los valores representan las medias para todas las condiciones  $\pm$  e.e de KA y KL. (B) Los valores representan las medias de KA y KL  $\pm$  e.e para las condiciones salinas y no salinas. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS = 0.149 gl = 35 (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

## Discusión

El objetivo de este capítulo fue comprender la respuesta fisiológica y oxidativa frente a las condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación estableciendo diferencias y similitudes entre variedades botánicas de *P. coloratum*. En este sentido, se observaron diferencias en la respuesta a las condiciones de salinidad, la cual incrementó en ambas variedades. Si bien, no se hallaron diferencias en el daño oxidativo, la respuesta antioxidante, tanto enzimática como no enzimática aumentó en condiciones salinas. Diferencias significativas entre variedades se observaron en el contenido de Na<sup>+</sup>, con elevados incrementos de este ión en la var. *makarikariense*. Estas diferencias mencionadas determinan la aceptación de la hipótesis planteada en este capítulo.

Se observó un aumento en la temperatura foliar de plantas expuestas a condiciones de salinidad. Perera et al. (2020) reportaron incrementos en la temperatura foliar en plantas de rye grass perenne (*Lolium perenne* L.) como señal de estrés osmótico causado por la exposición a la sequía, indicando que el estrés disminuyó la conductancia estomática y la tasa de transpiración cuando los estomas se cerraron para evitar la pérdida de agua (Shabala et al., 2019). En este estudio, el incremento en la temperatura foliar registrado en plantas creciendo en condiciones de salinidad, puede reflejar un decrecimiento en la conductancia estomática para evitar la deshidratación de las hojas en un intento por regular el equilibrio hídrico, como se informó anteriormente en especies relacionadas (*Panicum antidotale* en Ashraf (2003), revisado en Munns y Tester (2008). El problema asociado a la clausura estomática es la caída en la absorción de CO<sub>2</sub>, lo cual repercute en la producción de biomasa de plantas creciendo bajo condiciones de salinidad. La temperatura foliar no incrementó en *P. coloratum* en condiciones de hipoxia sin presencia de sal, sugiriendo un fuerte efecto de la salinidad comparado con la condición de hipoxia. Sin embargo, estudios previos reportaron un decrecimiento en la conductancia estomática en plantas de *Lotus corniculatus* y *L. glaber* creciendo por 40 días bajo condiciones de hipoxia (Striker et al., 2005), indicando claramente el efecto estresante del anegamiento en estas leguminosas. Los resultados hallados en este trabajo, demuestran que plántulas de *P. coloratum* incrementan la temperatura foliar en presencia de salinidad, mientras que la condición de hipoxia no parece afectar este parámetro, sin encontrarse diferencias entre variedades botánicas.

El estrés oxidativo se define como el efecto tóxico de las especies de oxígeno químicamente reactivas (EROs) en las estructuras de las plantas. Los efectos perjudiciales

de las EROs son el resultado de su capacidad para causar peroxidación de lípidos en las membranas celulares, daño del ADN, desnaturalización de proteínas, oxidación de carbohidratos, degradación de pigmentos y un deterioro de la actividad enzimática (Gill y Tuteja, 2010a; Bose et al., 2014). En respuesta a las EROs, existen diferentes mecanismos de detoxificación tanto enzimáticos como no enzimáticos. La medición del grado en que estos mecanismos y/o parámetros se ven afectados por la salinidad y/o hipoxia permite evaluar el nivel de tolerancia del material afectado (Munns, 2002). Una forma de medir el daño oxidativo es cuantificar el contenido de malondialdehído (MDA) (Tommasino et al., 2012). Incrementos en los niveles de oxidación lipídica en términos de MDA en respuesta a diferentes estreses abióticos fue previamente reportado (Luna et al., 2002; Castelli et al., 2010; Tommasino et al., 2018) y particularmente en respuesta a condiciones de anegamiento (Wu et al., 2012). Los resultados aquí expuestos, sin embargo, no indican cambios en el contenido de MDA en respuesta a las condiciones de estrés en *P. coloratum*, a pesar de que Cardamone (2019) reportó previamente incrementos en el contenido de MDA en plántulas de la misma especie luego de 24hs expuestas a 200 mM NaCl. En este sentido, respecto a la salinidad, comparando con el estudio de Cardamone (2019) es posible que la concentración salina utilizada en este trabajo (150 mM) no sea suficiente para provocar daños a nivel de membrana y por lo tanto, no se observan incrementos en el contenido de MDA. Por otra parte, hay una diferencia en cuanto al momento de muestreo, en este estudio se lo midió 72 hs después de aplicado el estrés mientras que Cardamone (2019) lo hizo a las 24 hs por lo que es posible que el MDA se hubiera metabolizado rápidamente y aunque se hubiera producido, no pudo cuantificarse.

Las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas se inducen con frecuencia en respuesta a la alteración de la homeostasis de EROs (Mittler et al., 2011; Choudhury et al., 2017). Cambios en el valor FRAP fueron registrados a las 72 hs, la respuesta antioxidante no enzimática fue superior en plantas creciendo bajo condiciones de salinidad (tanto en aireación como en hipoxia) que en aquellas creciendo en condiciones no salinas-hipóxicas, indicando el efecto estresante de la salinidad (Popović et al., 2016). A diferencia de la respuesta no enzimática al estrés oxidativo, en la respuesta antioxidante enzimática, los aumentos en la actividad de la enzima CAT sólo se registraron en respuesta a condiciones de hipoxia a las 72 hs de impuesto el tratamiento de estrés. López Colomba *et al.*, (2013) informaron disminuciones de la actividad de CAT

después de 48 hs en plantas de *Cenchrus ciliaris* L. que crecían en condiciones salinas, lo que podría sostener al argumento de que la actividad de CAT en respuesta a la salinidad podría haberse incrementado por efecto salino y luego haber comenzado a disminuir al momento de tomar las muestras para las mediciones (72 hs post-tratamiento). Por su parte, los aumentos en la actividad de SOD sólo fueron evidentes en respuesta a la salinidad, aunque las mediciones fueron muy variables, tal como lo observado por Tommasino *et al.*, (2018) lo que sugiere que sería necesario mayor intensidad de muestreo para lograr resultados contundentes. En resumen, si bien la maquinaria de defensa antioxidante no enzimática responde frente al estrés salino, son necesarios estudios más profundos para visualizar la respuesta enzimática. Por el contrario, las plantas de *P. coloratum* solamente registraron respuesta antioxidante frente al estrés por hipoxia a través de la enzima CAT.

Se registraron aumentos en el contenido de prolina en condiciones salinas (tanto aireadas como hipóxicas). La prolina es una molécula osmoprotectora importante y también un inhibidor eficaz de EROs (Gill y Tuteja, 2010a) que se produce en respuesta al estrés osmótico y al almacenamiento de iones. Permite mejorar el ajuste osmótico y mantener la turgencia de las células (Munns, 2005; Szabados y Saviouré, 2010). La prolina se clasifica como osmolito o soluto compatible y se informó que su acumulación aumentaba en genotipos de caña de azúcar y arveja en respuesta a la salinidad (Ashraf, 2004; Singh y Sengar, 2020). En sintonía con estos resultados en *P. coloratum* var. *coloratum* (Pittaro, 2017) y var. *makarikariense* (Cardamone, 2019) se midieron incrementos de prolina en plantas expuestas a condiciones salinas. En este trabajo se registró el aumento de prolina en respuesta al estrés salino, pero no al estrés por hipoxia.

Como se mencionara previamente, plantas expuestas a salinidad experimentan cambios en la concentración de iones, ya sea por exclusión o por compartimentación de iones en vacuolas (Munns y Tester, 2008). En este estudio se observó un decrecimiento de la relación  $K^+ : Na^+$  en hojas de plantas creciendo en condiciones de salinidad. Algunos autores aseguran que la combinación de salinidad y anegamiento puede causar una crisis energética debido a la hipoxia y, por lo tanto, el desequilibrio en la concentración de iones puede exacerbarse (Barret-Lennard, 2003; Barret-Lennard y Shabala, 2013). Esta situación no se observa en este trabajo, ya que no se registraron cambios en la relación  $K^+ : Na^+$  por efecto de la hipoxia. En *P. coloratum*, el aerénquima de la raíz permitiría una aireación suficiente para sostener la producción de ATP y consecuentemente continuar con la regulación de iones y la producción de biomasa, como

se ha observado en *Lotus tenuis*, una especie tolerante a condiciones de anegamiento que también presenta aerénquima constitutivo (Teakle et al., 2007). Resumiendo, en este trabajo se observó que la relación  $K^+ : Na^+$  disminuye en presencia de sal, sin encontrarse efecto de la hipoxia sobre la acumulación de iones en plántulas de *P. coloratum*.

Para la mayoría de los parámetros fisiológicos y de respuesta oxidativa evaluados en este estudio, el efecto de la salinidad y la hipoxia combinados fue igual al efecto de la salinidad sola, indicando un mayor efecto de la salinidad que a la hipoxia. Es decir, las plantas de *P. coloratum* estarían respondiendo a la salinidad desplegando su maquinaria de respuesta al estrés, mientras que no estarían registrando la hipoxia como estrés con la misma intensidad.

Una diferencia importante entre las variedades fue en la acumulación de iones (Figura 2.8). Kapivera INTA (var. *makarikariense*) mostró fuertes aumentos de  $Na^+$  en hojas en salinidad (más del 900% en comparación con las no salinas) aunque la reducción de  $K^+$  no fue tan prominente (50% en comparación con las no salinas), mientras que la respuesta de Klein fue mucho menor. Los altos niveles de  $Na^+$  en hojas se han reportado anteriormente sólo en gramíneas halófitas. Se ha sugerido que en estos casos los iones inorgánicos podrían usarse como osmolitos de bajo costo energético siempre y cuando la concentración de iones esté por debajo de los niveles tóxicos para la especie (Lee et al., 2007). En el caso de la var. *makarikariense*, se puede afirmar que la especie puede soportar altos niveles de  $Na^+$  sin que su presencia provoque efectos tóxicos. Por el contrario, en Klein, las hojas de plantas expuestas a salinidad no mostraron cambios significativos en la concentración de  $Na^+$  y  $K^+$ . Bajos incrementos en el contenido de  $Na^+$  en hojas de *P. coloratum* cv Klein han sido previamente reportados (Pittaro et al., 2015), sugiriendo que las variedades tendrían diferentes mecanismos de protección frente al exceso de iones  $Na^+$  en el medio. Pittaro et al. (2015) también encontraron ligeros incrementos en la concentración de  $K^+$  en hojas de plantas del cv. Klein expuestas a salinidad. Incluso altos incrementos de  $K^+$  fueron reportados en otra especie del género *Panicum* como *P. antidotale* (Hussain et al., 2015), explicado por una alta selectividad de esta especie al ion  $K^+$ , lo que permitiría mantener la homeostasis iónica y consecuentemente incrementar su tolerancia al estrés salino. Tradicionalmente, la relación  $K^+ : Na^+$  ha sido reconocida como un fuerte indicador para evaluar la tolerancia a la salinidad (Jenkins et al., 2010), aunque algunos trabajos señalan que las fluctuaciones en  $Na^+$  y  $K^+$  en el tejido vegetal no necesariamente implican cambios en sus

concentraciones citoplasmáticas (Flowers et al., 2015). Por ejemplo, las plantas adaptadas a la salinidad pueden soportar una alta concentración de Na<sup>+</sup> compartimentada en orgánulos subcelulares sin afectar la homeostasis del K<sup>+</sup> y la sensibilidad al estrés (Antonelli et al., 2020). Podríamos suponer entonces que, en el caso de la var. *makarikariense*, las altas concentraciones de Na<sup>+</sup> registradas podrían explicarse por la compartimentalización del Na<sup>+</sup> en vacuolas lo que a su vez permitirá tolerar el consiguiente desbalance de la relación K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup>. Sería necesario realizar estudios en los que se pudiera medir la concentración de Na<sup>+</sup> en diferentes organelas subcelulares para comprobar esta hipótesis.

## **Conclusiones**

El presente estudio aporta conocimientos acerca de la respuesta de fisiológica y oxidativa a las condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación en dos variedades botánicas de *P. coloratum*:

La temperatura foliar de plántulas de las dos variedades *P. coloratum* incrementan en condiciones de salinidad.

No se observaron incrementos en el contenido de MDA (daño oxidativo) frente a condiciones de salinidad-hipoxia en las dos variedades *P. coloratum* después de 72 hs de aplicado el estrés.

La respuesta antioxidante no enzimática incrementa en condiciones de salinidad en las dos variedades de *P. coloratum*.

La respuesta antioxidante enzimática responde a condiciones de hipoxia a través de la enzima CAT y a salinidad a través de SOD en las dos variedades de *P. coloratum*.

El contenido de prolina incrementa en condiciones de salinidad en las dos variedades de *P. coloratum*.

La relación K<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup> disminuye en condiciones de salinidad en las dos variedades de *P. coloratum*.

El contenido de Na<sup>+</sup> incrementa significativamente en Kapivera INTA (var. *makarikariense*) sin cambios en Klein (var. *coloratum*), sugiriendo diferentes mecanismos de tolerancia al estrés entre variedades.

La condición de estrés combinado de salinidad-hipoxia, no incrementó el contenido de Na<sup>+</sup> por encima del incremento observado en la condición de salinidad en las dos variedades de *P. coloratum*.

## Capítulo 3

### Estudio de la respuesta morfológica y acumulación de biomasa en condiciones de salinidad e hipoxia en *Panicum coloratum* L.

#### Introducción

El aumento de la salinidad del suelo es una amenaza grave y global para la producción agrícola. Afecta un área superior al billón de hectáreas en más de 100 países en todo el mundo y estos números están en constante crecimiento (FAO, 2018).

El estrés por salinidad e hipoxia afecta los procesos fisiológicos y bioquímicos tal como se observó en el capítulo 2. Además de estos parámetros, las plantas sufren cambios en su morfología y consecuentemente en la producción de biomasa, de particular interés en especies forrajeras como *P. coloratum*, utilizada en ambientes con las limitantes antes mencionadas.

El efecto de la salinidad sobre las plantas se manifiesta en dos fases sucesivas luego de la exposición al medio salino. La primera, osmótica, se debe a la reducción del potencial osmótico en el suelo por presencia de las sales. La segunda fase, iónica, comienza al acumularse niveles tóxicos de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> dentro de la planta (Munns y Tester, 2008). La disminución en el potencial hídrico de un suelo salinizado provoca, al igual que la sequía, una caída en el consumo de agua y nutrientes por parte de las plantas y en consecuencia la reducción en la tasa de expansión celular. Este efecto se manifiesta tanto, con una reducción en la tasa de crecimiento como en una menor aparición y expansión foliar siendo el umbral de salinidad a partir del cual este efecto sucedería de 40 mM NaCl para la mayoría de las plantas (Munns y Tester, 2008).

El estrés osmótico no sólo tiene un efecto inmediato sobre el crecimiento, sino que también tiene un efecto mayor sobre las tasas de crecimiento, que el estrés iónico posterior, cuando los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> comienzan a ingresar al interior de las plantas (segunda fase del estrés salino). El estrés iónico impacta en el crecimiento mucho más tarde y con menos efecto que el estrés osmótico, especialmente a niveles de salinidad bajos a moderados (Munns y Tester, 2008). En los cereales la disminución en el área foliar que provoca la salinidad, esta explicada, principalmente, por la reducción del número de macollos. En dicotiledóneas la reducción del área foliar en condiciones de salinidad se debe, a un menor tamaño de las hojas y una caída en el número de ramificaciones por planta (Munns y Tester, 2008). En *P. coloratum* var. *makarikariense*

se observó una reducción del 60% en la acumulación de biomasa en plántulas creciendo en un medio con 200mM NaCl (Cardamone, 2019). Bajo la misma concentración salina, Pittaro (2017) observó una caída significativa en la tasa de crecimiento relativa en genotipos de *P. coloratum var. coloratum*. Como se mencionara anteriormente, además de afectar el crecimiento de los brotes, la salinidad impacta directamente en el sistema radicular, ya que es el primer órgano en estar en contacto con el medio salino. Los meristemas apicales son los primeros en ser dañados (Torabi y Halim, 2010) ya que la formación más lenta del área fotosintética a su vez, reduce el flujo de asimilados hacia los tejidos meristemáticos. De esta manera, el crecimiento de la planta se retrasa, tanto en las hojas como en las raíces, aunque las hojas suelen verse más afectadas que las raíces (Munns, 2011).

En cuanto a la hipoxia por anegamiento, las plantas muestran cambios como, por ejemplo, incremento en la relación tallo: raíz, aumentando la asignación de recursos hacia la parte aérea (Colmer y Voesenek, 2009; Striker, 2012). En trigo creciendo en condiciones de hipoxia se ha observado que se limita el crecimiento de las raíces existentes, sin embargo, incrementa la generación de raíces adventicias, las que desarrollan tejido aerenquimático y mantienen la oxigenación de los ápices radiculares, permitiendo su crecimiento (Herzog et al., 2016). En especies tolerantes a condiciones de hipoxia, se ha observado no sólo un incremento en la biomasa de raíces adventicias en la zona más cercana a la superficie, sino también la presencia de aerénquima constitutivo (Striker et al., 2005; Colmer y Voesenek, 2009). Además, Di Bella et al., (2014) observaron incrementos en el diámetro radicular de plantas de *Spartina densiflora* en condiciones de anegamiento intermitente y salinidad (300 mM NaCl).

Cuando la salinidad y la hipoxia ocurren simultáneamente, el efecto combinado puede tener resultados diferentes. Algunos informes afirman que la salinidad y el anegamiento que ocurren juntos pueden ser más perjudiciales para el crecimiento de las plantas que los efectos de cada estrés actuando por separado (Barret-Lennard, 2003; Kotula et al., 2019). Esto se debe a que, en especies susceptibles a condiciones de hipoxia, el ingreso de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> incrementa en la zona radicular debido a la crisis energética ocasionada por la baja concentración de oxígeno (Barret-Lennard, 2003). Simultáneamente, otros estudios señalan, para especies tolerantes al anegamiento, que el efecto del estrés combinado es similar o incluso menos dañino que el efecto esperado de los estreses actuando de forma independiente (Teakle et al., 2013; Antonelli et al., 2020).

Estos últimos resultados concuerdan con lo observado en el capítulo 2, donde la acumulación de iones en el tratamiento combinado no fue superior a aquella observada en el tratamiento salino-aireado, al igual que no se observó diferencias en la respuesta oxidativa entre estos tratamientos.

Los experimentos donde se evalúan los estreses separados y en combinación, permiten, a través de un modelo multiplicativo, comprender la interacción del efecto de los estreses en combinación (Schäfer y Piggott, 2018). Si el resultado de la combinación de estrés provoca un daño igual a la multiplicación de cada uno de los estreses por separado, la interacción se define como aditiva; si los daños son mayores en el estrés combinado que la multiplicación de los efectos de cada uno de los estreses por separado, la asociación es antagonica; y cuando el daño es menor en el estrés combinado que el que surge del efecto de cada uno de los estreses individuales, el efecto es sinérgico (Striker et al., 2015). Se aclara que se habla de multiplicación de efectos y no de sumatoria dado que la interacción entre factores es multiplicativa y no simplemente aditiva (Barret-Lennard, 2003; Barret-Lennard y Shabala, 2013).

Si bien existen reportes del comportamiento de *P. coloratum* en condiciones de salinidad e hipoxia, aún no existen registros acerca del impacto de la combinación de estos estreses sobre la morfología y la acumulación de biomasa. Dadas las diferencias mencionadas en el capítulo 1 respecto del área de distribución de las dos variedades de *P. coloratum* en Argentina y las diferencias en cuanto a las respuestas fisiológicas y bioquímicas entre las mismas, en este capítulo se propone trabajar sobre la siguiente hipótesis.

