

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJÁN



**Aplicación de técnicas no convencionales para
la obtención de variabilidad genética en
Panicum maximum Jacq.**

Tesis para optar al título de "Doctor en Ciencias Aplicadas"

Presentado por:

Ing. Agr. Julian Guariniello

Argentina

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJÁN

Aplicación de técnicas no convencionales para la obtención de
variabilidad genética en *Panicum maximum* Jacq.

Doctorando: Ing. Agr. Julian Guariniello

Director: Dr. Fernando Ardila

Co-directora: Dra. Lorena Ingala

Instituto de Genética "Ewald A. Favret".
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas.
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.



Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”



*A mi familia que es todo lo que tengo.
A mi abuela que me cuida desde arriba.
Y a Emma, que es el sol que nos ilumina a todos.*



AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva por otorgarme la posibilidad de realizar mi formación de posgrado. Y, especialmente, al Dr. Raúl Ríos quién pensó en mi para postularme a la beca.

Al Dr. Fernando Ardila y a la Dra. Lorena Ingala, por su apoyo y guía, principalmente por su confianza y la libertad de trabajo brindada. Y a Pascual por su ayuda y sus charlas.

Al Dr. Alberto Prina, Alicia Martínez y Vanina por transmitirme todo su conocimiento, por su buena predisposición y su tiempo.

A Romi y Caro por introducirme y enseñarme todo sobre el cultivo in vitro y por su entrañable amistad.

A mis hermanas de la vida, Ceci y Lore, las que me formaron en marcadores moleculares e hidroponía, pero más me enseñaron de la amistad, los valores y la vida.

A Juan, Guille y Abel por ayudarme en el manejo del material en los invernáculos y transmitirme su experiencia.

A Carmen y Grachu, porque siempre que las necesité me dieron una mano en el laboratorio.

A Laurita, Lore y la Colo, por el apoyo y los almuerzos catárticos.

A la Rusa, Anita, Majo y Hugo por hacer más fácil mis días de oficina. Y a Nadia también!

A Juan Pablo, Fabi y Vivi, quienes hicieron más divertidos los Congresos y siempre me empujaron para adelante.

A la gente de Tucumán: Florencia, Luis y Hector, que aportaron los materiales.

A todos los que están y pasaron por mi lugar de trabajo, el Grupo de Mejoramiento Molecular de Especies Forrajeras y Salicáceas: a Andy y Ara, Ana, Pablo y Yesi, Victor, Coloch, Marce, Andrea, Marcelo, Luciano, Adrián, Mayra, Cheche, Pato, Cristina, Elba, Gabi, Nico, y los que me pueda estar olvidando.

Muy especialmente a mis amigos de La Plata (Mariano, Santi y Pablo, Joaco, Juani y Chocho, Cañete y Gus) y a los de Trapecio (Dani, Gas y Flor, Caro y Ale, Nadia, Sofi, Ro y Julito). También a los de la Escuela (con Maxi y Mariana a la cabeza), los de la vida y los de siempre, por los momentos compartidos y por bancar mis ausencias, por su amistad invaluable.

A Javo y Max, Pablo y Gustavo, por su amistad y su confianza, los viajes y cenas, las charlas y consejos.

A Claudio, padre ejemplar de mi hija, la negrita Mina (amor de mi vida), por confiar siempre en mí y por el apoyo constante.

A mi familia, por la paciencia y el empuje, por estar siempre afectivamente en cada etapa de progreso.

Y a mi novio Alejandro, por esperarme tanto tiempo, por estar siempre, por ayudarme sin saber cómo, por quererme a pesar de todo.

Gracias.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Guariniello, J., Randazzo, C. P., Setten, L. M., Lisi, C. D., Ortega Masagué, M. F., Martinez Calsina, L., Ferrari Usandizaga, S., Goldfarb, M. C., Borrajo, C., Andrés, A. N., Pagano, E. M. y Ardila, F. (2012). Enfoques no convencionales para su aplicación en el mejoramiento genético de especies forrajeras subtropicales. Jornadas Latinoamericanas de Recursos Genéticos, Mejoramiento y Biotecnología de Especies Forrajeras. Pergamino, Buenos Aires.