#### *Hipótesis*

Existen diferencias entre las variedades de *P. coloratum* L., expresadas en caracteres morfológicos y producción de biomasa, cuando las plantas de esta especie crecen en condiciones de estrés combinado de salinidad-hipoxia.

#### *Objetivo general*

Comparar la respuesta morfológica y la acumulación de biomasa aérea y radicular en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum*.

### *Objetivos específicos*

Evaluar la tasa de crecimiento relativa en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Evaluar la acumulación de biomasa aérea y radicular en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Evaluar cambios en la morfología aérea a través del número de macollos y hojas en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Evaluar la arquitectura radicular en plántulas de cultivares comerciales de dos variedades de *P. coloratum* creciendo en condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación.

Determinar si el efecto multiplicativo de salinidad e hipoxia en su combinación es aditivo, sinérgico o antagónico.

### **Materiales y Métodos**

#### *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Para este estudio se utilizaron plantas de las variedades *makarikariense* y *coloratum* de *P. coloratum* creciendo en hidroponía bajo tratamientos de salinidad, hipoxia y su combinación tal como fue descrito en el capítulo 2. Cuatro plántulas por tratamiento y repetición fueron extraídas para este análisis de cada una de las variedades

#### *Variables de morfología aérea*

Las plantas fueron pesadas en fresco al comienzo del experimento (PI) antes de ser colocadas en las bandejas de hidroponía. Después del período de 22 días bajo el efecto de los tratamientos se contaron el número de hojas (NH) y el número de macollos (NM). Al retirar las plantas de las bandejas se registró el peso fresco total (PFT) de las mismas y luego se las separó en partes aéreas y raíces, que fueron llevadas a la estufa donde permanecieron a 65 ° C durante 72 h hasta alcanzar un peso constante. A partir de ese material se determinaron el peso seco aéreo (PSA) y el peso seco de la raíz (PSR) (balanza “Ohaus PA-214”).

La tasa de crecimiento relativa se calculó para el peso fresco total de las plantas para cada uno de los tratamientos como:

$$TCR = \frac{\ln(PFT) - \ln(PI)}{t_2 - t_1}$$

Donde, PFT y PI representan el peso fresco final e inicial de las plantas respectivamente y  $(t_2) - (t_1)$  es la diferencia en días entre el final y el comienzo del periodo de crecimiento. El cálculo de TCR asume que las tasas de crecimiento diarias fueron constantes durante el período de 22 días.

#### *Variables de morfología radicular*

El sistema radicular fue escaneado mediante “Epson Expression 11000XL escáner” y analizado usando WinRhizo Pro software. El software permitió la determinación del largo total del sistema radicular, diámetro promedio de raíz, volumen radicular y magnitud del sistema radicular (número de ápices y bifurcaciones). Para las mediciones se tomó una planta por repetición en cada tratamiento y variedad.

#### *Análisis estadístico*

Todos los datos fueron evaluados mediante un ANOVA triple con “cultivar”, “salinidad” e “hipoxia” como factores principales. Previo al análisis se comprobaron la normalidad de los errores (Shapiro y Wilk, 1965) y la homogeneidad de las varianzas (Levene, 1960). Se realizó una prueba LSD de Fisher para la comparación de medias mediante el software estadístico InfoStat 2020 (Di Rienzo et al., 2020). Diferencias significativas refieren a  $p < 0.05$ .

#### *Interacción entre condiciones de estrés*

Para evaluar y establecer el tipo de interacción entre los estreses en estudio en su combinación (salinidad e hipoxia), se compararon los efectos observados y los predichos a partir de la combinación de ambos.

La predicción de la combinación de estreses fue estimada asumiendo un modelo multiplicativo de los efectos de cada estrés (Schäfer y Piggott, 2018) donde la adición de efectos se corresponde con la multiplicación de los efectos por separado.

El tipo de interacción se obtuvo a partir de la comparación entre los valores observados y predichos para el estrés combinado de salinidad e hipoxia. Este parámetro es útil para evaluar si el desempeño bajo estrés salino-hipóxico fue igual, mejor o peor

que el efecto predicho de los tratamientos aplicados por separado. Si el estrés combinado tiene un efecto más deletéreo que el predicho por el modelo multiplicativo, el efecto es antagónico. El efecto es sinérgico cuando ocurre lo contrario, es decir, cuando la respuesta observada en la condición salina-hipóxica es menos perjudicial que el efecto predicho de los estreses aplicadas por separado. Entonces, la ecuación utilizada por Morris *et al.*, (2007) es la siguiente:

$$L_{(\text{interacción})} = \ln (\bar{x}_{S-H}) - \ln (\bar{x}_{NS-H}) - \ln (\bar{x}_{S-A}) + \ln (\bar{x}_{NS-A})$$

Donde  $\bar{x}$  es el promedio de la biomasa seca total para cada cultivar creciendo bajo condiciones de S-H, NS-H, S-A o NS-A. Esta ecuación deriva de la transformación a una escala logarítmica de la relación entre los efectos observados (S-H/NS-A) y el efecto predicho [(NS-H/NS-A) \* (S-A/NS-A)].

La varianza de  $L_{\text{interacción}}$  fue obtenida por la ecuación de Morris *et al.*, (2007):

$$V(L_{\text{interacción}}) = \left( \frac{d.e.^2_{NS-H}}{\bar{x}_{NS-H} N_{NS-H}} \right) + \left( \frac{d.e.^2_{S-A}}{\bar{x}_{S-A} N_{S-A}} \right) + \left( \frac{d.e.^2_{S-H}}{\bar{x}_{S-H} N_{S-H}} \right) + \left( \frac{d.e.^2_{NS-A}}{\bar{x}_{NS-A} N_{NS-A}} \right)$$

Donde, d.e es el desvío estándar de la biomasa seca total de cada cultivar bajo los efectos de los tratamientos NS-H, S-A, S-H o NS-A; y  $N$  es el número de repeticiones.

Además, Morris *et al.*, (2007) utilizó la estimación de los intervalos de confianza (IC) de los efectos analizados para interpretar los resultados. El intervalo de confianza (IC) fue obtenido por el antilogaritmo de los límites de confianza para  $L_{\text{interacción}}$ , siguiendo la ecuación de Hedges *et al.*, (1999):

$$L_{(\text{interacción})} - Z_{\alpha/2} \sqrt{V} \leq L_{(\text{interacción})} \leq L_{(\text{interacción})} + Z_{\alpha/2} \sqrt{V}$$

Donde,  $Z_{\alpha/2}$  es el punto que deja  $100*(1 - \alpha/2)$  % del área bajo la curva de distribución normal y  $V(L_{\text{interacción}})$  es la varianza antes calculada.

La interacción es considerada aditiva cuando el IC contiene al 1 (crecimiento bajo condiciones S-H para el cultivar es igual al valor predicho por S-A\*NS-H). Cuando IC no contiene al 1, la interacción es sinérgica si  $L > 1$  (crecimiento bajo condiciones S-H es mayor que el predicho por S-A\*NS-H) y antagonista si  $L < 1$  (crecimiento bajo condiciones S-H es menor que el predicho por S-A\*NS-H) (Striker *et al.*, 2015).

## Resultados

### *Efectos de la hipoxia, salinidad y el estrés combinado en el crecimiento*

Para evaluar y comparar los efectos de la hipoxia, salinidad y el estrés combinado entre variedades de *P. coloratum*, un experimento exponiendo plántulas de Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) a los efectos de los tratamientos de salinidad e hipoxia fue llevado a cabo en condiciones de hidroponía en invernadero por 22 días. Las significancias estadísticas de los efectos de cultivar, salinidad, hipoxia y sus interacciones son presentadas en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. *F*-valor a partir de un ANOVA de tres vías para los efectos de “Cultivar”, “Salinidad” e “Hipoxia” en tasa relativa de crecimiento (TCR) (Figura 3.1), peso seco aéreo (PSA) (Figura 3.2), peso seco radicular (PSR) (Figura 3.3), número de macollos (NM) (Figura 3.5A), número de hojas (NH) (Figura 3.5B), largo de raíz (Tabla 3.2), diámetro de raíz (Figura 3.6), ápices raíz, bifurcaciones raíz, volumen raíz (Tabla 3.2) en 2 cultivares de *Panicum coloratum*. Los grados de libertad para cada fuente de variación son: 1 (Cultivar: C), 1 (Salinidad: S), 1 (Hipoxia: H), 1 (S\*H), 1 (C\*S), 1 (C\*H) y 1 (C\*S\*H). gl: grados de libertad del error. Diferencias significativas: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ .

<i>Parámetros</i>	Cultivar	Salinidad	Hipoxia	S*H	C*S	C*H	C*S*H	gl
	(C)	(S)	(H)					
	F	F	F	F	F	F	F	
TCR	0.55	63.31**	8.91**	1.01	2.45	1.47	0.001	35
PSA	5.18*	43.6**	7.1*	4.5*	5.4*	0.6	0.38	35
PSR	0.75	31.22**	4.45*	3.16	2.59	0.04	0.19	35
NH	28.11**	50.73**	2.96	2.37	7.76**	0.55	0.82	35
NM	27.48**	39.33**	11.78**	3.74	3.99*	0.35	0.28	35
Largo raíz	0.03	19.7**	6.62*	5.55*	0.44	1.31	0.57	35
Diámetro raíz	0.83	0.11	2.05	1.97	3.16	0.02	4.37*	35
Ápices raíz	0.71	10.5*	9.35**	1.73	0.01	2.49	0.56	35
Bifurcaciones raíz	0.0002	27.9**	9.91**	7.72*	1.29	1.07	0.2	35
Volumen raíz	0.37	22.3**	5.53*	9.76*	0.02	0.8	0.0006	35

La tasa de crecimiento relativa (TCR) en plántulas de *P. coloratum* fue calculado para la producción de biomasa total. Ninguna de las interacciones fue significativa (Tabla 3.1). Tanto la salinidad como la hipoxia redujeron la TCR. Plantas creciendo en condiciones de hipoxia sólo redujeron su TCR un 5% ( $0.20 \pm 0.003$  y  $0.19 \pm 0.003$  g g<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en aireado e hipoxia respectivamente ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 3.1A). En cuanto a la salinidad, redujo la TCR en un 26% ( $0.23 \pm 0.003$  y  $0.17 \pm 0.003$  g g<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) en condiciones no salinas y salinas respectivamente ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 3.1B).

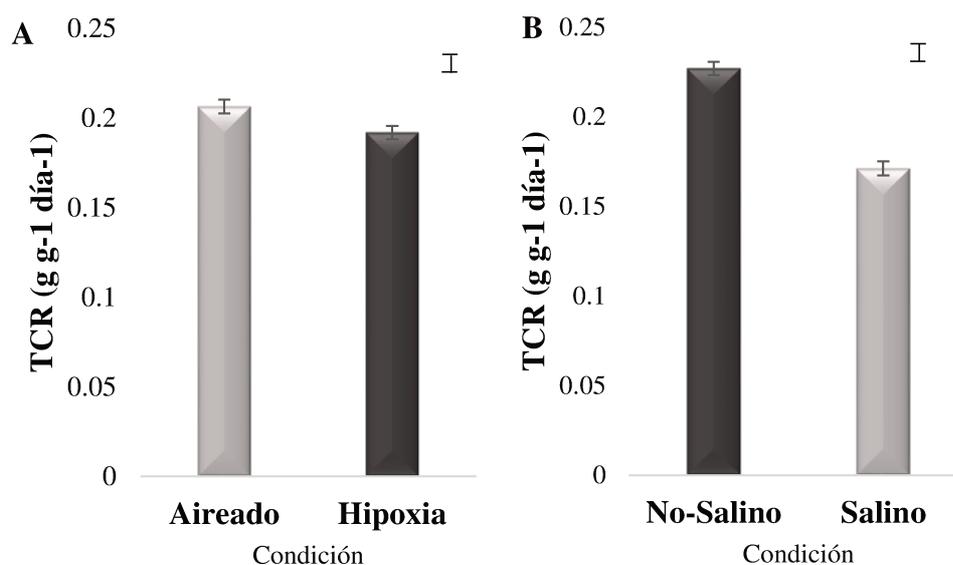


Figura 3.1. Tasa de crecimiento relativa de dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA y Klein, creciendo durante 22 días en condiciones de: A: aireado e hipoxia; B: no salino y salino. Los valores representan las medias  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS = 0.01 gl = 35 (para comparación de medias entre condiciones de crecimiento).

La reducción en el peso seco aéreo (PSA) bajo condiciones de estrés fue diferente entre variedades para la salinidad (Tabla 3.1). Luego de 22 días, plántulas de KA en salinidad redujeron en menor magnitud su PSA comparadas con plántulas de KL (56% vs 74%, respectivamente) (Figura 3.2A) ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observó el mismo efecto para el peso seco radicular (PSR) donde la reducción en condiciones de salinidad fue similar entre cultivares ( $p > 0.05$ ). Considerando el efecto de los tratamientos, se observó una interacción significativa S\*H indicando que las diferencias en la reducción de PSA causadas por la salinidad fueron menos pronunciadas en hipoxia (61%) que en aireado (70%) ( $p < 0.05$ ) (Figura 3.2B). En cuanto a PSR, la salinidad redujo la biomasa

un 50% ( $0.20 \pm 0.01$  y  $0.10 \pm 0.01$  g.planta<sup>-1</sup> en condiciones no salinas y salinas respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Figura 3.3A) mientras que la reducción en hipoxia fue solo 23% pasando de  $0.17 \pm 0.01$  g.planta<sup>-1</sup> en aireado a  $0.13 \pm 0.01$  g.planta<sup>-1</sup> en hipoxia respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Figura 3.3B).

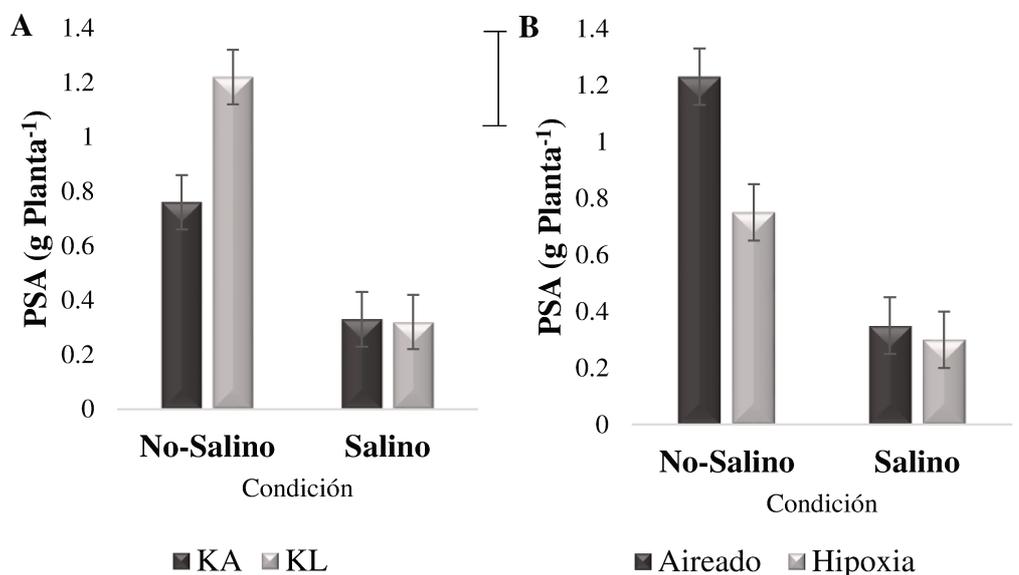


Figura 3.2. Peso seco aéreo de plántulas de *Panicum coloratum* creciendo bajo condiciones no salinas y salinas durante 22 días: A: Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) y B: aireado e hipoxia. Los valores representan las medias  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS =  $0.41$  gl = 35 (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

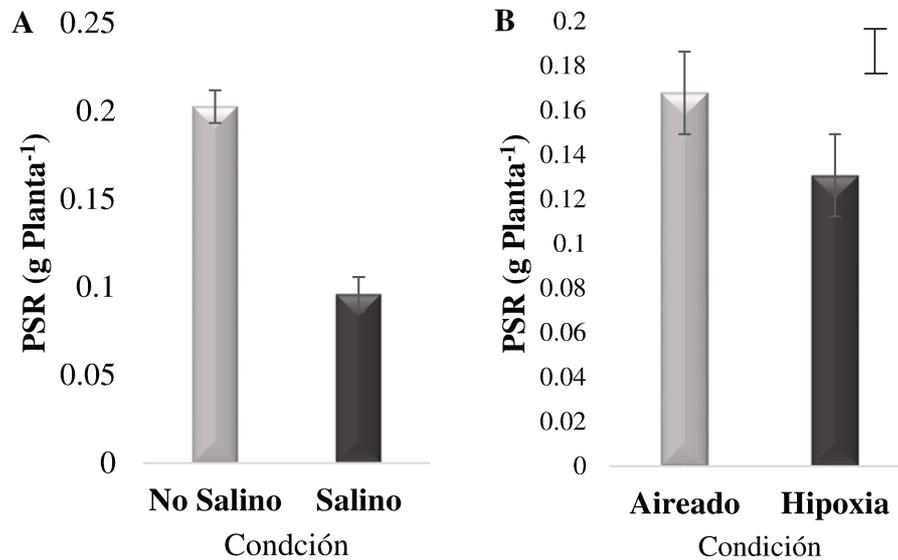


Figura 3.3. Peso seco radicular de plántulas de *Panicum coloratum* creciendo bajo condiciones: (A) no salinas y salinas; (B) aireado e hipoxia durante 22 días. Los valores representan las medias  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS =  $0.0.02 \text{ gl} = 35$  (para comparación de medias entre condiciones de crecimiento)

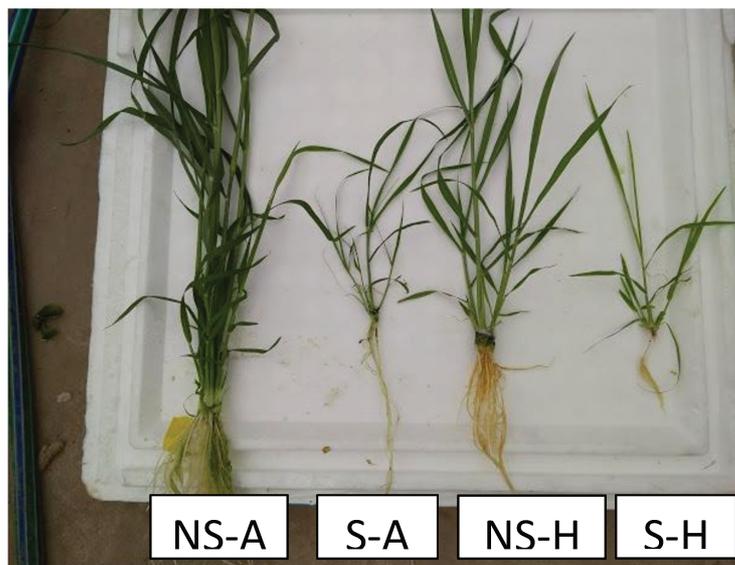


Figura 3.4. Plantas de *P. coloratum* luego de 22 días de tratamientos no salino-aireado (NS-A), salino-aireado (S-A), no salino-hipoxia (NS-H), salino-hipoxia (S-H).

Para evaluar cambios en la morfología aérea, el número de hojas (NH) y macollos (NM) fue registrado al final del período de estrés. Al igual que para los pesos, las interacciones C\*S\*H, C\*H y S\*H resultaron no significativas ( $p > 0.05$ , Tabla 3.1). Al igual que para el PSA, se observó una interacción significativa C\*S para NH y NM ( $p < 0.05$ ). La reducción en el número de macollos en respuesta a la salinidad fue mayor

para KL que para KA (45% y 39% respectivamente) (Figura 3.5A). El número de macollos fue significativamente reducido por la hipoxia ( $2.93 \pm 0.16$  y  $2.17 \pm 0.16$  en aireado e hipoxia respectivamente) ( $p < 0.05$ ). Mientras la hipoxia no redujo el número de hojas, la reducción causada por la salinidad fue más pronunciada en KL que en KA (48% y 34% respectivamente) ( $p < 0.05$ ) (Figura 3.5B).