Guariniello, J., Randazzo, C. P., Ortega, M. F., Pagano, E. M. y Ardila, F. (2012). Embriogénesis somática en *Panicum maximum* Jacq. XLI Congreso SAG. Rosario, Santa Fe.

Cuyeu, A.R, Guariniello, J., Randazzo, C. P., Rosso, B., Pagano, E.M. y Ardila, F. (2011). Análisis citogenético en especies forrajeras para regiones extra-pampeanas. XL Congreso SAG. Corrientes.

Randazzo, C. P, Guariniello, J., Cuyeu, R., Borrajo, C. y Pagano, E. M. (2011). Adaptación de la técnica de microsatélites para la caracterización genética de *Setaria sphacelata*. XL Congreso SAG. Corrientes.

Cuyeu, A. R., Randazzo, C., Guariniello, J., Ferrari, S., Goldfarb, M. C. y Pagano, E. M. (2011). Adaptación de la técnica de microsatélites para la caracterización genética de *Acroceras macrum*” XL Congreso SAG. Corrientes.

Ortega Masagué, M. F., Erazzú, L., Guariniello, J., Andrés, A., Pastoriza, A. y Coviella, A. (2011). Caracterización de poblaciones de *Panicum maximum* Jacq.” XL Congreso Argentino de Genética. Corrientes, Argentina.

Guariniello, J., Randazzo, C. P., Cuyeu, A. R., Ortega, M. F., Pagano, E. M. y Ardila, F. (2011). Aplicación de marcadores moleculares en *Panicum maximum* Jacq." Congreso REDBIO. Buenos Aires.

Ortega Masagué, M. F, Erazzú, L., Andrés, A., Pérez, H., Martínez Calsina, L., Guariniello, J., Coviella, A. y Pastoriza, A. (2011). Caracterización estructural, morfogenética y nivel de ploidía de poblaciones de *Panicum maximum* Jacq. distribuídas en la Región del Noroeste Argentino". Simposio SIMF III. Brasil.

ABREVIATURAS

2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético

°C: grados Celsius

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados

BAP: 6-Bencilaminopurina

CE: Conductividad eléctrica

CSIRO: *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*

CTAB: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio

dNTP : Trifosfato de desoxirribonucleósido

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

EMBRAPA: *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

EMS: sulfonato de etil metano

GA₃: ácido giberélico

h: hora

ha: hectárea

H₂O_d: agua destilada

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

IIACS: Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Kin: kinetina

kW: kilowatts

MAS: Selección asistida por marcadores moleculares

mA: miliamper

mg: miligramo

min: minuto

mm: milímetro

mM: milimolar

μl: microlitro

μM: micromolar

MS: materia seca

NEA: Noreste Argentino

NOA: Noroeste Argentino

ng: nanogramo

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Pp: precipitaciones

RAPD: ADN Polimórfico Amplificado al Azar

RFLP: Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción

rpm: revoluciones por minuto

seg: segundo

SSR: Repeticiones de secuencias simples o microsatélites

T: Temperatura

Taq: *Thermophilus aquaticus*

TBE: Buffer de Electroforesis Tris-borato/EDTA

TE: TRIS-EDTA

Tn: tonelada

TRIS: Tri (hidroximetil) aminometano

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UPGMA: Método de agrupamiento por grupo par con medias no ponderadas

UV: ultravioleta

V: volts

W:watts

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ix
COMUNICACIONES A CONGRESOS	xi
ABREVIATURAS	xiii
ÍNDICE GENERAL.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xxiii
RESUMEN	xxv
ABSTRACT	xxix
I. Introducción General.....	31
1.1. La ganadería en la Argentina: Problemática actual.....	33
1.2. “Gatton Panic” (<i>Panicum maximum</i> cv. Gatton): la especie megatérmica con mayor índice de siembra	39
1.2.1. Descripción botánica.....	39
1.2.2. Características agronómicas y productivas.....	41
1.2.3. Mejoramiento genético. Limitantes.	43
1.3. Hipótesis y objetivos	45
1.3.1. Hipótesis.....	45
1.3.2. Objetivo general	46
1.3.3. Objetivos específicos	46
II. Evaluación de la calidad de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	47
2.1. Introducción	49
2.1.1. Descripción.....	49
2.1.1.1. Pureza varietal.....	49
2.1.1.2. Pureza físico-botánica	50
2.1.1.3. Pureza genética: recuento cromosómico	50
2.1.2. Sanidad de semillas.....	53
2.1.3. Calidad fisiológica.....	53
2.2. Materiales y métodos	58
2.2.1. Sanidad de semillas.....	58
2.2.2. Pureza genética: Conteo cromosómico	58
2.2.3. Calidad fisiológica.....	60
2.2.3.1. Test de viabilidad de semillas – Tetrazolio (TZ).	60