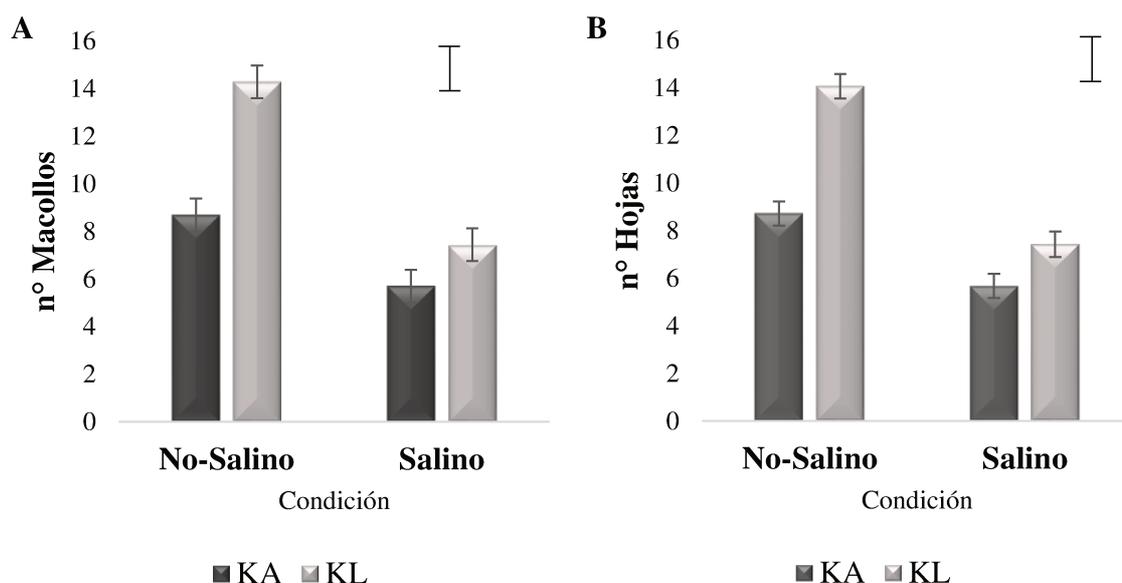


Figura 3.5. Número de macollos (A) y número de hojas (B) de dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo bajo condiciones no salinas y salinas durante 22 días. Los valores representan las medias  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS =  $0.41 \text{ gl} = 35$  (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

Para registrar los cambios en la arquitectura de raíz, se escanearon los sistemas radiculares y los datos fueron analizados mediante el software WinRhizo. La interacción C\*S\*H fue sólo significativa para el diámetro de raíz (Tabla 3.1). KA incrementó el diámetro radicular en hipoxia por sobre las otras condiciones mientras que para KL el mayor diámetro se observó en la condición de estrés combinado (S-H) y el menor diámetro se registró en plántulas creciendo en S-A y NS-H (Figura 3.6). No se observaron diferencias entre cultivares para largo, número de ápices y bifurcaciones y volumen de raíz (C\*H y C\*S no fueron significativas para estas variables, Tabla 3.1). Como para el PSA, el efecto de la salinidad fue más pronunciado en condiciones aireadas que en hipoxia para largo, ( $p < 0.05$ ) (62% vs 36%), bifurcaciones ( $p < 0.05$ ) (71% vs 49%) y volumen

( $p < 0.05$ ) (70 y 29% en aireado e hipoxia respectivamente) (Tabla 3.2). El número de ápices radiculares fue significativamente reducido por las condiciones de salinidad (50%,  $p < 0.05$ ) e hipoxia (51%,  $p < 0.05$ ).

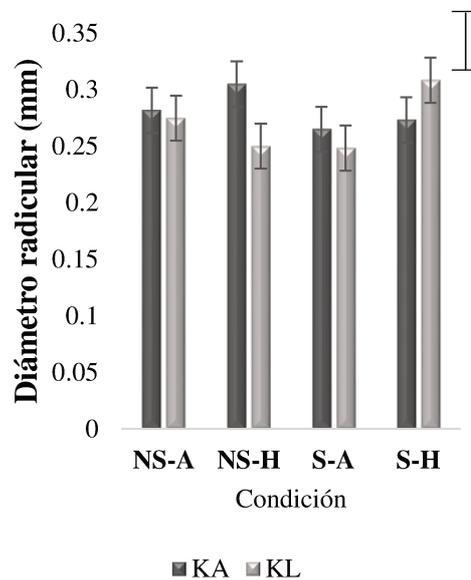


Figura 3.6. Diámetro radicular de dos cultivares de *Panicum coloratum*, Kapivera INTA (KA) y Klein (KL) creciendo por 22 días en condiciones no salino-aireado (NS-A), no salino -hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H). Los valores representan la media de 6 repeticiones  $\pm$  e.e. La diferencia mínima significativa con  $p = 0.05$ . DMS = 0.048  $gl = 35$  (para comparación de medias entre cultivares y condiciones de crecimiento).

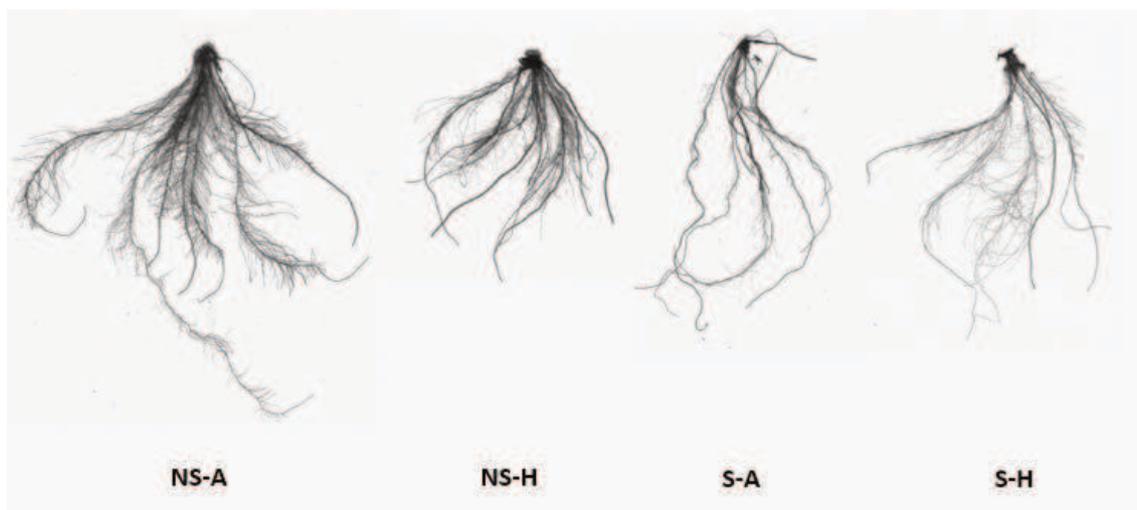


Figura 3.7. Imagen scanner “Epson Expression 11000XL” sistemas radiculares de *Panicum coloratum* bajo condición no salino-aireado (NS-A), no salino hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H).

Tabla 3.2. Parámetros de arquitectura radicular: longitud, número de bifurcaciones y volumen de dos cultivares de *Panicum coloratum* (Kapivera INTA y Klein) creciendo durante 22 días en condiciones no salino-aireado (NS-A), no salino-hipoxia (NS-H), salino-aireado (S-A) y salino-hipoxia (S-H). Los valores representan las medias  $\pm$  e.e.

Condición	Longitud (cm)	Bifurcaciones	Volumen (cm <sup>3</sup> )
NS-A	2969.8 $\pm$ 270	22640.8 $\pm$ 1969	1.8844 $\pm$ 0.17
NS-H	1599.9 $\pm$ 270	10501.5 $\pm$ 1969	0.9383 $\pm$ 0.17
S-A	1115.1 $\pm$ 270	6475.1 $\pm$ 1969	0.6675 $\pm$ 0.17
S-H	1026.5 $\pm$ 270	5383.6 $\pm$ 1969	0.5558 $\pm$ 0.17
DMS	786.8	5724.42	0.485

#### *Estrés combinado y su interacción*

Aunque los dos cultivares de *P. coloratum* fueron susceptibles a la hipoxia, salinidad y la combinación de estos estreses, la reducción en el crecimiento fue más pronunciadas en los tratamientos de salinidad. El efecto provocado sobre el crecimiento de plántulas bajo condiciones de estrés combinado fue menor que el predicho por los estreses aplicados separadamente. La interacción de los efectos y los intervalos de confianza (IC) se muestran en la figura 3.8. La interacción de efectos para ambos

cultivares de *P. coloratum* es mayor a 1 y los IC no se superpone con 1. Por lo tanto, los dos cultivares de *P. coloratum* mostraron un efecto sinérgico de los tratamientos, indicando que la producción de biomasa fue menos afectada bajo condiciones de estrés combinado que el predicho por los estreses separadamente.

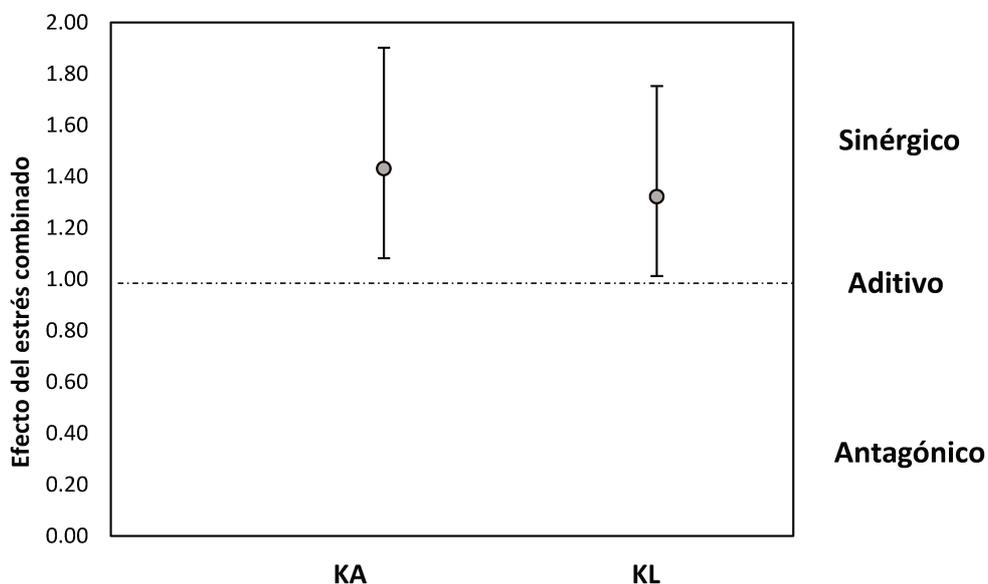


Figura 3.8. Efecto del estrés combinado en biomasa seca total de dos cultivares comerciales de *P. coloratum* Kapivera INTA (KA) y Klein (KL). El efecto del estrés se refiere a la comparación de la respuesta de las plántulas en condiciones de estrés combinado respecto al control y el producto de cada uno de los estreses por separado (NS-H y S-A). Los puntos refieren al valor medio y el intervalo de confianza del 95% para cada cultivar. La línea  $L = 1$  indica un efecto aditivo ( $S-H = NS-H * S-A$ ), valores por encima de 1 un efecto sinérgico ( $S-H > NS-H * S-A$ ) y valores por debajo de 1 un efecto antagónico ( $S-H < NS-H * S-A$ ).

## Discusión

El objetivo de este capítulo fue comparar el efecto de la combinación de salinidad e hipoxia con respecto al efecto provocado por estos estreses actuando separadamente en caracteres morfológicos y de acumulación de biomasa en dos cultivares de *P. coloratum*. Al igual que en el capítulo anterior, la salinidad provocó un mayor efecto sobre la morfología y la acumulación de biomasa que la hipoxia. En este sentido, la variedad *makarikariense* demostró mayor tolerancia al estrés que la variedad *coloratum* evidenciado por una menor reducción en la producción de biomasa. Además, la salinidad provocó cambios en la arquitectura radicular de ambas variedades. Estos resultados permiten aceptar la hipótesis planteada en este capítulo.

El crecimiento de plantas expuestas a salinidad e hipoxia por separado y en combinación fue evaluado en plantas de dos variedades de esta especie. Tanto la condición de hipoxia como salinidad redujeron la tasa de crecimiento relativa en *P. coloratum*. La hipoxia redujo la TCR en un 9.5% mientras que la salinidad lo hizo en un 26%. A pesar de esto, no existieron diferencias entre la combinación de salinidad e hipoxia y la salinidad sola. Resultados similares fueron obtenidos previamente por Alamri et al., (2013) donde accesiones de *Hordeum marinum* fueron sometidas a condiciones de salinidad y salinidad + hipoxia y no se hallaron diferencias significativas entre estos tratamientos en la reducción de la TCR. Alambri et al., 2013 además, observaron incrementos en la TCR bajo condiciones de hipoxia no salina en *H. marinum*, explicado este mayor crecimiento por un aumento en el porcentaje de aerénquima presente en raíces adventicias de plantas sometidas a condiciones hipoxia. En este sentido, resultados similares fueron observados por Ploschuk et al., (2017) para plántulas de *Phalaris aquatica*, las cuales incrementaron la TCR de la biomasa aérea en condiciones de anegamiento. En *P. coloratum*, por el contrario, se observó una leve disminución de la TCR bajo condiciones de hipoxia (Figura 3.1).

Como es de esperar, por los resultados obtenidos en la TCR, la condición de hipoxia además, reveló un ligero decrecimiento en la producción de biomasa aérea y radicular en las dos variedades estudiadas (Figura 3.2; 3.3), al igual que lo sucedido en otras especies forrajeras tolerantes a condiciones de anegamiento tales como, *Melilotus siculus*, *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* (Teakle et al., 2007; Kotula et al., 2019). Imaz et al., (2015) reportó cambios menores bajo sumersión parcial (aproximadamente 28% menos de producción que el control) en plantas de *P. coloratum var. coloratum*, usando un sistema experimental diferente a la hidroponia utilizada en este experimento. *P. coloratum* presenta aerénquima constitutivo (espacios de tejido esponjoso o canales de aire) en las raíces e incluso esta proporción de aerénquima puede incrementar cuando las plantas crecen en un medio hipóxico (Imaz et al., 2012), lo que facilita el transporte de oxígeno desde los brotes hacia raíces (Colmer, 2003; Striker, 2012). Teakle et al., (2006) demostraron que plántulas de *L. tenuis* en condiciones de aireación presentaron un 12% de aerénquima mientras que *L. corniculatus* un 9%, a pesar de que en condiciones de hipoxia ambas especies incrementaron este porcentaje, las plántulas de *L. tenuis* resultaron más tolerantes, esto indica la importancia del aerénquima constitutivo como rasgo de tolerancia a estrés por hipoxia. Resumiendo, en este estudio, las plántulas de *P.*

*coloratum* redujeron ligeramente la producción de biomasa aérea y radicular frente a la condición de hipoxia lo que estaría asociado a la presencia de tejido aerenquimático en esta especie.

Teniendo en cuenta el estrés salino, las reducciones observadas en la TCR, PSA y PSR fueron superiores a aquellas ocasionadas por la condición de hipoxia (Figura 3.1;3.2; 3.3). El mismo patrón de respuesta fue observado en el número de hojas, macollos y arquitectura del sistema radicular (Figura 3.5; Tabla 3.2). La salinidad afectó, en mayor medida, la acumulación de biomasa aérea que la radicular. Plántulas del cultivar Klein redujeron su producción de biomasa aérea en un 74% y las de Kapivera INTA un 56%, mientras que ambas variedades produjeron un 50% menos de biomasa radicular. La mayor reducción relativa de la biomasa aérea sobre la radicular bajo condiciones de estrés hídrico ha sido señalada como un mecanismo de adaptación al restringir el uso de agua por parte de la planta permitiendo así conservar la humedad presente (Munns y Tester, 2008). Entonces, aunque ambas variedades de *P. coloratum* se vieron significativamente afectadas en su crecimiento y la acumulación de biomasa, el efecto fue mayor en respuesta a la salinidad y en menor grado por la condición de hipoxia, de manera más pronunciada en la parte aérea que en la radicular en especial en el cultivar KL respecto al KA.

Si bien la condición de hipoxia redujo levemente la TCR y la acumulación de biomasa aérea y radicular, el número de hojas no se vio afectado. Esta reducción en la producción de biomasa, podría deberse entonces, a una menor producción de macollos por parte de las plantas creciendo en condiciones de déficit de O<sub>2</sub> (Figura 3.5). Ploschuk et al., (2017) sin embargo, estudiando la respuesta después de 15 días de anegamiento en 4 gramíneas forrajeras, no observaron cambios en el número de macollos en plantas de *Dactylis glomerata* y *Bromus catharticus*, mientras que halló un incremento en el número de macollos por planta en *Festuca arundinacea* y *Phalaris aquatica*. Además, en *B. catharticus*, *F. arundinacea* y *P. aquatica*, el número de hojas verdes por macollo no experimentó cambios respecto a la condición control, coincidiendo con lo observado en este estudio para *P. coloratum*. En cuanto a la condición salina, la misma afectó tanto la producción de macollos como la de hojas (Figura 3.5), esto ya había sido reportado previamente por Cardamone, (2019) en plántulas *P. coloratum* var. *makarikariense* creciendo en un medio con 200 mM NaCl, al igual que Pittaro et al., (2015) para plántulas de la var. *coloratum* sometidas a 200 y 400 mM NaCl. Resumiendo, *P. coloratum* manifiesta cambios en su morfología aérea frente a condiciones de hipoxia disminuyendo

el número de macollos contrariamente a lo observado en otras gramíneas forrajeras tolerantes a condiciones de anegamiento. Por otra parte, la salinidad afecta tanto el número de macollos como el de hojas, tal como lo reportado previamente para esta especie creciendo en altas concentraciones de NaCl (Pittaro et al., 2015; Cardamone, 2019).

La tolerancia a hipoxia de *P. coloratum* fue revelada en este estudio, además, por cambios en la arquitectura del sistema radicular (Tabla 3.2, Figura 3.6). La reducción en longitud y volumen en respuesta a la salinidad en condiciones aireadas fue dos veces superior a la reducción experimentada por las plantas creciendo en condiciones de salinidad-hipoxia (62% vs 36% y 70% vs 29% para longitud y volumen respectivamente, Tabla 3.2). La reducción provocada por los efectos de la hipoxia en salinidad fue imperceptible comparado con la disminución en condiciones no salinas tanto en el largo (8% vs. 46% en salinidad y no salino) como en volumen de raíces (16% vs 50% para salino y no salino, respectivamente). Esta diferencia estaría probablemente asociada a un decrecimiento en el consumo de nutrientes bajo condiciones de estrés salino (Wu et al., 2012). Por otro lado, no se observó un patrón de cambio claro en el diámetro radicular (Figura 3.6), a pesar de existir reportes indicando incrementos en el diámetro radicular en cultivares de *Ipomoea batata* bajo estrés por hipoxia (Nguyen et al., 2020). Incluso, se han observado aumentos en el diámetro radicular en gramíneas como *Spartina densiflora* y *Brachiaria humidicola* en anegamiento como rasgo de adaptación a estas condiciones (Cardoso et al., 2013; Di Bella et al., 2014). Los resultados observados en la arquitectura del sistema radicular coinciden con las alteraciones en la acumulación de biomasa discutidas anteriormente, donde se hizo evidente que la salinidad es el estrés que induce los mayores cambios en *P. coloratum*.

En este estudio se encontró que el valor predicho para la magnitud del efecto de la interacción entre estreses y su combinación en la producción de biomasa seca total (L interacción) para ambas variedades fue superior a 1 (Figura 3.8). Este valor, relaciona el efecto observado del estrés combinado de salinidad e hipoxia y el efecto predicho por el modelo multiplicativo de cada estrés evaluado separadamente (Schäfer y Piggott, 2018). Tanto para la var. *coloratum* como para la var. *makarikariense* el tamaño del efecto fue claramente superior a 1, determinando una respuesta de tipo sinérgica a la combinación de estreses.

La salinidad y la hipoxia combinadas no presentan más daño que la salinidad sola en las plantas de *P. coloratum*. Además, la especie se caracteriza por una alta tolerancia al anegamiento como lo demuestra su arquitectura radicular, y la capacidad de respuesta al estrés a través de la defensa antioxidante y los ajustes osmóticos (capítulo 2). Esta mayor tolerancia a la condición de hipoxia que a la salinidad y salinidad + hipoxia también fueron observados en otras especies de gramíneas como *F. arundinacea* (Menon-Martínez et al., 2021), *D. glomerata* y *B. catharticus* (Ploschuk et al., 2017), especies que se encontraron tolerantes a condiciones de hipoxia. Contrariamente, en otras especies como *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa* se reportó que la combinación de salinidad e hipoxia incrementó el daño en comparación con la salinidad sola (Barret-Lennard, 2003; Munns, 2011). Resumiendo, la salinidad y la hipoxia combinadas no presentan más daño que la salinidad sola en las plantas de *P. coloratum*, tal como lo observado en las variables bioquímicas y de respuesta oxidativa evaluadas en el capítulo 2.

#### *Diferencias entre variedades*

Incluso en especies que han demostrado ser tolerantes a la salinidad, la hipoxia o la combinación de estos estreses, la variabilidad intraespecífica en el grado de tolerancia al estrés adquiere importancia para estudios con fines de mejoramiento genético. La posibilidad de discriminar a los individuos más tolerantes o de cuantificar las diferencias en la respuesta debidas al estrés es muy apreciado al planificar un programa de mejoramiento. En este estudio, se encontró que las variedades de *P. coloratum* son altamente tolerantes a la hipoxia y moderadamente tolerantes a la salinidad y la salinidad-hipoxia combinadas.

Aunque el patrón de respuesta al estrés, en cuanto a la arquitectura del sistema radicular fue el mismo para las dos variedades, se detectaron diferencias entre las variedades para otros rasgos. Kapivera INTA (var. *makarikariense*) mostró mayor tolerancia a la salinidad y la hipoxia que el cv. Klein (var. *coloratum*) para la producción de biomasa aérea, número de macollos y hojas que se hizo evidente por una menor reducción de estas variables por los efectos de los tratamientos (Figura 3.2; 3.5). Esta diferencia podría esperarse ya que la var. *makarikariense* se originó en las llanuras de inundación del lago Makarikari en el noreste de Botswana y, por lo tanto, probablemente se adaptó a la exposición a la salinidad y a los frecuentes períodos de alternancia de sequía y anegamiento (Tischler y Ocumpaugh, 2004). Es interesante observar, que el cultivar Kapivera INTA sufrió una mayor reducción en la relación  $K^+ : Na^+$  que el cultivar Klein,

debido a una alta acumulación de Na<sup>+</sup> en hojas (capítulo 2). Sin embargo, esta acumulación de iones Na<sup>+</sup> no le significó un impacto mayor en el crecimiento y acumulación de biomasa como se observa en esta sección.

Las adaptaciones a las características de sus ambientes originales pueden dar lugar a diferencias en la tolerancia al estrés entre las variedades. Este estudio trae evidencias que respaldan las diferencias existentes en los mecanismos de tolerancia a salinidad entre variedades.

## **Conclusiones**

El presente estudio aporta conocimientos acerca de la respuesta en caracteres morfológicos y acumulación de biomasa en las condiciones de salinidad, hipoxia y su combinación en dos variedades botánicas de *P. coloratum*:

Para la mayoría de los rasgos evaluados en este estudio, el efecto de la salinidad y la hipoxia combinados fue igual al efecto de la salinidad sola en las dos variedades de *P. coloratum*.

La condición de hipoxia redujo ligeramente la TCR, mientras que se observó un efecto mayor de la salinidad sobre este parámetro en las dos variedades de *P. coloratum*.

La acumulación de biomasa, tanto aérea como radicular, se redujo significativamente en condiciones de hipoxia y salinidad, siendo esta última la condición más estresante en las dos variedades de *P. coloratum*.

El cultivar Kapivera INTA demostró mayor tolerancia a la salinidad que el cultivar Klein por menor reducción en la acumulación de biomasa respecto a la condición no salina.

La condición de hipoxia disminuyó el número de macollos por planta, sin afectar el número de hojas en las dos variedades de *P. coloratum*.

La condición de salinidad redujo el número de macollos y hojas en las dos variedades de *P. coloratum*.

La salinidad produjo reducciones significativas en el largo y volumen del sistema radicular observándose un efecto menor de la hipoxia sobre estos parámetros.

## Capítulo 4

### **Variabilidad y ganancia genética por dos métodos de selección para incrementar la tolerancia a salinidad-hipoxia en dos variedades de *Panicum coloratum* L.**

#### **Introducción**

El cambio en el uso del suelo que ha ocurrido en la Argentina en los últimos años ha provocado un desplazamiento de la ganadería a zonas con limitantes edafo-climáticas adversas, entre ellas, suelos con moderada a alta salinidad combinada en algunos casos, con periodos de anegamiento (Auer et al., 2019). Una de las alternativas para aumentar la oferta forrajera en estos ambientes es incrementar la tolerancia a estrés en especies forrajeras. Una de las especies en las que se ha trabajado en su tolerancia a estrés, a través de mejoramiento genético, es *P. coloratum* (Pittaro et al., 2015; Cardamone et al., 2018).

Uno de los pasos más importantes en el proceso de selección en un programa de mejoramiento genético cuyo objetivo es incrementar la tolerancia a estrés es identificar aquellos genotipos tolerantes. Para ello es imprescindible detectar los caracteres que están relacionados con la tolerancia, y que por lo tanto permitan discernir entre individuos tolerantes y susceptibles. Estos caracteres pueden ser de distinta naturaleza, asociados a marcadores bioquímicos, morfológicos y/o moleculares (Ashraf, 2004; Tommasino et al., 2018).

El germoplasma con mayor tolerancia es también útil a la hora de conocer las bases de la tolerancia, ya que su estudio permite entender los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la misma (Ashraf, 2009). En especies con larga historia de mejoramiento, incluso, esta información puede ser utilizada para la identificación de genes candidatos y posteriormente trabajar en su utilización dentro de los programas de mejora (Lamz y González, 2010). Sin embargo, en especies como *P. coloratum*, que aún cuenta con un escaso grado de domesticación como algunas otras forrajeras en las que no se ha explorado completamente la variabilidad genética presente (Crain et al., 2020), las alternativas para el mejoramiento genético más recomendables residen en los métodos tradicionales. Estos métodos basan su trabajo en la observación fenotípica (Fehr, 1988), y para llevarlos a cabo es imprescindible identificar y conocer los caracteres que permitan distinguir y discriminar los genotipos promisorios que puedan ser luego entrecruzados y así lograr avances importantes en el mejoramiento de la tolerancia a estrés.

Históricamente, la producción de biomasa aérea ha sido el carácter más utilizado como criterio de selección en numerosas especies forrajeras (Riday and Brummer, 2007; Zabala et al., 2018; Acikgoz et al., 2019). Más aun, la biomasa aérea ha sido tomada como parámetro para determinar la tolerancia a estreses, dada su alta correlación con la tasa de crecimiento de las plantas aún en situaciones de estrés (Pittaro et al., 2015). En relación con esto último, en los capítulos previos (capítulos 2 y 3 de esta tesis) se pudo observar que los cambios en la producción de biomasa aérea, están relacionados directamente con los cambios que se observan a nivel fisiológico en *P. coloratum* frente a condiciones de estrés combinado de salinidad-hipoxia. Es decir, que las plantas con mayor tolerancia al estrés combinado detectadas por su respuesta fisiológica, también fueron las plantas con mayor producción de biomasa en esa condición. Resulta entonces la biomasa un buen “marcador” de tolerancia fisiológica al estrés en esta especie.

La mayor parte de los caracteres de interés agronómico en especies forrajeras se heredan de forma cuantitativa, y en estos casos el método de mejoramiento más utilizado en especies alógamas es el de selección recurrente (Bernardo, 2020). La producción de biomasa es un carácter de este tipo. En la selección fenotípica recurrente, el objetivo es incrementar la frecuencia de alelos favorables en una población aislando y apareando entre sí sus mejores individuos en ciclos repetidos. Al comenzar un proceso de selección se deben evaluar los genotipos disponibles en la población. Ya que la genética de un carácter métrico gira en torno a su variación, la misma se cuantifica a través del cálculo de la varianza (Falconer y Mackay, 1996). La varianza genética puede subdividirse a su vez. Por un lado, tenemos la varianza aditiva ( $V_a$ ) que es aquella que refiere al efecto medio de los genes, también conocida como valor de cría. Por otra parte, la varianza de la interacción que es la debida a las interacciones inter-loci y por último, la varianza debida a los efectos intra-locus que conocemos como varianza de la dominancia (Falconer y Mackay, 1996). La proporción de la varianza observada debida a los efectos aditivos permite estimar la posibilidad de éxito a lograr por el proceso de selección. La varianza genética aditiva ( $V_a$ ), y su relación con la varianza fenotípica  $V_P$  determinan la heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ):

$$h^2 = \frac{V_a}{V_P}$$

La partición de la varianza permite entonces conocer la magnitud de los componentes genéticos y no genéticos sobre el total de la variación y de esta manera es

posible no sólo, estimar la heredabilidad, sino también, la ganancia genética que se lograría por selección.

Debido a que el valor de la heredabilidad depende de la magnitud de todas las componentes de varianza (genética y ambiental), es importante notar que ésta no es sólo una propiedad del carácter, sino también de la población, de la unidad de selección y de las circunstancias ambientales a las que están sujetos los individuos (Falconer, 1981; Nguyen y Sleper, 1983). Esta evaluación, permite determinar si los materiales de partida contienen suficiente variabilidad genética en las características de interés, de modo tal, que permita obtener una respuesta a la selección. De esto se desprende la importancia de evaluar cuál es el método de selección que permitiría los mayores avances y que unidad experimental es la que permite distinguir genotipos con la menor influencia ambiental posible.

Un sistema ampliamente utilizado para estudiar la tolerancia a diferentes estreses abióticos, es el cultivo en hidroponía bajo condiciones controladas (Quero et al., 2013). Este sistema permite aislar el estrés de interés, eliminando el “ruido” de otros factores que podrían intervenir y así permitir que el genotipo se exprese en toda su magnitud (Cubero, 2003). El cultivo en hidroponía ha sido ampliamente utilizado en el estudio de variabilidad genética frente a condiciones de salinidad, hipoxia o su combinación (Striker et al., 2015; Cardamone et al., 2018; Menon-Martínez et al., 2021).

En lo referido al estudio de los diferentes métodos que difieren entre sí por la unidad de selección, se ha trabajado en estudiar qué método es el más adecuado para incrementar la producción de biomasa en diferentes especies forrajeras (Casler, 2008; Marcón et al., 2020). Sin embargo, poco se conoce sobre cuál sería la metodología que resulta más eficiente en el incremento de la tolerancia a estrés. La selección fenotípica individual y genotípica por prueba de progenie son dos métodos que han sido utilizados en el mejoramiento genético de especies forrajeras (Basigalup D. y Rossanigo R., 2007) y particularmente en *P. coloratum* (Giordano et al., 2013; Pittaro et al., 2021). En la selección fenotípica individual, los individuos se seleccionan en base a sus mismos valores fenotípicos. En cuanto a la selección genotípica por prueba de progenie, los individuos se seleccionan en base al valor medio de su progenie y es considerado como un tipo de selección familiar (Falconer y Mackay, 1996).

Por último, en los programas de mejoramiento genético es común el trabajo sobre más de un carácter en simultáneo y resulta importante evaluar el grado de asociación entre

los mismos. El estudio de correlaciones genéticas ha sido ampliamente utilizado para revelar tanto, asociaciones positivas, como negativas entre caracteres (Sgrò y Hoffmann, 2004). Por esto, es un parámetro central en caracteres cuantitativos, proporcionando una medida de la tasa de respuesta de un rasgo “X” a la selección indirecta a través de un rasgo “Y”. En otras palabras, lo que se busca obtener es el grado en que un carácter responde como consecuencia de la selección sobre otro carácter que pueda ser de más fácil medida o evaluación (Roff, 1996).

El progreso genético que puede lograrse mediante selección depende entonces, de la variabilidad genética presente en la población, de la unidad de selección elegida, y de la correlación existente entre los caracteres de interés, por esto, resulta importante entender cuál es el método más adecuado para la selección de parentales que permita incrementar la tolerancia a estrés por salinidad e hipoxia en *P. coloratum*.

#### *Hipótesis*

Es posible incrementar la frecuencia de genes asociados a la tolerancia al estrés combinado en *P. coloratum*, mediante el cruzamiento de genotipos seleccionados como más promisorios.

#### *Objetivo general*

Estimar la variabilidad y ganancia genética mediante dos métodos de selección en dos variedades botánicas de *P. coloratum*.

#### *Objetivos específicos*

Estimar parámetros genéticos en caracteres relacionados a la respuesta al estrés combinado en una muestra al azar de familias de medios hermanos de dos variedades botánicas de *P. coloratum* por selección fenotípica individual.

Estimar parámetros genéticos en caracteres relacionados a la respuesta al estrés combinado en una muestra al azar de familias de medios hermanos de dos variedades botánicas de *P. coloratum* por selección genotípica por prueba de progenie.

Estimar la correlación genética entre los caracteres utilizados anteriormente en poblaciones de 2 variedades botánicas de *P. coloratum*.

Estimar y comparar la ganancia genética directa e indirecta por selección individual y prueba de progenie luego de un ciclo de selección en 2 variedades botánicas de *P. coloratum*.

## **Materiales y métodos**

### *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Plantas que componen poblaciones de apareamiento aleatorio de *P. coloratum* var. *makarikariense* y var. *coloratum* ubicadas en el campo experimental de la EEA INTA Rafaela (31° 11' S - 61° 30' O), se cosecharon individualmente para formar veinte familias de medios hermanos (FMH) de cada una de las variedades botánicas.

Semillas de cada una de las FMH fueron germinadas en macetas en invernadero durante enero de 2020 a 32.4°C / 21.1°C (día / noche), con irradiación natural. Plántulas de tres hojas se colocaron en bandejas de plástico de 4 l llenas de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) y se mantuvieron durante 7 días en estas condiciones. Posteriormente, se colocaron en condiciones de salinidad-hipoxia durante 21 días. La concentración de sal se incrementó gradualmente añadiendo 50 mM por día hasta que se alcanzó la concentración final de 150 mM. Luego, la aireación se detuvo 24 horas antes de reemplazar la solución con una solución nutritiva de agar desoxigenado para evitar un choque anóxico (agar disuelto al 0.1% p / v agregado a la solución nutritiva) (Striker et al., 2015) y se mantuvieron en estas condiciones por los 21 días de tratamiento.

El diseño experimental utilizado fue en bloques completamente aleatorizados con 4 repeticiones y 5 plántulas por bandeja totalizando 20 plántulas por FMH en total para cada variedad. La conductividad eléctrica se controló una vez a la semana y se mantuvo cerca de  $15 \pm 1,03$  dSm<sup>-1</sup>. De la misma manera, se controló el nivel de oxígeno para mantenerlo en un promedio de  $2 \pm 0,51$  mg.l<sup>-1</sup>.



Figura 4.1. Familias de medios hermanos de *Panicum coloratum* previo al trasplante a condiciones de hidroponia

#### *Variables morfológicas*

Luego de un período de 21 días el número de hojas (NH) y macollos (NM) fue registrado. Las plantas se retiraron de las macetas y se separaron en parte aérea y radicular, se registró el peso fresco de raíz (PFR) y la parte aérea secó en un horno a 65 ° C durante 72 h hasta que se alcanzó un peso constante y se determinó su peso seco (PSA) (balanza “Ohaus PA-214”).

#### *Métodos de selección*

Al contar con familias de medios hermanos se pudo obtener tanto los valores fenotípicos de cada individuo como el valor medio de cada familia. En el caso de la selección fenotípica individual (SFI) cada individuo se evaluó comparándolo con la media general de la siguiente manera ( $X_i - \bar{Y}_g$ ): donde,  $X_i$  es el valor fenotípico del individuo e  $\bar{Y}_g$  es la media general de la población para el carácter de interés. En cambio, la selección genotípica por prueba de progenie se basó en la identificación de genotipos superiores a través de la evaluación de su descendencia. Entonces, cada individuo parental se evaluó como ( $X_f - \bar{Y}_g$ ): donde,  $X_f$  es la media familiar de los individuos de la progenie y  $\bar{Y}_g$  es la media general de la población para el carácter, tal como lo descrito en (Mariotti

y Collavino, 2014). En este caso, la selección se debe realizar sobre los genotipos parentales que dieron origen a la descendencia evaluada.



Figura 4.2. Familias de medios hermanos de *Panicum coloratum* creciendo en condiciones de salinidad-hipoxia en hidroponia

#### *Variabilidad genética*

Contando con los datos de plantas individuales se utilizó el modelo propuesto por (Nguyen y Sleper, 1983) para determinar los componentes de varianza y los parámetros genéticos para ambos métodos de selección. Se utilizó un modelo lineal generalizado mixto utilizando el software infostat con interfaz R (Di Rienzo et al., 2020).

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$X_{ij} = \mu + B_i + F_j + (BF)_{ij} + E_{ij}$$

Donde  $\mu$  es la media general de la variable  $X$ ;  $B_i$  es el efecto fijo del bloque;  $F_j$  es el efecto aleatorio de la familia;  $BF_{ij}$  es el efecto de la interacción familia por bloque;  $E_{ij}$  representa el error experimental.

Las estimaciones de los componentes de varianza son usados para determinar qué proporción de la varianza fenotípica se debe a efectos genéticos aditivos ( $h^2$ ) utilizando

selección fenotípica individual y selección genotípica por prueba de progenie en base a la media fenotípica familiar.

La heredabilidad en sentido estricto en base a planta individual fue estimada para cada carácter evaluado como:

$$h^2 = \frac{4 * \sigma_F^2}{\sigma_F^2 + \sigma_E^2 + \sigma_W^2}$$

Donde,  $4*\sigma_F^2$  ( $\sigma_F^2$ : componente de varianza familiar) es un estimador de la varianza genética aditiva, mientras que en el denominador la varianza fenotípica correspondiente resulta de la suma de  $\sigma_F^2 + \sigma_E^2 + \sigma_W^2$ , donde  $\sigma_E^2$  es la varianza ambiental entre bloques y  $\sigma_W^2$  es la varianza dentro del bloque, utilizada como un estimador de la varianza dentro de familia (Maina, 2012; Cardamone, 2019).

En el caso de la heredabilidad en base a la media familiar correspondiente a la selección genotípica por prueba de progenie:

$$h^2 = \frac{\sigma_F^2}{\sigma_F^2 + \frac{\sigma_E^2}{r} + \frac{\sigma_W^2}{r * n}}$$

Donde, además de las varianzas antes mencionadas tal como en el cálculo anterior, r y n son el número de repeticiones y plantas individuales por repetición, respectivamente.

El error estándar de la heredabilidad se calculó según la aproximación de Dickerson (Dickerson, 1969).