2.2.3.2. Evaluación del poder germinativo (PG) bajo diferentes sustratos...	61
2.2.3.3. Evaluación de la dormición de semillas.....	62
2.2.3.4. Quiebre de la dormición por escarificación química de semillas.....	62
2.3. Resultados	65
2.4. Discusión	70
2.5. Conclusión.....	74
2.6. Bibliografía	75
2.7. ANEXO	79
III. Cultivo in vitro	81
3.1. Introducción	83
3.1.1. Clasificación	84
3.1.2. Aspectos generales.....	85
3.1.2.1. Desinfección	85
3.1.2.2. Material vegetal	86
3.1.2.3. Condiciones químicas: medio de cultivo	86
3.1.2.4. Condiciones físicas	90
3.1.3. Variación somaclonal	90
3.1.4. Antecedentes.....	92
3.2. Materiales y métodos	95
3.2.1. Semillas maduras.....	95
3.2.1.1. Desinfección	95
3.2.1.2. Inducción y regeneración	96
3.2.1.3. Aclimatación-Rustificación	98
3.2.2. Segmentos de tallo.....	99
3.2.2.1. Desinfección	99
3.2.2.2. Inducción y regeneración	99
3.2.2.3. Inducción según la posición	100
3.2.2.4. Producción de vástagos <i>in vitro</i>	100
3.2.3. Inflorescencias maduras e inmaduras. Ovarios.....	100
3.2.3.1. Desinfección	100
3.2.3.2. Inducción y regeneración	101
3.2.3.3. Inducción vs. posición.....	101
3.2.3.4. Inducción de ovarios pre y post-antesis	101
3.2.3.5. Inducción de floración <i>in vitro</i>	102
3.3. Resultados	103
3.3.1. Semillas maduras.....	103
3.3.2. Tallos.....	106

3.3.3. Inflorescencias inmaduras y ovarios	110
3.4. Discusión	121
3.5. Conclusión.....	131
3.6. Bibliografía	132
3.7. ANEXO	140
V. Mutagénesis.....	141
4.1. Introducción	143
4.1.1. Clasificación	144
4.1.1.1. Agentes físicos.....	144
4.1.1.2. Agentes químicos.....	147
4.1.1.3. Agentes biológicos.....	148
4.1.2. Aspectos generales.....	148
4.1.3. Antecedentes.....	150
4.2. Materiales y Métodos.....	152
4.2.1. Mutagénesis química (EMS).....	152
4.2.1.1. Determinación de la DL ₅₀	152
4.2.1.2. Evaluación de la M1 y M2.	155
4.2.2. Mutagénesis física (Rayos x).....	156
4.2.2.1. Determinación de la DL ₅₀	156
4.2.2.2. Evaluación de la supervivencia en la M1	158
4.2.2.3. Evaluación morfológica de las plántulas M1 <i>in vitro</i> y observación de mutaciones clorofílicas en la M1 y M2.....	158
4.3. Resultados	160
4.3.1. Mutagénesis química con EMS.....	160
4.3.2. Mutagénesis física con rayos X.....	165
4.4. Discusión	171
4.5. Conclusión.....	181
4.6. Bibliografía	182
V. Estrés abiótico - Salinidad	187
5.1. Introducción	189
5.2. Materiales y métodos	197
5.2.1. Efecto del estrés iónico y osmótico sobre la germinación de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	197
5.2.2. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	199
5.2.3. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de plántulas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton en condiciones de hidroponía.	200

5.3. Resultados	205
5.4. Discusión	224
5.5. Conclusión	242
5.6. Bibliografía	244
5.7. ANEXO	249
VI. Herramientas de detección de variabilidad genética	251
6.1. Introducción	253
6.1.1. Marcadores moleculares: consideraciones generales	253
6.1.2. Microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR)	256
6.2. Materiales y métodos	259
6.2.1. Origen y cultivo del material vegetal	259
6.2.2. SSR (microsatélites)	260
6.2.2.1. Extracción de ADN.....	260
6.2.2.2. Amplificación mediante la PCR	261
6.2.2.2.1. SSR	261
6.2.2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	264
6.2.2.2.3. Geles de agarosa MetaPhor.....	266
6.2.2.2.4. Geles de poliacrilamida	266
6.2.2.2.5. Análisis estadístico	267
6.3. Resultados	270
6.4. Discusión	276
6.5. Conclusión	279
6.6. Bibliografía	280
6.7. ANEXO	283
6.7.1. Protocolos de extracción de ADN genómico vegetal	283
6.7.1.1. Puecher y colaboradores (2001).....	283
6.7.1.2. Saghai-Marroof modificado – M. Pérez de la Torre y col.(2008)	285
6.7.2. Insumos para la extracción de ADN y la transferencia de SSR.....	287
CONCLUSIÓN GENERAL	293

ÍNDICE DE FIGURAS
Introducción general

Figura 1.1. <i>Panicum maximum</i> Jacq.....	40
Figura 1.2. Distribución de la producción anual de pasturas de "Gatton Panic" en el oeste chaqueño.....	42

Evaluación de la calidad de semillas de *P. maximum* cv. Gatton

Figura 2.1. Cariopse de <i>Panicum maximum</i> Jacq.....	50
Figura 2.2. Reacción de reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio a 1,3,5-trifenilformazán.....	54
Figura 2.3. Esquema del cariopse de <i>Panicum maximum</i> Jacq.....	60
Figura 2.4. Conteo cromosómico de ápices radiculares de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	65
Figura 2.5. Viabilidad de semillas por test de tetrazolio de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	66
Figura 2.6. Efecto del sustrato de germinación y el KNO ₃ (0,2%) sobre el poder germinativo de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	67
Figura 2.7. Efecto de la escarificación química con ácido sulfúrico en la germinación de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	69
Figura 2.8. Efecto del pretratamiento con ácido giberélico (GA ₃) y la alternancia de temperaturas en la germinación de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	69

Cultivo in vitro

Figura 3.1: Etapas de la regeneración <i>in vitro</i> por embriogénesis indirecta....	85
Figura 3.2. Efecto de la concentración y el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio sobre la contaminación y germinación de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	104
Figura 3.3. Efecto de la aplicación de 2,4 D en la inducción de callos a partir de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	105
Figura 3.4. Efecto de la aplicación de 2,4 D y BAP en la inducción de callos rizogénicos a partir de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	106
Figura 3.5. Efecto de la aplicación de 2,4 D en la inducción de callos a partir de segmentos de tallo de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	107
Figura 3.6. Inducción de callos a partir de segmentos de tallo de <i>P. maximum</i> cv. Gatton en función de su posición en el macollo.....	109
Figura 3.7. Inducción de callos rizogénicos a partir de semilla madura y tallos.....	109