La proporción de la distribución de la varianza entre y dentro de familias se estimó con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de variación entre familias} = \frac{\sigma_F^2}{(\sigma_F^2 + \sigma_W^2)} * 100$$

$$\% \text{ de variación dentro de familias} = \frac{\sigma_W^2}{(\sigma_F^2 + \sigma_W^2)} * 100$$

### *Estimación de ganancia genética*

Una vez obtenido el valor de heredabilidad para ambos métodos de selección y para cada una de las variables analizadas en ambas variedades de *P. coloratum* es posible estimar la ganancia genética que se obtendría luego de un ciclo de selección con una intensidad del 20% de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta G = h^2 * k * \sigma_P * C$$

Donde, C es el factor de control parental. Este factor toma diferentes valores: el valor de 1 cuando las plantas seleccionadas son plantadas juntas y aisladas en el campo y su valor es 2 cuando la unidad de selección son las plantas madre, en base al rendimiento medio de su progenie, y las mismas se aislaran para su entrecruzamiento (Sprague y Eberhart, 1977 en Nguyen y Sleper, 1983).

K = diferencial de selección estandarizado calculado como;

$$K = \frac{X_{FS} - X_{MB}}{\sigma_P}$$

Donde,  $X_{FS}$  es la media de población seleccionada (20% de individuos o familias con el mayor valor de la variable en estudio) y  $X_{MB}$  es la media de la población base, mientras que  $\sigma_P$  es el desvío fenotípico de la población base.

A partir de la ganancia genética y la media de la población base ( $X_{MB}$ ) se estimó la media mejorada ( $X_{mej}$ ), para ambos métodos de selección, es decir la media que se obtendría si se realizara la selección en estas condiciones, como;

$$X_{mej} = X_{MB} + \Delta G$$

### *Correlaciones genéticas*

Los coeficientes de correlación genética ( $r_g$ ) entre caracteres fueron obtenidos como;

$$r_g = \frac{COV_g XY}{(\sigma_g^2 X + \sigma_g^2 Y)^{1/2}}$$

Los valores de  $r_g$  obtenidos fueron comparados con el estadístico t con (n-2) grados de libertad para rechazar la hipótesis nula de  $r=0$ . El nivel de significación utilizado fue de  $\alpha=0.05$ . El valor de t se calculó como:

$$t = \frac{r_{xy} (n-2)^{0.5}}{(1-r_{xy}^2)^{0.5}}$$

#### *Co-heredabilidad y ganancia genética indirecta*

Una vez calculados los parámetros antes descriptos, se determinó la heredabilidad conjunta entre pares de caracteres (coheredabilidad =  $h^2_{xy}$ ) y el efecto indirecto que produce seleccionar por un carácter sobre el resto de los caracteres estudiados.

Las fórmulas utilizadas para el cálculo fueron las siguientes (Ghesquière et al., 1994):

$$h^2_{xy} = r_g \cdot h_x \cdot h_y$$

donde  $r_g$  es el coeficiente de correlación genética entre los caracteres x e y que se desea conocer su coheredabilidad, y  $h_x$ ;  $h_y$  representan la raíz cuadrada de las heredabilidades de cada uno de los caracteres involucrados.

Por último, se construyó una matriz para determinar la ganancia genética directa sobre el carácter seleccionado y el efecto indirecto que se produce sobre el resto de los caracteres. Para determinar el efecto indirecto ( $G_{ind}$ ) la fórmula de cálculo fue la siguiente:

$$G_{ind} = k \cdot h^2_{xy} \cdot \sigma_y$$

Donde la ganancia genética indirecta que se produce sobre el carácter 'y' al seleccionar por el carácter 'x' es igual al diferencial de selección estandarizado ( $k$ ) de la variable bajo selección (x),  $h^2_{xy}$  es la co-heredabilidad entre el par de caracteres y  $\sigma_y$  es el desvío fenotípico del carácter seleccionado indirectamente. La matriz se expresó en variación porcentual de la media general de cada carácter, de manera de poder hacer una comparación entre los distintos caracteres.

## **Resultados**

### *Distribución de la variabilidad*

A partir de las variables medidas en plántulas creciendo en condiciones de salinidad e hipoxia se estimaron los componentes de varianza y su distribución dentro de

la población para el peso seco aéreo (PSA), peso fresco radicular (PFR) y número de macollos (NM) y hojas (NH) en ambas variedades de *P. coloratum*. Las estimaciones de los componentes de varianza y la distribución porcentual de esta variabilidad se observan en la Tabla 4.1. La variabilidad dentro de familias fue proporcionalmente superior a los valores de varianza entre familias, para todos los caracteres estudiados en ambas variedades (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Estimación de componentes de varianza ( $\sigma^2_F$  entre las familias,  $\sigma^2_w$  dentro de bloque,  $\sigma^2_\varepsilon$  ambiental), distribución de los componentes de varianza entre y dentro de familias en plántulas de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* y var. *coloratum* creciendo durante 21 días en condiciones de salinidad-hipoxia para los caracteres de peso seco aéreo (PSA), peso fresco radicular (PFR), número de macollos (NM) y hojas (NH).

Variedad	Carácter	Estimación de componentes de varianza			Distribución porcentual de los componentes de varianza	
		$\sigma^2_F$	$\sigma^2_E$	$\sigma^2_w$	Dentro de familias	Entre familias
<i>Col.</i>	PSA	0.009	0.003	0.024	72.936	27.064
	PFR	0.122	0.083	0.551	81.914	18.086
	NM	0.121	0.116	0.764	86.296	13.704
	NH	0.978	0.684	4.703	82.788	17.212
<i>Mak.</i>	PSA	0.004	0.000	0.007	61.283	38.717
	PFR	0.384	0.071	0.654	62.976	37.024
	NM	0.169	0.005	0.625	78.699	21.301
	NH	0.432	0.186	1.983	82.100	17.900

#### *Heredabilidad en sentido estricto*

A partir de las estimaciones de las varianzas, según lo descrito en materiales y métodos, se estimó la heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ) para cada uno de los caracteres para ambos métodos de selección, tanto selección fenotípica individual (SFI) como selección genotípica por prueba de progenie (SGPP).

Los valores de las estimaciones de las heredabilidades para la var. *makarikariense* para los dos métodos de selección se presentan en la tabla 4.2. En general los valores fueron moderadas a altas para todos los caracteres y métodos de selección. En la tabla 4.3

se muestran los valores de las estimaciones para las var. *coloratum* para los dos métodos de selección. De la misma manera, los valores son moderados a altos, aunque en general, la var. *makarikariense* mostró valores de  $h^2$  superiores a los de la var. *coloratum*. En cuanto a los métodos de selección, en la var. *makarikariense* con excepción del carácter número de hojas, la heredabilidad para SFI fue superior a SGPP (Tabla 4.2). En el caso de la var. *coloratum* la SGPP mostró valores superiores de heredabilidad con excepción del carácter peso seco aéreo (Tabla 4.3).

#### *Diferencial de selección*

El diferencial de selección (S) es la diferencia entre los individuos selectos aplicando una intensidad del 20% en cada uno de los caracteres y la media de la población base. El diferencial de selección fue mayor en SFI para todos los caracteres en ambas variedades (Tabla 4.2 y 4.3). De la misma manera, los desvíos fenotípicos poblacionales fueron mayores en SFI que en SGPP. Sin embargo, en cuanto al diferencial de selección estandarizado (K) se observan diferencias entre variedades. En la var. *coloratum* para todos los caracteres la SFI muestra valores superiores de K. Por su parte, la var. *makarikariense*, los caracteres de biomasa como PSA y PFR presentaron valores de K superiores con la SGPP que con SFI (Tabla 4.2 y 4.3).

#### *Avance genético*

El avance genético se calculó para cada uno de los caracteres simulando una intensidad de selección del 20%. En la tabla 4.2 y 4.3 se muestran los valores de  $\Delta G$  estimados, que denotan el avance que se lograría en cada variedad, luego de un ciclo de selección discriminado para cada carácter y para los dos métodos de selección considerados.

El avance genético esperado por ciclo de selección muestra diferencias entre variedades en lo que se refiere a la metodología que lograría los mayores incrementos. En la var. *makarikariense*, solo el NH mostró mayores estimaciones de avance bajo SFI mientras que para el resto de los caracteres (PSA, PFR y NM) los mayores incrementos son estimados mediante la SGPP (Tabla 4.2). En la var. *coloratum* para PSA, PFR y NH la selección fenotípica individual muestra los mayores avances genéticos por selección y en el caso de NM sería la SGPP (Tabla 4.3).

Tabla 4.2. Componentes genéticos: Control parental (C), valor promedio de la población base ( $X_0$ ); valor promedio de la población selecta ( $X_s$ ); diferencial de selección = ( $X_s - X_0$ ) (S); heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ); diferencial de selección estandarizado (K); desvío estándar fenotípico y ganancia genética por ciclo ( $\Delta G$ ) para selección fenotípica individual (SFI) y selección genotípica por prueba de progenie (SGPP) de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* creciendo durante 21 días en condiciones de salinidad-hipoxia para los caracteres de peso seco aéreo (PSA, en gramos por planta), peso fresco radicular (PFR, en gramos por planta), número de macollos (NM) y hojas (NH).

<i>var. makarikariense</i>	Caracter	C	$X_0$	$X_s$	S	K	$\sigma_p$	$h^2$	$\Delta G$
<b>SFI</b>	<b>PSA</b>	1	0.18	0.34	0.16	1.45	0.11	1.51 ( $\pm 0.54$ )	0.16 (g)
	<b>PFR</b>	1	1.75	3.40	1.65	1.57	1.05	1.38 ( $\pm 0.51$ )	1.65 (g)
	<b>NM</b>	1	1.73	3.24	1.51	1.69	0.89	0.85 ( $\pm 0.33$ )	1.28
	<b>NH</b>	1	5.14	7.56	2.42	1.50	1.61	0.66 ( $\pm 0.3$ )	1.60
<b>SGPP</b>	<b>PSA</b>	2	0.18	0.29	0.11	1.57	0.07	0.91 ( $\pm 0.32$ )	0.20 (g)
	<b>PFR</b>	2	1.75	2.85	1.1	1.67	0.66	0.88 ( $\pm 0.33$ )	1.94 (g)
	<b>NM</b>	2	1.73	2.415	0.685	1.52	0.45	0.84 ( $\pm 0.32$ )	1.15
	<b>NH</b>	2	5.14	6.275	1.135	1.49	0.76	0.75 ( $\pm 0.33$ )	1.7

Tabla 4.3. Componentes genéticos: Control parental (C), valor promedio de la población base ( $X_0$ ); valor promedio de la población selecta ( $X_s$ ); diferencial de selección ( $S$ ) = ( $X_s - X_0$ ); heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ); diferencial de selección estandarizado ( $K$ ); desvío estándar fenotípico y ganancia genética por ciclo ( $\Delta G$ ) para selección fenotípica individual (SFI) y selección genotípica por prueba de progenie (SGPP) de *Panicum coloratum* var. *coloratum* creciendo durante 21 días en condiciones de salinidad-hipoxia para los caracteres de peso seco aéreo (PSA, en gramos por planta), peso fresco radicular (PFR, en gramos por planta), número de macollos (NM) y hojas (NH).

<i>var. coloratum</i>	Caracter	C	$X_0$	$X_s$	S	K	$\sigma_p$	$h^2$	$\Delta G$
SFI	PSA	1	0.32	0.58	0.26	1.38	0.19	1 ( $\pm 0.41$ )	0.26 (g)
	PFR	1	1.69	2.92	1.23	1.42	0.87	0.64 ( $\pm 0.32$ )	0.79 (g)
	NM	1	2.16	3.40	1.24	1.24	1	0.48 ( $\pm 0.28$ )	0.60
	NH	1	6.08	9.70	3.62	1.44	2.52	0.61 ( $\pm 0.32$ )	2.21
SGPP	PSA	2	0.32	0.46	0.14	1.37	0.1	0.83 ( $\pm 0.34$ )	0.23 (g)
	PFR	2	1.69	2.22	0.53	1.30	0.41	0.72 ( $\pm 0.36$ )	0.77 (g)
	NM	2	2.16	2.67	0.50	1.17	0.43	0.64 ( $\pm 0.37$ )	0.65
	NH	2	6.08	7.52	1.44	1.22	1.18	0.71 ( $\pm 0.37$ )	2.05

### Correlación genética

La determinación del grado de asociación entre caracteres se evaluó por medio del coeficiente de correlación genética en poblaciones de *P. coloratum* var. *coloratum* y var. *makarikariense*. En las tablas 4.4 y 4.5 se observa la correlación genética entre los caracteres evaluados. Todas las correlaciones entre caracteres fueron altas y positivas para ambas variedades.

Tabla 4.4. Correlaciones genéticas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia.

	<b>PSA</b>	<b>PFR</b>	<b>NM</b>	<b>NH</b>
<b>PSA</b>		0.98 ( $\pm 0.01$ )*	0.97 ( $\pm 0.05$ )*	0.94 ( $\pm 0.06$ )*
<b>PFR</b>			1.00 ( $\pm 0.03$ )*	0.98 ( $\pm 0.05$ )*
<b>NM</b>				1.00 ( $\pm 0.05$ )*
<b>NH</b>				

Para cada variable el valor representa al coeficiente de correlación  $\pm$  d.e. (\* =  $p < 0,05$ )

Tabla 4.5. Correlaciones genéticas entre pares de caracteres en *Panicum coloratum* var. *coloratum* creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia.

	<b>PSA</b>	<b>PFR</b>	<b>NM</b>	<b>NH</b>
<b>PSA</b>		0.94 ( $\pm 0.05$ )*	0.96 ( $\pm 0.06$ )*	0.99 ( $\pm 0.05$ )*
<b>PFR</b>			0.90 ( $\pm 0.08$ )*	0.92 ( $\pm 0.07$ )*
<b>NM</b>				0.98 ( $\pm 0.02$ )*
<b>NH</b>				

Para cada variable el valor representa al coeficiente de correlación  $\pm$  d.e. (\*  $p < 0,05$ )

### Co-heredabilidad

A partir de los coeficientes de correlación genética y la heredabilidad en sentido estricto estimada tanto para selección fenotípica individual (SFI) como para la selección genotípica por prueba de progenie (SGPP), se generó una matriz de heredabilidades y co-heredabilidades entre caracteres para *P. coloratum* var. *makarikariense* (Tabla 4.6) y var. *coloratum* (Tabla 4.7). En ambas variedades y para ambos métodos de selección los valores de co-heredabilidad no superaron a los valores de heredabilidad en sentido estricto de los caracteres individuales. No obstante, se observan valores de co-heredabilidad

superiores en la var. *makarikariense* (Tabla 4.6) por sobre aquellos obtenidos en la var. *coloratum* (Tabla 4.7)

Tabla 4.6. Heredabilidad en sentido estricto (en diagonal y negrita) y Coheredabilidad entre pares de caracteres para: (A) selección fenotípica individual (SFI) y (B) selección genotípica por prueba de progenie (SGPP) en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia.

(A)	SFI				(B)	SGPP			
	PSA	PFR	NM	NH		PSA	PFR	NM	NH
PSA	<b>1.51</b>	0.98	0.89	0.76		<b>0.91</b>	0.88	0.85	0.78
PFR		<b>1.38</b>	0.89	0.80			<b>0.88</b>	0.83	0.80
NM			<b>0.85</b>	0.75				<b>0.84</b>	0.79
NH				<b>0.66</b>					<b>0.75</b>

Tabla 4.7. Heredabilidad en sentido estricto (en diagonal y negrita) y Coheredabilidad entre pares de caracteres para: (A) selección fenotípica individual (SFI) y (B) selección genotípica por prueba de progenie (SGPP) en *Panicum coloratum* var. *coloratum* creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia.

(A)	SFI				(B)	SGPP			
	PSA	PFR	NM	NH		PSA	PFR	NM	NH
PSA	<b>1.00</b>	0.60	0.46	0.60		<b>0.83</b>	0.56	0.51	0.58
PFR		<b>0.64</b>	0.28	0.36			<b>0.72</b>	0.41	0.47
NM			<b>0.48</b>	0.29				<b>0.64</b>	0.45
NH				<b>0.61</b>					<b>0.71</b>

#### *Respuesta directa e indirecta*

En las tablas 4.8 y 4.9 se observan las ganancias porcentuales por encima de la media poblacional que se obtendría luego de un ciclo de selección y las ganancias indirectas sobre los caracteres no selectos. Si leemos la tabla en sentido horizontal observamos el impacto que tiene la selección por un carácter sobre el resto. En cambio,

si leemos la tabla en sentido vertical, podemos observar si para alguna variable la selección indirecta produce mejores ganancias que la selección directa.

Para ambas variedades y métodos de selección se estiman ganancias indirectas positivas en todos los caracteres bajo estudio. Para la variedad *makarikariense* bajo un esquema de selección fenotípica individual (Tabla 4.8A) la selección directa sobre PSA provocaría un 88.6% de incremento sobre el valor de la media; mientras que si la selección se realiza indirectamente a través otro carácter como PFR provocaría un 94% de incremento en PSA y si se hace por NM, el aumento es de 92.4% en PSA, es decir se podrían obtener mayores avances mediante selección indirecta. Si bien las ganancias directas en la SGPP son superiores a las observadas en SFI (Tabla 4.8) las ganancias indirectas son menores a las calculadas para SFI.

En la var. *coloratum* (Tabla 4.9) al igual que en la var. *makarikariense* las ganancias indirectas que provocaría la SFI son mayores que las observadas en SGPP. Para ambos métodos de selección las ganancias directas son superiores a las indirectas con excepción del número de macollos donde su ganancia directa es de 27.6%, sin embargo, al seleccionar por PSA su ganancia sería del 29.4%.

Tabla 4.8. Ganancia directa sobre el carácter seleccionado (en diagonal y negrita) y efecto indirecto sobre el resto de los caracteres para: (A) selección fenotípica individual (SFI) y (B) selección genotípica por prueba de progenie (SGPP) en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia.

(A)	SFI				(B)	SGPP			
	PSA	PFR	NM	NH		PSA	PFR	NM	NH
PSA	<b>88.6</b>	85.3	66.7	34.7	<b>111.1</b>	51.9	34.6	18.0	
PFR	94.0	<b>94.2</b>	72.2	39.2	57.0	<b>110.8</b>	36.2	19.7	
NM	92.4	90.7	<b>73.9</b>	39.6	50.1	50.3	<b>66.4</b>	17.8	
NH	70.0	71.7	57.8	<b>31.0</b>	45.0	44.7	30.8	<b>33.0</b>	

\*La tabla se lee en sentido horizontal, el valor en negrita representa la ganancia genética para el carácter seleccionado y en la misma fila se observan los efectos sobre las medias de los otros caracteres.

\*\* Los valores se expresan en % de las medias respectivas a cada carácter

Tabla 4.9. Ganancia directa sobre el carácter seleccionado (en diagonal y negrita) y efecto indirecto sobre el resto de los caracteres para: (A) selección fenotípica individual (SFI) y (B) selección genotípica por prueba de progenie (SGPP) en *Panicum coloratum*

var. *coloratum* creciendo durante 21 días en condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia.

(A)	SFI				(B)	SGPP			
	PSA	PFR	NM	NH		PSA	PFR	NM	NH
PSA	<b>81.9</b>	42.7	29.4	34.5	<b>71.1</b>	18.7	13.9	15.5	
PFR	50.7	<b>46.8</b>	18.2	21.1	22.8	<b>45.4</b>	10.7	11.9	
NM	33.9	17.6	<b>27.6</b>	14.7	18.6	15.9	<b>29.8</b>	10.1	
NH	51.6	26.6	19.1	<b>36.4</b>	22.2	13.9	10.8	<b>33.6</b>	

\*La tabla se lee en sentido horizontal, el valor en negrita representa la ganancia genética para el carácter seleccionado y en la misma fila se observan los efectos sobre las medias de los otros caracteres.