Figura 3.8. Inducción de yemas y proliferación de macollos <i>in vitro</i> de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	110
Figura 3.9. Inducción de floración <i>in vitro</i> de <i>P. maximum</i> cv. Gatton a partir de tallos (E4).....	110
Figura 3.10. Efecto de la aplicación de 2,4 D en la inducción de callos a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	111
Figura 3.11. Inducción de callos a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	112
Figura 3.12. Efecto de la concentración de 2,4 D y BAP en la regeneración (%) de callos embriogénicos de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	113
Figura 3.13. Inducción de callos a partir de espiguillas de inflorescencias inmaduras (R1) según su posición en la panoja.....	114
Figura 3.14. Esquema de la embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	117
Figura 3.15. Regeneración de plántulas por embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras (R0). Albinismo.....	118
Figura 3.16. Regenerante con presencia de mutaciones clorofílicas en la rustificación.....	119
Figura 3.17. Estadística descriptiva de la cosecha de 10 panojas de la variante obtenida por cultivo <i>in vitro</i>	120
 Mutagénesis	
Figura 4.1. Modelo de un tubo de rayos x.....	145
Figura 4.2. Fórmula química de sulfonato de etil metano (EMS).....	147
Figura 4.3. Esquema de las principales etapas en las que se registran los efectos de los tratamientos mutagénicos.....	150
Figura 4.4. Ensayo de mutagénesis química sobre semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	160
Figura 4.5: Germinación de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton tratadas con EMS, con y sin remojo previo en agua.....	161
Figura 4.6. Variaciones clorofílicas.....	163
Figura 4.7. Efecto de la dosis de rayos x sobre la germinación de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	166
Figura 4.8. Daño en la 1ª hoja y enrollamiento de la 3ª hoja de plántulas M1 tratadas con 240 Gy con remojo previo en H ₂ O.....	166
Figura 4.9. Efecto de la dosis de rayos x sobre la supervivencia de plántulas obtenidas a partir de semillas prehumedecidas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	167

Figura 4.10. Longitud de la raíz y altura del tallo de plántulas M1 obtenidas de semillas tratadas con 80, 100 y 120 Gy a los 7 días de la siembra en medio MS.....	168
Figura 4.11. Estrías en hojas y plántulas albinas presentes en la M2 tratadas con 120 y 80 Gy con remojo previo en H ₂ O (16 h).....	169
 <i>Estrés abiótico - Salinidad</i>	
Figura 5.1. Respuesta esquemática del efecto bifásico de la salinidad sobre el crecimiento.....	193
Figura 5.2. Evolución del contenido de agua en semillas durante la imbibición en soluciones con diferentes potenciales hídricos.....	195
Figura 5.3. Efecto del potencial y agente osmótico sobre la germinación de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	205
Figura 5.4. Regresión lineal entre el porcentaje de germinación acumulada a los 14 días desde la siembra y el potencial osmótico según el agente.....	207
Figura 5.5. Efecto de la salinidad en el crecimiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	209
Figura 5.6. Plántulas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton creciendo en un sistema hidropónico, previo al inicio de los tratamientos salinos.....	210
Figura 5.7. Efecto de la concentración de NaCl sobre la tasa de expansión foliar de <i>P. maximum</i> cv. Gatton a través del tiempo.....	211
Figura 5.8. Efecto de la concentración de NaCl sobre el área foliar .acumulada en el tiempo en relación al control de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	212
Figura 5.9. Efecto de la concentración de NaCl sobre el área foliar acumulada al día 54 en relación al control de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	213
Figura 5.10. Efecto de la concentración de NaCl sobre el nº de hojas verdes y senescentes de <i>P. maximum</i> cv. Gatton en el tiempo.....	214
Figura 5.11. Efecto de la concentración de NaCl sobre la altura de las plantas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	217
Figura 5.12. Biomasa aérea (g MS/planta) de <i>P. maximum</i> cv. Gatton creciendo en diferentes condiciones de salinidad en hidroponía.....	218
Figura 5.13. Contenido de agua (%) de las plantas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton creciendo en diferentes condiciones de salinidad en hidroponía.....	220
Figura 5.14. Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento radicular de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	221
Figura 5.15. Efecto de la concentración de NaCl sobre el peso seco del sistema radicular de <i>P. maximum</i> cv. Gatton en el tiempo.....	222

Herramientas de detección de variabilidad genética

Figura 6.1. Esquema de detección de variabilidad mediante SSR.....	257
Figura 6.2. Genotipos utilizados.....	260
Figura 6.3. Cuantificación de ADN.....	271
Figura 6.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	271
Figura 6.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	272
Figura 6.6: Dendograma obtenido por análisis <i>cluster</i> (UPGMA) basado en el coeficiente de similitud de <i>Jaccard</i> (1-S).....	275