\*\* Los valores se expresan en % de las medias respectivas a cada carácter

## Discusión

Con el objetivo de estudiar la existencia de variabilidad y la ganancia genética que se obtendría por dos métodos de selección fenotípica, dos poblaciones de apareamiento aleatorio de dos variedades botánicas de *P. coloratum* fueron evaluadas bajo condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia. Se observaron altos niveles de variabilidad genética en ambas variedades determinando valores de heredabilidad en sentido estricto cercanas a 1. Por otro lado, correlaciones genéticas positivas y significativas fueron halladas entre todos los caracteres estudiados. Los resultados hallados en este capítulo, permiten aceptar la hipótesis planteada.

### *Aproximación experimental para evaluar variabilidad genética*

La hidroponia como método experimental para distinguir genotipos tolerantes es ampliamente utilizada en el mejoramiento genético para tolerancia a estrés. Si bien existen controversias en torno a los sistemas artificiales con condiciones controladas para la evaluación y detección de genotipos tolerantes (Tavakkoli et al., 2010), se pueden encontrar algunas ventajas que hacen que estos sistemas sean muy utilizados. Por ejemplo, los sistemas controlados permiten evaluar un gran número de genotipos simultáneamente y verificar fehacientemente que todos estén sometidos a la misma condición (Quero et al., 2013). Por esta razón es frecuente utilizar aproximaciones experimentales para someter a las plantas al estrés y aislar los factores de interés de otros que puedan estar interfiriendo.

El sistema experimental de hidroponia ha sido utilizado tanto para el estudio de variabilidad y selección de genotipos frente al estrés salino en especies forrajeras (Griffa

et al., 2010; Ribotta et al., 2013; Pittaro, 2017; Cardamone et al., 2018), como para el estrés combinado de salinidad e hipoxia (Striker et al., 2015).

#### *Estructura genética de la población y heredabilidad*

Para analizar los posibles resultados de un programa de mejoramiento para tolerancia a estrés por salinidad-hipoxia, se estudiaron dos poblaciones de apareamiento aleatorio de dos variedades botánicas de *P. coloratum*: var. *makarikariense* y var. *coloratum*. Para esto, es importante estudiar la estructura genética de las poblaciones, es decir, cantidad y distribución de la variabilidad genética disponible en el germoplasma (Jank et al., 2011; Rimieri, 2013). En este trabajo se observó que en ambas variedades y para todos los caracteres evaluados, la mayor proporción de la variación se encuentra dentro de familia (Tabla 4.1). Esto, difiere de lo hallado previamente por Cardamone (2019) en familias de medios hermanos de *P. coloratum* var. *makarikariense* sometidas a condiciones de salinidad, donde la mayor proporción de la variación se encontró entre familias. Sin embargo, los resultados hallados aquí están de acuerdo con lo esperado para una especie reportada como alógama (Armando et al., 2017). Un elevado flujo génico producto de la polinización cruzada reduce cualquier diferenciación entre los genotipos, con escasa diferenciación entre ellos, pero con amplia variación genética intra-familiar (Hambrick y Godt, 1990). Al igual que en este trabajo, en estudios previos realizados en esta especie sobre caracteres relacionados con la producción de semillas (Maina, 2012) y la plasticidad fenotípica frente a condiciones de sequía (Giordano, 2018), la variabilidad dentro de familia fue superior a aquella hallada entre familias.

Por otra parte, se evaluó la proporción de la varianza observada debida a efectos aditivos ( $h^2$ ). Como se ha demostrado, la estimación de heredabilidad debe calcularse de acuerdo al método de selección (Nguyen y Sleper, 1983). En este sentido, se evaluaron dos métodos de selección utilizados ampliamente en el mejoramiento genético de especies forrajeras, tanto templadas (Bruckner et al., 1991) como subtropicales (Moser y Burson, 2004). Tanto en la var. *makarikariense* como en la var. *coloratum* los valores de heredabilidad para todos los caracteres resultaron moderados-altos en ambos métodos de selección (Tabla 4.2 y 4.3). Incluso, con valores superiores a 1 bajo SFI en los caracteres PSA y PFR en la var. *makarikariense* y PSA en la var. *coloratum*. No es infrecuente observar en la literatura valores de heredabilidad superiores a 1, relacionado a una baja influencia ambiental en estos estudios (Vogel et al., 1981; Re, 2004), permitiendo

interpretar que toda la variabilidad fenotípica observada en estas variables se debe a efectos genéticos aditivos.

Los caracteres antes mencionados, son los que mantienen una alta variabilidad entre familias, esta varianza genética entre familias de medios hermanos representa la varianza aditiva contenida en la varianza fenotípica entre familias (Falconer, 1981), por lo tanto, al observar la estructura de la población (Tabla 4.1), es posible predecir los resultados observados en la heredabilidad de estos caracteres. Por otra parte, el sistema experimental utilizado en este estudio permitió un control de las condiciones de crecimiento y consecuentemente una reducción de la varianza ambiental (Quero et al., 2013), de esta manera se elevan las estimaciones de heredabilidad para todos los caracteres evaluados. Resultados similares fueron obtenidos en *Lens culinaris* donde se duplicaron los valores de heredabilidad para caracteres de tolerancia a bajas temperaturas bajo condiciones controladas, en relación a aquellas estimaciones realizadas a campo (Ali y Johnson, 1999). En otras palabras, las condiciones controladas en las que se trabajó permiten que los fenotipos observados, reflejen fielmente el genotipo de cada planta sin distorsiones ocasionadas por los efectos ambientales, aumentando la efectividad de la selección. En ocasiones donde no es posible controlar las condiciones de crecimiento y, por lo tanto, la influencia del ambiente es alta, la selección de tipo familiar como es el caso de la SGPP es preferible a la SFI (Basigalup D. y Rossanigo R., 2007). Esto está basado en el hecho de que las desviaciones ambientales de los individuos tienden a cancelarse entre sí en el valor medio de la familia, disminuyendo el error ambiental (Mariotti y Collavino, 2014). Resumiendo, los valores altos de heredabilidad observados en este trabajo podrían deberse no sólo a una alta variabilidad entre familias sino también, al sistema experimental utilizado.

Los resultados encontrados coinciden con los hallados por Cardamone (2019) en plántulas de *P. coloratum* var. *makarikariense* en condiciones de estrés salino en hidroponía, donde la heredabilidad para biomasa de raíz fue muy elevada, 0.91 para el preso fresco y de 1 para el seco. Sin embargo, las heredabilidades estimadas por Pittaro et al. (2021), para tolerancia a salinidad en plántulas de *P. coloratum* var. *coloratum* no fueron altas, incluso de 0 para algunos rasgos. Esto deja en claro la importancia de evaluar la heredabilidad en cada población y ambiente en particular y no inferir posibles resultados en base a trabajos previos. Por otra parte, la única manera de incrementar la heredabilidad de un carácter en una población es reduciendo la variación ambiental a

través de diferentes técnicas de manejo lo que impacta directamente en la eficacia de la selección y el avance genético.

#### *Avance genético*

Para poder terminar de evaluar la eficacia de los diferentes métodos de selección debemos estimar la respuesta que se lograría luego de un ciclo. La estimación de avance genético no sólo dependen de la heredabilidad del carácter, sino también, de la unidad de recombinación, la desviación fenotípica de la población y el diferencial de selección (Nguyen y Sleper, 1983). Por lo tanto, obtener el valor de heredabilidad no resulta suficiente para poder predecir una ganancia por selección (Mariotti y Collavino, 2014).

En cuanto al diferencial de selección, su magnitud depende de dos factores: la proporción de la población incluida en el grupo selecto (intensidad) y la desviación estándar fenotípica del carácter (Falconer y Mackay, 1996). La intensidad de selección utilizada fue la misma para ambos métodos de selección (20%) y se puede observar que las desviaciones estándar de las medias familiares están limitadas a valores menores que la desviación estándar de los valores individuales (Falconer y Mackay, 1996), tal como se observa en Tabla 4.2 y 4.3. Esto determina que el diferencial de selección bajo SFI sea superior al alcanzado por SGPP.

Las estimaciones de ganancia genética por selección fueron altas para todos los caracteres en ambas variedades, tanto por SFI como por SGPP. No obstante, en la *var. makarikariense* la SGPP permitiría lograr mayores ganancias en la producción de biomasa bajo condiciones de estrés por salinidad-hipoxia (Tabla 4.2) y en la *var. coloratum* sería la SFI la más promisorio (Tabla 4.3). En la tabla 4.1 si bien se observa que la distribución de la variabilidad dentro de familias es mayor a la observada entre familias para ambas variedades, en la *var. makarikariense* esta diferencia entre familias es más elevada que la hallada en la *var. coloratum*, lo que podría explicar por qué la SGPP, que es un método de selección familiar, estima mayores avances que la SFI en la *var. makarikariense*.

#### *Selección directa e indirecta*

A lo largo de los años se ha evaluado el impacto que tiene la selección de caracteres “secundarios” sobre caracteres primarios o de mayor impacto en la producción (Possingham, 1986), con el objetivo de seleccionar por caracteres de fácil medición. En especies forrajeras, la producción de biomasa constituye uno de los caracteres más

importantes a mejorar, sino el más importante, es por esto que se estimó el impacto que tiene la selección sobre un carácter “x” en la producción de biomasa y el resto de los caracteres no selectos. Para esto, se calcularon las correlaciones genéticas y co-heredabilidades entre caracteres. Las correlaciones genéticas fueron altas y significativas en ambas variedades (Tablas 4.4 y 4.5). Previamente Maina, (2012) halló correlaciones genéticas altas en caracteres relacionados a la retención de semillas en *P. coloratum* con un rango de 0.8-0.97 mientras que, Dreher, (2011) observó valores de correlación genética más bajos para caracteres de vigor de plántulas con un rango de 0.01-0.66. A partir de la correlación genética es posible estimar la co-heredabilidad entre pares de caracteres. Es importante destacar que no se observaron valores de co-heredabilidad superiores a los valores de heredabilidad en sentido estricto para cada carácter (Tablas 4.6 y 4.7). Para otra gramínea forrajera como *Bromus auleticus*, Re, (2004) halló valores co-heredabilidad entre altura de planta y biomasa aérea (0.62) superiores a los valores de heredabilidad individual de los mismos (0.59 y 0.41) para altura de planta y biomasa aérea respectivamente. Sin embargo, los resultados de este estudio coinciden con aquellos observados previamente en plántulas de *P. coloratum* por Maina, (2012) y Dreher, (2011) evaluando parámetros de retención de semilla y vigor de plántula respectivamente, donde en todos los casos las heredabilidades individuales de cada carácter fueron superiores a las co-heredabilidades. Si bien, estos datos se brindan a modo de ejemplo sobre resultados previos hallados en *P. coloratum*, cabe destacar que tanto las correlaciones genéticas como las co-heredabilidades, son parámetros altamente influenciados por el ambiente (Roff, 1996; Sgrò y Hoffmann, 2004), por lo cual, estas comparaciones son utilizadas simplemente como antecedente para la especie en estudio. Resumiendo, las correlaciones genéticas y co-heredabilidades estimadas en ambas variedades de *P. coloratum* resultaron altas para todos los caracteres.

Luego de obtener los valores de co-heredabilidad se determinó el impacto que genera seleccionar un carácter por sobre el resto de los rasgos de interés, es decir, la ganancia indirecta. Como se explicó anteriormente, se empleó el término selección indirecta para estimar el efecto de la selección sobre un carácter mientras que se selecciona sobre otro, siendo que los dos rasgos comparten genes en común (Roff, 1996). Resulta interesante observar que, para las dos variedades, las ganancias indirectas no son las mismas según si la selección se realiza en forma individual o por familiar, esto es, la SFI provoca ganancias indirectas superiores a las observadas en SGPP (Tabla 4.8 y 4.9).

Considerando un carácter en particular, esto es, enfocándonos en la producción de biomasa bajo condiciones de salinidad-hipoxia, en la var. *coloratum* la selección directa por este rasgo es la que estima los mayores avances (+81.9) (Tabla 4.9A). En cuanto a la var. *makarikariense* se observan resultados interesantes. Si bien, se discutió previamente que la SGPP estima mayores ganancias directas por selección que SFI, bajo este último método de selección, se observan ganancias indirectas en PSA superiores a la ganancia directa. Mientras que la selección directa por PSA produce 88.6% de incremento en este carácter, la selección por PFR provocaría un 94% de incremento y la selección por NM un 92.4%. Las ventajas de la selección indirecta son más visibles cuando el carácter sobre el que se selecciona es de fácil medida y se pueden reducir costos en la evaluación de un gran número de genotipos de forma indirecta y aun así obtener buena respuesta en el carácter de más difícil medida. Este es el caso en el incremento en PSA a través de la selección indirecta por NM, en la cual es posible seleccionar aquellos genotipos que presenten mayor número de macollos bajo condiciones de estrés combinado, con el objetivo de incrementar la producción forrajera en estas condiciones, sin necesidad de utilizar un método destructivo para medir la producción de biomasa aérea.

## **Conclusiones**

El presente estudio aporta conocimientos acerca de la variabilidad genética presente en poblaciones de 2 variedades botánicas de *P. coloratum* y la eficiencia de diferentes métodos de selección para incrementar la tolerancia a estrés combinado de salinidad-hipoxia. En este sentido, los resultados presentados en este capítulo demostraron:

Para ambas variedades de *P. coloratum* la variabilidad genética entre familias fue superior a la hallada dentro de familias

Los valores de heredabilidad para los caracteres evaluados en condiciones de salinidad-hipoxia estimados fueron moderados-altos para ambos métodos de selección en ambas variedades de *P. coloratum*

Las correlaciones genéticas estimadas entre caracteres fueron altas con un rango de 0.9-1 en ambas variedades de *P. coloratum*

Comparando las unidades de selección, las SFI estima mayores ganancias genéticas para la var. *coloratum* mientras que la SGPP lo hace en el caso de la var. *makarikariense*

En la var. *makarikariense* el avance genético estimado para PSA sería superior mediante selección indirecta por NM.

## Capítulo 5

### Conclusiones generales y perspectivas futuras

Atendiendo al nuevo escenario productivo desarrollado en la Argentina, donde una gran proporción de la ganadería actual se desarrolla en ambientes con las limitantes aquí abordadas, este estudio buscó, por un lado, brindar respuestas acerca del comportamiento de una gramínea forrajera subtropical como *P. coloratum* frente a condiciones de estrés combinado de salinidad – hipoxia y, por otro lado, explorar la posibilidad de realizar selección de genotipos superiores en su tolerancia a este estrés.

Para comprender la respuesta a condiciones de salinidad e hipoxia, se estudiaron plántulas pertenecientes a dos variedades botánicas de *P. coloratum*, contrastantes en su adaptación edafo-climática, a diferentes niveles, tanto fisiológico como de crecimiento y morfología. Por último, con el objetivo de incrementar la producción de biomasa bajo condiciones de estrés combinado de salinidad e hipoxia, se evaluó en poblaciones de apareamiento aleatorio de cada una de estas variedades la variabilidad genética y la posibilidad de realizar selección bajo diferentes métodos, ampliamente utilizados en especies alógamas.

Se puede destacar que las respuestas observadas a nivel fisiológico en el capítulo 2 coincidieron con lo observado, posteriormente en el capítulo 3 en la acumulación de biomasa y morfología, tanto aérea como radicular. Para la mayor parte de los caracteres estudiados, no se observaron diferencias entre las respuestas observadas en los tratamientos salino-aireado y salino-hipoxia, demostrando que la interacción entre estreses no resultó en un daño mayor al observado por el estrés salino en *P. coloratum*.

Para realizar los estudios fisiológicos y morfológicos se utilizaron dos cultivares comerciales, como representantes de las dos variedades botánicas de la especie. Vale destacar una diferencia encontrada entre estos cultivares. Se observa en el capítulo 2 que Kapivera INTA incrementa su concentración de Na<sup>+</sup> en hojas bajo condiciones salinas (+900%), a pesar de esto, es el cultivar que reduce menos su producción de biomasa aérea respecto a la condición control (56%) (Capítulo 3). Por el contrario, en el cultivar Klein, no se observaron incrementos significativos en la concentración de Na<sup>+</sup>, mientras que redujo un 74% su acumulación de biomasa en condiciones salinas. En este estudio, no fue posible determinar la localización celular del Na<sup>+</sup>, por lo que resulta de interés a futuro, evaluar la compartimentalización del Na<sup>+</sup> en plántulas de *P. coloratum* var.

*makarikariense* creciendo en condiciones de salinidad. Esto permitiría profundizar en la diferencia hallada aquí, en las estrategias de tolerancia a estrés salino en dos variedades de una misma especie.

Una variable que permitió observar diferencias en el estrés provocado por la salinidad fue la temperatura foliar. Siendo este, un dato que, con facilidad y rapidez, puede tomarse en un gran número de individuos, sería de interés evaluar la existencia de variabilidad genética para este carácter en *P. coloratum*. Variables de fácil medición son habitualmente demandadas por parte de los programas de mejoramiento genético. La temperatura foliar podría entonces, potencialmente, ser incluida en futuros programas de mejoramiento como marcador de tolerancia a salinidad en *P. coloratum*.

En las poblaciones de ambas variedades de *P. coloratum*, se observó una amplia variabilidad genética en caracteres morfológicos y, en consecuencia, las estimaciones de ganancia genética por selección fueron promisorias (Capítulo 4). Si bien se realizaron estimaciones en torno a la selección de genotipos por su tolerancia a estrés combinado, a futuro sería de interés, evaluar el avance efectivo alcanzado luego de un ciclo de selección, en otras palabras, evaluar la heredabilidad realizada para cada carácter de interés. Es de destacar que sería importante, no solo, evaluar esto en condiciones de hidroponía, como la utilizada en este estudio, sino además en condiciones de campo. Ya que, si bien la hidroponía es un sistema que se ha utilizado con éxito para evaluar la respuesta a estrés en diferentes especies, su uso en programas de mejoramiento genético es reciente y existen controversias sobre el éxito que puedan alcanzar, en condiciones de campo, las poblaciones seleccionadas en ambientes controlados.

Como se ha mencionado antes, para la mayor parte de los caracteres estudiados aquí, no se observaron diferencias entre condiciones de salinidad y el estrés combinado de salinidad + hipoxia, a raíz de esto, surge la siguiente pregunta, ¿Sería posible, entonteces, seleccionar genotipos en condiciones de salinidad con el objetivo de obtener poblaciones tolerantes a estrés combinado? Teniendo en cuenta, las dificultades que conlleva evaluar y seleccionar por estrés combinado, esto podría resultar en un avance importante en los programas de mejoramiento en *P. coloratum*, en pos de disminuir tiempos y costos durante el proceso de selección.

En un escenario de cambio en el uso de la tierra y desplazamiento de la ganadería a zonas con limitantes edafo-climáticas, los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a formar las bases de un programa de mejoramiento genético en *P. coloratum* var.

*makarikariense* y var. *coloratum* para incrementar la tolerancia a estrés combinado de salinidad y anegamiento.

## Bibliografía

- Acikgoz, E., A.T. Goksoy, G. Wietgreffe, and M. Sincik. (2019). Breeding forage soybean genotypes : Yield, characteristics, and selection criteria when spring seeding and double cropping. Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Uludag University, Bursa, Turkey. doi: 10.13140/RG.2.2.29626.03521.
- Alamri, S.A., E.G. Barrett-Lennard, N.L. Teakle, and T.D. Colmer. (2013). Improvement of salt and waterlogging tolerance in wheat: Comparative physiology of *Hordeum marinum*-*Triticum aestivum* amphiploids with their *H. marinum* and wheat parents. *Funct. Plant Biol.* 40(11): 1168–1178. doi: 10.1071/FP12385.
- Ali, A., and D.L. Johnson. (1999). Heritability estimates for winter hardiness in lentil under natural and controlled conditions. *Plant Breed.* 119: 283–285.
- Amdan, M.L., R. Aragón, E.G. Jobbágy, J.N. Volante, and J.M. Paruelo. (2013). Onset of deep drainage and salt mobilization following forest clearing and cultivation in the Chaco plains (Argentina). *Water Resour. Res.* 49(10): 6601–6612. doi: 10.1002/wrcr.20516.
- Antonelli, C.J., P.I. Calzadilla, M.P. Campestre, F.J. Escaray, and O.A. Ruiz. (2020). Contrasting response of two *Lotus corniculatus* L. accessions to combined waterlogging–saline stress. *Plant Biol.*: 1–12. doi: 10.1111/plb.13216.
- Armando, L. V., A.D. Carrera, and M.A. Tomas. (2013). Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60(5): 1737–1747. doi: 10.1007/s10722-013-9982-3.
- Armando, L. V., M.A. Tomás, A.F. Garayalde, and A.D. Carrera. (2017). Effect of pollination mode on progeny of *Panicum coloratum* var. *makarikariense*: Implications for conservation and breeding. *Trop. Grasslands-Forrajés Trop.* 5(3): 117–128. doi: 10.17138/TGFT(5)117-128.
- Ashraf, M. (2003). Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panicgrass ( *Panicum antidotale* Retz. ) under salinity or waterlogging. 165: 69–75. doi: 10.1016/S0168-9452(03)00128-6.
- Ashraf, M. (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199(5): 361–376. doi: 10.1078/0367-2530-00165.

- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Adv.* 27(1): 84–93. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.003.
- Ashraf, M., and M.R. Foolad. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59(2): 206–216. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.
- Atlin, G.N., J.E. Cairns, and B. Das. (2017). Rapid breeding and varietal replacement are critical to adaptation of cropping systems in the developing world to climate change. *Glob. Food Sec.* 12(October 2016): 31–37. doi: 10.1016/j.gfs.2017.01.008.
- Auer, A., N. Maceira, and C. Mikkelsen. (2019). El proceso de agriculturización en territorios con diferente matriz ecológico-productiva. El caso de la cuenca mar chiquita, provincia de buenos aires, Argentina. *Rev. Geogr. Norte Gd.* 2019(72): 27–53. doi: 10.4067/S0718-34022019000100027.
- Avila, R., P. Barbera, L. Blanco, V. Burghi, J. De Battista, et al. (2014). Gramíneas forrajeras para el subtrópico y el semiárido central de la Argentina. Ediciones INTA p. 1-72. ISBN: 9789875215511
- Barret-Lennard, E.G. (2003). The interaction between waterlogging and salinity in higher plants : causes , consequences and implications. *Plant Soil* 253(3): 35–54.
- Barret-Lennard and Shabala, S. (2013). The waterlogging / salinity interaction in higher plants revisited – focusing on the hypoxia-induced disturbance to K<sup>+</sup> homeostasis. (1): 872–882.
- Basigalup D. y R. Rossanigo (2007). Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. *El Cultiv. la Alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA: 15.
- Batello, C., R. Brinkman, M.A. Martinez, and J. Suttie. (2008). Plant Genetic Resources of Forage Crops, Pasture and Rangelands thematic background study. FAO re-port 5–7: 63. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/SoW2/thematic\\_study\\_forage.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/SoW2/thematic_study_forage.pdf).
- Beauchamp, C.O., and I. Fridovich. (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *BBA - Protein Struct.* 317(1): 50–64. doi: 10.1016/0005-2795(73)90198-0.

- Di Bella, C.E., G.G. Striker, F.J. Escaray, F.A. Lattanzi, A.M. Rodríguez, et al. (2014). Saline tidal flooding effects on *Spartina densiflora* plants from different positions of the salt marsh. Diversities and similarities on growth, anatomical and physiological responses. *Environ. Exp. Bot.* 102: 27–36. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.02.009.
- Benzie, I.F.F., and J.J. Strain. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 0292(239): 70–76. doi: 10.1039/c6ay01739h.
- Bernardo, R. (2020). Reinventing quantitative genetics for plant breeding: something old, something new, something borrowed, something BLUE. *Heredity (Edinb.)*. 125(6): 375–385. doi: 10.1038/s41437-020-0312-1.
- Blom, C.W.P.M. and L.A.C.J. Voeselek. (1996). Flooding: The survival strategies of plants. *Trends Ecol. Evol.* 11(7): 290–295. doi: 10.1016/0169-5347(96)10034-3.
- Bose, J., A. Rodrigo-Moreno, and S. Shabala. (2014). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 65(5): 1241–1257. doi: 10.1093/jxb/ert430.
- Bruckner, P.L., P.L. Raymer, and G.W. Burton. (1991). Recurrent phenotypic selection for forage yield in rye. *Euphytica* 54(1): 11–17. doi: 10.1007/BF00145625.
- Capon, S.J., C.S. James, L. Williams, and G.P. Quinn. (2009). Responses to flooding and drying in seedlings of a common Australian desert floodplain shrub: *Muehlenbeckia florulenta* Meisn. (tangled lignum). *Environ. Exp. Bot.* 66(2): 178–185. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.02.012.
- Cardamone, L. (2019). Caracterización agronómica, variabilidad genética y ganancia por selección en caracteres relacionados con tolerancia a salinidad en una colección de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*.
- Cardamone, L., A. Cuatrín, K. Grunberg, and M.A. Tomás. (2018). Variability for salt tolerance in a collection of *Panicum coloratum* var. *makarikariense* during early growth stages. *Trop. Grasslands-Forrajeros Trop.* 6(3): 134–147. doi: 10.17138/TGFT(6)134-147.
- Cardoso, J.A., J. Rincón, J. De La Cruz Jimenez, D. Noguera, and I.M. Rao. (2013). Morpho-anatomical adaptations to waterlogging by germplasm accessions in a tropical forage grass. *AoB Plants* 5(January). doi: 10.1093/aobpla/plt047.

- Carlioni, E., E. Tommasino, E. López Colomba, A. Ribotta, M. Quiroga, S. Griffa and K. Grunberg (2017). In vitro selection and characterization of buffelgrass somaclones with different responses to water stress. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 130(2): 265–277. doi: 10.1007/s11240-017-1220-9.
- Casler, M.D. (2008). Among-and-within-Family Selection. (April): 434–442. doi: 10.2135/cropsci2007.05.0267.
- Castelli, S.L., K. Grunberg, N. Muñoz, S. Griffa, E.L. Colomba, et al. (2010). Oxidative damage and antioxidant defenses as potential indicators of salt-tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 205(9): 622–626. doi: 10.1016/j.flora.2010.04.004.
- Cerdá, A., J. Pardines, M.A. Botella, and V. Martinez. (1995). Effect of potassium on growth, water relations, and the inorganic and organic solute contents for two maize cultivars grown under saline conditions. *J. Plant Nutr.* 18(4): 839–851. doi: 10.1080/01904169509364942.
- Choudhury, F.K., R.M. Rivero, E. Blumwald, and R. Mittler. (2017). Reactive oxygen species , abiotic stress and stress combination. : 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299.
- Colmer, T.D. (2003). Long-distance transport of gases in plants: A perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell Environ.* 26(1): 17–36. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00846.x.
- Colmer, T.D., and T.J. Flowers. (2008). Flooding tolerance in halophytes. *New Phytol.* 179(4): 964–974. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02483.x.
- Colmer, T.D., and L.A.C.J. Voeselek. (2009). Flooding tolerance: Suites of plant traits in variable environments. *Funct. Plant Biol.* 36(8): 665–681. doi: 10.1071/FP09144.
- Colomba, E.L., E. Tommasino, C. Luna, S. Griffa, E. Carlioni, et al. (2013). South African Journal of Botany Differential salt-stress response during germination and vegetative growth in in vitro selected somaclonal mutants of *Cenchrus ciliaris* L . *South African J. Bot.* 87: 157–163. doi: 10.1016/j.sajb.2013.03.008.
- Courel, G. (2019). Guia de estudio. Suelos Salinos y Sódicos. *J. Chem. Inf. Model.* 53(9): 1689–1699.
- Crain, J., P. Bajgain, J. Anderson, X. Zhang, L. DeHaan, and J. Poland. (2020). Enhancing Crop Domestication Through Genomic Selection, a Case Study of Intermediate Wheatgrass. *Front. Plant Sci.* 11(March): 1–15. doi: 10.3389/fpls.2020.00319.

- Cramer, G.R., G.J. Alberico, and C. Schmidt. (1994). Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Aust. J. Plant Physiol.* 21(5): 675–692. doi: 10.1071/PP9940675.
- Cubero, L.I. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal*. 2da ed. Mundiprensa Libros.
- Cui, B., R. Liu, T.J. Flowers, and J. Song. (2021). Casparian bands and suberin lamellae: Key targets for breeding salt tolerant crops? *Environ. Exp. Bot.* 191(April): 104600. doi: 10.1016/j.envexpbot.2021.104600.
- Dhaliwal, A.K. (2009). Recurrent phenotypic selection for increased (*Lolium Multiflorum* Lam.). Thesis. doi: <http://hdl.handle.net/10415/1797>.
- Dickerson, G.E. (1969). Techniques for research in quantitative animal genetics. *Tech. Proced. Anim. Sci. Res.*: 36–79.
- Dreher, N.S. (2011). Variabilidad genética en caracteres asociados al vigor de plántula entre y dentro de poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariensis*.
- Ebrahimiyan, M., M.M. Majidi, and A. Mirlohi. (2013). Genotypic variation and selection of traits related to forage yield in tall fescue under irrigated and drought stress environments. *Grass Forage Sci.* 68(1): 59–71. doi: 10.1111/j.1365-2494.2012.00869.x.
- Falconer, D.S. (1989). *Introduction to Quantitative Genetics*. New York: Longman.
- Falconer, D.S., and T.F.C. Mackay. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics* (W.L. Addison, editor). 4th ed. Harlow.
- FAO. 2018. *Handbook for saline soil management*.
- Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, and S.M.A. Basra. (2009). Review article Plant drought stress : effects , mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev* 29: 185–212.
- Fehr, W.R. (1988). *Principles of Cultivar Development*, vol. 1, Theory and Technique.
- Flowers, T.J., R. Munns, and T.D. Colmer. (2015). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Ann. Bot.* 115(3): 419–431. doi: 10.1093/aob/mcu217.
- Ghesquière, M., L. Hazard, and M. Betin. (1994). Breeding for management adaptation

- in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). II. Genetic variability and heritability of leaf morphogenesis components. *Agronomie* 14(4): 267–272. doi: 10.1051/agro:19940406.
- Gill, S.S., and N. Tuteja. (2010a). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48(12): 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gill, S.S., and N. Tuteja. (2010b). Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48(12): 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Giordano, M.C. 2018. Plasticidad fenotípica en *Panicum coloratum*: variabilidad genética, heredabilidad y expresión diferencial de la plasticidad.
- Giordano, M.C., G.D. Berone, and M.A. Tomás. (2013). Selection by seed weight improves traits related to seedling establishment in *Panicum coloratum* L. var. *makarikariense*. *Plant Breed.* 132(6): 620–624. doi: 10.1111/pbr.12106.
- Greenway, H., and R. Munns. (1980). Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31(1): 149–190. doi: 10.1146/annurev.pp.31.060180.001053.
- Griffa, S., A. Ribotta, E. López Colomba, E. Tommasino, E. Carloni, et al. (2010). Evaluation seedling biomass and its components as selection criteria for improving salt tolerance in Buffel grass genotypes. *Grass Forage Sci.* 65(3): 358–361. doi: 10.1111/j.1365-2494.2010.00754.x.
- Hambrick, J.L., and M.J. Godt. (1990). Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., and Weir, B.S., editors, *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, S. p. 43–62
- Heath, R.L., and L. Packer. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 125(1): 189–198. doi: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.
- Hedges, L. V., J. Gurevitch, and P.S. Curtis. (1999). The meta-analysis of response ratios in experimental ecology. *Ecology* 80(4): 1150–1156. doi: 10.1890/0012-9658(1999)080[1150:TMAORR]2.0.CO;2.
- Herzog, M., G.G. Striker, T.D. Colmer, and O. Pedersen. (2016). Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat - a review of root and shoot physiology. *Plant Cell*

- Environ. 39(5): 1068–1086. doi: 10.1111/pce.12676.
- Hoagland, D.R., and D.I. Arnon. 1950. Preparing the nutrient solution. *Water-Culture Method Grow*. *Plants without Soil* 347: 29–31.
- Hoque, M.A., M.N.A. Banu, Y. Nakamura, Y. Shimoishi, and Y. Murata. (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* 165(8): 813–824. doi: 10.1016/j.jplph.2007.07.013.
- Hussain, T., H.W. Koyro, B. Huchzermeyer, and M.A. Khan. (2015). Eco-physiological adaptations of *Panicum antidotale* to hyperosmotic salinity: Water and ion relations and anti-oxidant feedback. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 212: 30–37. doi: 10.1016/j.flora.2015.02.006.
- Illarze, G., A. del Pino, S. Riccetto, and P. Irisarri. (2018). Nitrous oxide emission, nitrification, denitrification and nitrogen mineralization during rice growing season in 2 soils from Uruguay. *Rev. Argent. Microbiol.* 50(1): 97–104. doi: 10.1016/j.ram.2017.05.004.
- Imaz, J.A., D.O. Giménez, A.A. Grimoldi, and G.G. Striker. (2012). The effects of submergence on anatomical, morphological and biomass allocation responses of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum* at seedling stage. *Crop Pasture Sci.* 63(11–12): 1145–1155. doi: 10.1071/CP12335.
- Imaz, J.A., D.O. Giménez, A.A. Grimoldi, and G.G. Striker. (2015). Ability to recover overrides the negative effects of flooding on growth of tropical grasses *Chloris gayana* and *Panicum coloratum*. *Crop Pasture Sci.* 66(1): 100–106. doi: 10.1071/CP14172.
- Imhoff y Panigatti. (2021). *Saline and Alkaline Soils in Latin America. Limitations and Sustainable Management of Halohydromorphic Soils of the Santa Fe Province, Argentina.* (Edith Taleisnik and Raúl S. Lavado). Springer Nature Switzerland AG. pp. 269-283. doi: 10.1007/978-3-030-52592-7
- Insausti, P., A.A. Grimoldi, E.J. Chaneton, and V. Vasellati. (2001). Flooding induces a suite of adaptive plastic responses in the grass *Paspalum dilatatum*. *New Phytol.* 152(2): 291–299. doi: 10.1111/j.0028-646X.2001.257\_1.x.
- Jackson, M.B., M.C. Drew, and S.C. Giffard. (1981). Effects of applying etnylene to the

- root system of *Zea mays* on growth and nutrient concentration in relation to flooding tolerance. *Physiol. Plant.* 52(1): 23–28. doi: 10.1111/j.1399-3054.1981.tb06028.x.
- Jank, L., C.B. Valle, and R.M.S. Resende. (2011). Breeding tropical forages. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 11(SUPPL.): 27–34. doi: 10.1590/s1984-70332011000500005.
- Jayawickreme, D.H., C.S. Santoni, J.H. Kim, E.G. Jobbágy, and R.B. Jackson. (2011). Changes in hydrology and salinity accompanying a century of agricultural conversion in Argentina. *Ecol. Appl.* 21(7): 2367–2379. doi: 10.1890/10-2086.1.
- Jenkins, S., E.G. Barrett-lennard, and Z. Rengel. (2010). Impacts of waterlogging and salinity on puccinellia ( *Puccinellia ciliata* ) and tall wheatgrass ( *Thinopyrum ponticum* ): zonation on saltland with a shallow water-table , plant growth , and Na + and K + concentrations in the leaves. : 91–104. doi: 10.1007/s11104-009-0137-4.
- Jimenez, J. de la C., L.P. Moreno, and S. Magnitskiy. (2012). Respuesta de las plantas a estres por inundacion. *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas* 6(1): 96–109.
- Jobbágy, E., G. Sznaider, M. Noretto, R. Aragón, G. Mangas, et al. (2003). Dinámica de napas y Riesgo de Inundación : Infl uencias y efectos en la variabilidad de los cultivos Las ideas principales. *Science* (80). (1): 1–5.
- Kingston-Smith, A.H., A.H. Marshall, and J.M. Moorby. (2013). Breeding for genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. *Animal* 7(SUPPL.1): 79–88. doi: 10.1017/S1751731112000961.
- Kotula, L., H.Y. Kwa, P.G.H. Nichols, and T.D. Colmer. (2019). Tolerance and recovery of the annual pasture legumes *Melilotus siculus*, *Trifolium michelianum* and *Medicago polymorpha* to soil salinity, soil waterlogging and the combination of these stresses. *Plant Soil* 444(1–2): 267–280. doi: 10.1007/s11104-019-04254-z.
- Lamb, J.A.F.S., C.C. Sheaffer, L.H. Rhodes, R.M. Sulc, D.J. Undersander, et al. (2006). Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence, and nutritive value. *Crop Sci.* 46(2): 902–909. doi: 10.2135/cropsci2005.08-0236.
- Lamz, A., and M.C. González. (2010). Efecto del estrés por NaCl en el crecimiento y las relaciones hídricas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) durante el período vegetativo. *Cultiv. Trop.* 31(4): 76–81.
- Lavado, R.S. (2007). Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados

- por salinidad en la Argentina. La salinización suelos en Argentina: 1–6. <https://redsalinidad.com.ar/wp-content/uploads/2018/12/la-salinizacion-de-suelos-en-la-argentina.pdf>.
- Lee, G.J., R.R. Duncan, and R.N. Carrow. (2007). Nutrient uptake responses and inorganic ion contribution to solute potential under salinity stress in halophytic seashore paspalums. *Crop Sci.* 47(6): 2504–2512. doi: 10.2135/cropsci2006.10.0639.
- Lemaire, G., R. Wilkins, and J. Hodgson. (2005). Challenges for grassland science: Managing research priorities. *Agric. Ecosyst. Environ.* 108(2): 99–108. doi: 10.1016/j.agee.2005.01.003.
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. Ingram Olkin, Harold Hotelling, et alia. Stanford University Press. p. 278–292
- Lifschitz, M., G. Guerrero, M.E. Pagnucco, M.C. Giordano, K. Grunberg, et al. (2018). Respuesta al estrés combinado de salinidad / hipoxia en *Panicum coloratum* L. *Rev. Argentina de Producción Animal.* 38(1): 268. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/16902>.
- Lloyd, D.L. (1981). Makarikari grass (*Panicum coloratum* var. *makarikariense*) A review with particular reference to Australia. *Trop. Grasslands* 15(1): 44–52.
- López Colomba, E., E. Tommasino, C. Luna, S. Griffa, E. Carloni, et al. (2013). Differential salt-stress response during germination and vegetative growth in in vitro selected somaclonal mutants of *Cenchrus ciliaris* L. *South African J. Bot.* 87: 157–163. doi: 10.1016/j.sajb.2013.03.008.
- Luna, C., M. De Luca, and E. Taleisnik. (2002). Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar. II. Oxidative stress. *Aust. J. Agric. Res.* 53(6): 663–669. doi: 10.1071/AR01167.
- Maina, M. (2012). Variabilidad en caracteres relacionados a la producción de semilla en poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. Trabajo final de tesis para optar el grado de Magister en Mejoramiento vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario.
- Manuel-Navarrete, D., G.C. Gallopín, M. Blanco, M. Díaz-Zorita, D.O. Ferraro, et al. (2009). Multi-causal and integrated assessment of sustainability: The case of

- agriculturization in the Argentine Pampas. *Environ. Dev. Sustain.* 11(3): 621–638. doi: 10.1007/s10668-007-9133-0.
- Marcón, F., E.J. Martínez, A.L. Zilli, G.R. Rodríguez, E.A. Brugnoli, et al. (2020). Recurrent phenotypic selection and recurrent selection based on combining ability in tetraploid bahiagrass. *Crop Sci.* 60(3): 1386–1397. doi: 10.1002/csc2.20137.
- Marino, A., V. Rodríguez, and N. Schroeder. (2020). El guanaco como chivo expiatorio del sobrepastoreo por ganado en Patagonia Sur. *J. Appl. Ecol.* (September 21): 1–14.
- Marinoni, L. del R., J.M. Zabala, E.L. Taleisnik, G.E. Schrauf, G.A. Richard, et al. (2019). Wild halophytic species as forage sources: Key aspects for plant breeding. *Grass Forage Sci.* 74(3): 321–344. doi: 10.1111/gfs.12410.
- Mariotti, J.A., and N.G. Collavino. (2014). Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos. 1st ed. Orientación grafica editora S.R.L, Buenos Aires.
- Menon-Martínez, F.E., A.A. Grimoldi, G.G. Striker, and C.E. Di Bella. (2021). Variability among *Festuca arundinacea* cultivars for tolerance to and recovery from waterlogging, salinity and their combination. *Crop Pasture Sci.* 72(1): 75–84. doi: 10.1071/CP20289.
- Mittler, R., S. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9): 405–410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V.B. Tognetti, et al. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* 16(6): 300–309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007.
- Mollard, F.P.O., G.G. Striker, E.L. Ploschuk, and P. Insausti. (2010). Subtle topographical differences along a floodplain promote different plant strategies among *Paspalum dilatatum* subspecies and populations. *Austral Ecol.* 35(2): 189–196. doi: 10.1111/j.1442-9993.2009.02026.x.
- Møller, I.S., and M. Tester. (2007). Salinity tolerance of *Arabidopsis*: a good model for cereals? *Trends Plant Sci.* 12(12): 534–540. doi: 10.1016/j.tplants.2007.09.009.
- Morris, W.F., R.A. Hufbauer, A.A. Agrawal, J.D. Bever, V.A. Borowicz, et al. (2007). Direct and interactive effects of enemies and mutualists on plant performance: A meta-analysis. *Ecology* 88(4): 1021–1029. doi: 10.1890/06-0442.

- Moser, L.E., and B.L. Burson. (2004). Warm-Season (C 4) Grass Overview. (45): 1–14.
- Munns, R. (1985). Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in xylem sap flowing to shoots of NaCl-treated barley. *J. Exp. Bot.* 36(7): 1032–1042. doi: 10.1093/jxb/36.7.1032.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environ.* 25(2): 239–250. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x.
- Munns, R. (2005). Genes and Salt Tolerance. *New Phytol.* 167(3): 645–663.
- Munns, R. (2011). *Plant Adaptations to Salt and Water Stress. Differences and Commonalities.* 1st ed. Elsevier Ltd.
- Munns, R., and R.A. James. (2003). Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil* 253(1): 201–218. doi: 10.1023/A:1024553303144.
- Munns, R., J.B. Passioura, T.D. Colmer, and C.S. Byrt. (2020). Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. *New Phytol.* 225(3): 1091–1096. doi: 10.1111/nph.15862.
- Munns, R., and M. Tester. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651–681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- Nguyen, L. Van, T.M. Le, P.D.V. Ta, G.H. Tran, M.S. Rumanzi, et al. (2020). Variation in root growth responses of sweet potato to hypoxia and waterlogging. *Vegetos* 33(2): 367–375. doi: 10.1007/s42535-020-00117-6.
- Nguyen, H.T., and D.A. Sleper. (1983). Theory and application of half-sib matings in forage grass breeding. *Theor. Appl. Genet.* 64(3): 187–196. doi: 10.1007/BF00303763.
- Nosetto, M.D., R.A. Paez, S.I. Ballesteros, and E.G. Jobbágy. (2015). Higher water-table levels and flooding risk under grain vs. livestock production systems in the subhumid plains of the Pampas. *Agric. Ecosyst. Environ.* 206(August): 60–70. doi: 10.1016/j.agee.2015.03.009.
- Pallas, J.E., B.E. Michel, and D.G. Harris. (1967). Photosynthesis, Transpiration, Leaf Temperature, and Stomatal Activity of Cotton Plants under Varying Water Potentials. *Plant Physiol.* 42(1): 76–88. doi: 10.1104/pp.42.1.76.
- Parida, A.K., and A.B. Das. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60(3): 324–349. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.010.

- Paruelo, J.M., J.P. Guerschman, G. Piñeiro, E.G. Jobbagy, S.R. Veron, et al. (2006). Cambios en el uso de la tierra en Argentina y Uruguay: marcos conceptuales para su analisis. *Agrociencia* X(2): 47–61.
- Paz, R.C., R.A. Rocco, H. Reinoso, A.B. Menéndez, F.L. Pieckenstain, et al. (2012). Comparative Study of Alkaline, Saline, and Mixed Saline-Alkaline Stresses with Regard to Their Effects on Growth, Nutrient Accumulation, and Root Morphology of *Lotus tenuis*. *J. Plant Growth Regul.* 31(3): 448–459. doi: 10.1007/s00344-011-9254-4.
- Peng, Y.L., Z.W. Gao, Y. Gao, G.F. Liu, L.X. Sheng, et al. (2008). Eco-physiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 50(1): 29–39. doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00607.x.
- Pensiero, J.F., and J.M. Zabala. (2017). Recursos Fitogenéticos Forrajeros Nativos Y Naturalizados Para Los Bajos Submeridionales: Prospección Y Priorización De Especies Para Planes De Introducción a Cultivo. *FAVE Sección Ciencias Agrar.* 16(1): 67–98. doi: 10.14409/fa.v16i1.6750.
- Perera, R.S., B.R. Cullen, and R.J. Eckard. (2020). Using leaf temperature to improve simulation of heat and drought stresses in a biophysical model. *Plants* 9(1). doi: 10.3390/plants9010008.
- Petruzzi, H., N. Stritzler, E.O. Adema, C.M. Ferri, and J.H. Pagella. (2003). Mijo perenne - *Panicum coloratum*. *EEA Anguil INTA*: 1–28.
- Pinter, J.R., G. Zipoli, R.J. Reginato, R.D. Jackson, S.B. Idsp, et al. (1990). Canopy Temperature as an Indicator of Differential Water Use and Yield Performance among Wheat Cultivars. *Water* 18: 35–48.
- Pita. (2017). Propiedades físicas de suelos sódicos, su impacto en el crecimiento y absorción radical en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Escuela para Graduados para optar al Grado Académico de Especialista en Producción de Cultivos Extensivos. Univ. Nac. Córdoba Fac. Ciencias Agropecu. Esc.
- Pittaro, M.G. (2017). “Caracterización de germoplasma de *Panicum coloratum* L. VAR. *coloratum* para la tolerancia a la salinidad, alcalinidad y al frío .”
- Pittaro, G., C. Bruno, A. Tom, D. Bustos, M. Monteoliva, et al. (2015). Salt tolerance variability among stress-selected *Panicum coloratum* cv . Klein plants. *Grass Forage*

- Sci. (February): 683–698. doi: 10.1111/gfs.12206.
- Pittaro, G., M. Lifschitz, M. Sánchez, D. Bustos, J. Otondo, et al. (2021). Prospective genetic gain to improve salinity tolerance in a population of *Panicum coloratum* var. *coloratum* with two different selection methods. *Trop. Grasslands-Forrajes Trop.* 9(2): 171–181. doi: 10.17138/TGFT(9)171-181.
- Pla Sentís, I. (2021). Overview of Salt-Affected Areas in Latin America: Physical, Social and Economic Perspectives.
- Ploschuk, R.A., A.A. Grimoldi, E.L. Ploschuk, and G.G. Striker. (2017). Growth during recovery evidences the waterlogging tolerance of forage grasses. *Crop Pasture Sci.* 68(6): 574–582. doi: 10.1071/CP17137.
- Ponnamperuma, F.N. (1972). The Chemistry of Submerged Soils. *Adv. Agron.* 24(C): 29–96.
- Popović, B.M., D. Štajner, R. Ždero-Pavlović, V. Tumbas-Šaponjac, J. Čanadanović-Brunet, et al. (2016). Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.). *Plant Physiol. Biochem.* 105: 242–250. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.04.036.
- Possingham, J.V. (1986). Efficiency in plant breeding. *Scientia Horticulturae* (28): p. 391-393. doi: 10.1016/0304-4238(86)90115-9
- Qadir, M., J.D. Oster, S. Schubert, A.D. Noble, and K.L. Sahrawat. (2007). Phytoremediation of Sodic and Saline-Sodic Soils. *Advances in Agronomy.* p. 197–247
- Quero, G., O. Borsani, L. Gutiérrez, M. Melchiorre, J. Monza, et al. (2013). Sistemas de fenotipado para la evaluación de las respuestas al estrés salino en Lotus. *Agrociencia Uruguay* 17(1): 11–21. doi: 10.2477/vol17iss1pp11-21.
- Re, A. (2004). Variabilidad Genética en caracteres asociados al crecimiento inicial de Cebadilla Chaqueña (*Bromus auleticus* Trin. Ex Nees) ecotipo Carpinchorí. *Trab. Final Apl. Univ. Nac. Luján.*
- Ribotta, A.N., S.M. Griffa, D. Díaz, E.J. Carloni, E. López Colomba, et al. (2013). Selecting salt-tolerant clones and evaluating genetic variability to obtain parents of new diploid and tetraploid germplasm in rhodesgrass (*Chloris gayana* K.). *South African J. Bot.* 84: 88–93. doi: 10.1016/j.sajb.2012.10.001.

- Riday, H., and E.C. Brummer. (2007). Journal of the Iowa Academy of Science : JIAS Narrow Sense Heritability and Additive Genetic Correlations in Alfalfa subsp . falcata. J. Iowa Acad. Sci. JIAS Vol. 114(1): 28–34.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, et al. (2020). InfoStat. Infostat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).
- Rimieri, P. (2013). Revista de la Sociedad Argentina de Genética.
- Roff, D.A. (1996). The evolution of genetic correlations: An analysis of patterns. *Evolution* (N. Y). 50(4): 1392–1403. doi: 10.1111/j.1558-5646.1996.tb03913.x.
- Sade, N., M. del Mar Rubio Wilhelmi, X. Ke, Y. Brotman, M. Wright, et al. (2018). Salt tolerance of two perennial grass *Brachypodium sylvaticum* accessions. *Plant Mol. Biol.* 96(3): 305–314. doi: 10.1007/s11103-017-0696-3.
- Sairam, R.K., K. Rao, and G.C. Srivastava. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 163(5): 1037–1046. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00278-9.
- Schäfer, R.B., and J.J. Piggott. (2018). Advancing understanding and prediction in multiple stressor research through a mechanistic basis for null models. *Glob. Chang. Biol.* 24(5): 1817–1826. doi: 10.1111/gcb.14073.
- Schrauf, G., F. Alonso Nogara, P. Rush, P. Peralta Roa, E. Musacchio, et al. (2017). Mejoramiento de forrajeras para tolerancia a la salinidad. *Ambient. salinos y alcalinos la Argentina Recur. y Aprovech. Product.:* 1–18.
- Sgrò, C.M., and A.A. Hoffmann. (2004). Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* (Edinb). 93(3): 241–248. doi: 10.1038/sj.hdy.6800532.
- Shabala, L., T.J. Brodribb, M. Zhou, and S. Shabala. (2019). Understanding physiological and morphological traits contributing to drought tolerance in barley. (September 2018). doi: 10.1111/jac.12307.
- Shapiro, S.S., and M.B. Wilk. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality. *Biometrika* (52: 591).

- Singh, R., and R.S. Sengar. (2020). Impact on Proline Content of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) under Salinity Stress. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 9(10): 3599–3605. doi: 10.20546/ijcmas.2020.910.416.
- Stephan, H. (2016). Land Degradation in The Gambia. 2020(January). <https://desertification.wordpress.com/tag/gambia/>.
- Striker, G.G. (2012). Flooding Stress on Plants : Anatomical , Morphological and Physiological Responses. *Botany* (July 2017): 3–28.
- Striker, G.G., P. Insausti, A.A. Grimoldi, E.L. Ploschuk, and V. Vasellati. (2005). Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. *Plant Soil* 276(1–2): 301–311. doi: 10.1007/s11104-005-5084-0.
- Striker, G.G., N.L. Teakle, T.D. Colmer, and E.G. Barrett-Lennard. (2015). Growth responses of *Melilotus siculus* accessions to combined salinity and root-zone hypoxia are correlated with differences in tissue ion concentrations and not differences in root aeration. *Environ. Exp. Bot.* 109(June): 89–98. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.08.006.
- Szabados, L., and A. Savouré. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15(2): 89–97. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.009.
- Taboada, M.A. (2009). Funcionamiento de los suelos salinos y sódicos. : 1–11.
- Taboada, M.A., F. Damiano, and R.S. Lavado. (2009). Inundaciones en la Región Pampeana. Consecuencias sobre los suelos. Alteraciones la Fertil. los suelos el halomorfismo, la acidez, el hidro- morfismo y las inundaciones. Univ. Buenos Aires. (January 2009): 103–127. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_-\\_inundaciones\\_en\\_la\\_region\\_pampeana.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_-_inundaciones_en_la_region_pampeana.pdf).
- Tavakkoli, E., P. Rengasamy, and G.K. McDonald. (2010). The response of barley to salinity stress differs between hydroponic and soil systems. *Funct. Plant Biol.* 37(7): 621–633. doi: 10.1071/FP09202.
- Teakle, N.L., J. Armstrong, E.G. Barrett-Lennard, and T.D. Colmer. (2011). Aerenchymatous phellem in hypocotyl and roots enables O<sub>2</sub> transport in *Melilotus siculus*. *New Phytol.* 190(2): 340–350. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03655.x.
- Teakle, N.L., N. Bazihizina, S. Shabala, T.D. Colmer, E.G. Barrett-Lennard, et al. (2013).

- Differential tolerance to combined salinity and O<sub>2</sub> deficiency in the halophytic grasses *Puccinellia ciliata* and *Thinopyrum ponticum*: The importance of K<sup>+</sup> retention in roots. *Environ. Exp. Bot.* 87: 69–78. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.09.006.
- Teakle, N.L., T.J. Flowers, D. Real, and T.D. Colmer. (2007). Lotus tenuis tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by “excluding” Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> from the xylem. *J. Exp. Bot.* 58(8): 2169–2180. doi: 10.1093/jxb/erm102.
- Teakle, N.L., D. Real, and T.D. Colmer. (2006). Growth and ion relations in response to combined salinity and waterlogging in the perennial forage legumes *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Plant Soil* 289(1–2): 369–383. doi: 10.1007/s11104-006-9146-8.
- Tian, F., M. Hou, Y. Qiu, T. Zhang, and Y. Yuan. (2020). Salinity stress effects on transpiration and plant growth under different salinity soil levels based on thermal infrared remote (TIR) technique. *Geoderma* 357(May 2019): 113961. doi: 10.1016/j.geoderma.2019.113961.
- Tischler, C.R., and W.R. Ocumpaugh. (2004). Kleingrass, blue panic, and vine mesquite. *Warm-Season (C4) Grasses* (45): 623–649. doi: 10.2134/agronmonogr45.c18.
- Tischler, C.R., P.W. Voigt, and E.C. Holt. (1989). Adventitious root initiation in kleingrass in relation to seedling size and age. *Crop Sci.* 29(1): 180–183. doi: 10.2135/cropsci1989.0011183X002900010039x.
- Tommasino, E., S. Griffa, K. Grunberg, A. Ribotta, E. López Colomba, et al. (2012). Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. *Grass Forage Sci.* 67(3): 456–459. doi: 10.1111/j.1365-2494.2012.00851.x.
- Tommasino, E., E. López Colomba, M. Carrizo, K. Grunberg, M. Quiroga, et al. (2018). Individual and combined effects of drought and heat on antioxidant parameters and growth performance in Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. *South African J. Bot.* 119(December): 104–111. doi: 10.1016/j.sajb.2018.08.026.
- Torabi, M., and M.R.A. Halim. (2010). Variation of root and shoot growth and free proline accumulation in Iranian alfalfa ecotypes under salt stress. *J. Food, Agric. Environ.* 8(3–4 PART 1): 323–327.

- US Department of Agriculture. (1982). Notice of release of Verde Kleingrass. : 1–2.
- Voesenek, L.A.C.J., T.D. Colmer, R. Pierik, F.F. Millenaar, and A.J.M. Peeters. (2006). How plants cope with complete submergence. *New Phytol.* 170(2): 213–226. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01692.x.
- Vogel, K.P., H.J. Gorz, and F.A. Haskins. (1981). Heritability Estimates for Forage Yield, In Vitro Dry Matter Digestibility, Crude Protein, and Heading Date in Indiangrass1. *Crop Sci.* 21(1): 35. doi: 10.2135/cropsci1981.0011183x002100010010x.
- Wang, W., B. Vinocur, and A. Altman. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218(1): 1–14. doi: 10.1007/s00425-003-1105-5.
- Warkad, Y., N. Potdukhe, A. Dethé, P. Kahate, and R. Kotgire. (2008). Genetic variability, heritability and genetic advance for quantitative traits in sorghum germplasm. *Agric. Sci. Dig.* 28(3): 165–169.
- West, O. (1952). Promising new grasses for seeded pastures in Southern Rhodesia. *Rhod. Agric. J.* 49:89-95.
- White, P.J., and M.R. Broadley. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: A review. *Ann. Bot.* 88(6): 967–988. doi: 10.1006/anbo.2001.1540.
- Wiengweera, A., H. Greenway, and C.J. Thomson. (1997). The use of agar nutrient solution to simulate lack of convection in waterlogged soils. *Ann. Bot.* 80(2): 115–123. doi: 10.1006/anbo.1996.0405.
- Wu, H., M. Zhu, L. Shabala, M. Zhou, and S. Shabala. (2015). K<sup>+</sup> retention in leaf mesophyll, an overlooked component of salinity tolerance mechanism: A case study for barley. *J. Integr. Plant Biol.* 57(2): 171–185. doi: 10.1111/jipb.12238.
- Wu, Q., Y. Zou, Y. Huang, and J. Powell. (2012). The arbuscular mycorrhizal fungus *Diversispora spurca* ameliorates effects of waterlogging on growth, root system architecture and antioxidant enzyme activities of citrus seedlings. *Fungal Ecol.* 6(1): 37–43. doi: 10.1016/j.funeco.2012.09.002.
- Xu, L., R. Pan, L. Shabala, S. Shabala, and W.Y. Zhang. (2019). Temperature influences waterlogging stress-induced damage in *Arabidopsis* through the regulation of photosynthesis and hypoxia-related genes. *Plant Growth Regul.* 89(2): 143–152. doi: 10.1007/s10725-019-00518-x.

- Yeo, A.R., M.E. Yeo, and T.J. Flowers. (1987). The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* 38(7): 1141–1153. doi: 10.1093/jxb/38.7.1141.
- Yin, D., S. Chen, F. Chen, Z. Guan, and W. Fang. (2010). Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.* 68(2): 122–130. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.11.008.
- Young, B.A. (1986). A source of resistance to seed shattering in kleingrass, *Panicum coloratum* L. *Euphytica* 35(3): 687–694. doi: 10.1007/BF00028576.
- Zabala, J.M., L. Marinoni, J.A. Giavedoni, and G.E. Schrauf. (2018). Breeding strategies in *Melilotus albus* Desr., a salt-tolerant forage legume. *Euphytica* 214(2): 0–15. doi: 10.1007/s10681-017-2031-0.
- Zandalinas, S.I., R. Mittler, D. Balfagón, V. Arbona, and A. Gómez-Cadenas. (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol. Plant.* 162(1): 2–12. doi: 10.1111/ppl.12540.
- Zhang, H.X., and E. Blumwald. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19(8): 765–768. doi: 10.1038/90824.