ÍNDICE DE TABLAS
Evaluación de la calidad de semillas de *P. maximum* cv. Gatton

Tabla 2.1. Test de tetrazolio (TZ) de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	66
Tabla 2.2. Parámetros de calidad fisiológica de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton: viabilidad (V), poder germinativo (PG) y dormición (D).....	68

Cultivo in vitro

Tabla 3.1. Composición del medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962).....	97
Tabla 3.2. Tratamientos de desinfección de semillas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	104
Tabla 3.3. Efecto de la posición del explante en el tallo sobre la capacidad de inducción de callo de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	107
Tabla 3.4. Efecto de la concentración de 2,4 D y BAP sobre la inducción y regeneración de callos a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de <i>P. maximum</i> cv. Gatton.....	113

Mutagénesis

Tabla 4.1. EMS. Diluciones de trabajo.....	153
Tabla 4.2. Tasas de radiación según la distancia desde la fuente al blanco.....	157
Tabla 4.3. Tiempo de exposición a los rayos x según la dosis absorbida a 29 cm de la fuente.....	157
Tabla 4.4. Porcentaje de daño en la germinación, plántula y total con respecto al control para los tratamientos con 3, 4 y 5‰ EMS.....	162
Tabla 4.5. Número y porcentaje de variantes clorofílicas en la M1 y M2 para los tratamientos con 3, 4 y 5‰ EMS (18 h) sin remojo previo en agua.....	163
Tabla 4.6. Espectro de variantes clorofílicas contabilizadas en la M2.....	163
Tabla 4.7. Efecto de la dosis de EMS en la producción de semillas de las M1.	164
Tabla 4.8. N° de variantes M1 y M2 para los tratamientos con 80, 100, 120 Gy con remojo previo en agua.....	168
Tabla 4.9. Espectro de variantes clorofílicas contabilizadas en la M2.....	169
Tabla 4.10. Reducción en la altura del tallo con respecto al control en plántulas M1 tratadas con 80, 100 y 120 Gy.....	170

Estrés abiótico – Salinidad

Tabla 5.1. Clasificación de suelos afectados por sales.....	190
Tabla 5.2. Efectos de la salinidad de los suelos medida a través de su conductividad eléctrica (CE).....	191

Tabla 5.3. Agente y concentración de los tratamientos.....	198
Tabla 5.4. Composición de la solución nutritiva F.....	201
Tabla 5.5. Periodo de adaptación. Incremento gradual de la concentración salina de la solución de riego para cada tratamiento.....	202
Tabla 5.6. Germinación acumulada (%) a los 14 días desde la siembra según el agente y potencial osmótico.....	206
Tabla 5.7. Tiempo medio de germinación (MTG) e índice de velocidad de emergencia (ERI) según el agente y potencial osmótico.....	207
Tabla 5.8. Senescencia (%) de hojas de <i>P. maximum</i> cv. Gatton en el tiempo.....	214
Tabla 5.9. Efecto de la concentración de NaCl sobre el nº de nudos de <i>P. maximum</i> cv. Gatton en el tiempo.....	216
Tabla 5.10. Efecto de la concentración de NaCl sobre el nº de macollos de <i>P. maximum</i> cv. Gatton en el tiempo.....	219
Tabla 5.11. Correlación entre las variables cuantificadas a la finalización del ensayo.....	223
Herramientas de detección de variabilidad genética	
Tabla 6.1. Características generales de algunos marcadores genéticos.....	254
Tabla 6.2. SSR utilizados.....	262
Tabla 6.3. Matriz Básica de Datos (MBD) parcial. SSR de <i>P. maximum</i>	273
Tabla 6.4. Descripción de datos de SSR amplificados.....	273
Tabla 6.5. Descripción de datos de SSR informativos.....	273
Tabla 6.6. Matriz de distancia y similitud <i>Jaccard</i> (1-S) de SSR de <i>P. maximum</i>	274

RESUMEN

En los últimos años el incremento de la agricultura provocó un reordenamiento territorial de la ganadería hacia regiones extrapampeanas con ambientes más restrictivos. El "Gatton Panic" (*Panicum maximum* Jacq. cv. Gatton) fue introducido en la Argentina a fines de la década del 70 y, en la actualidad, es la forrajera megatérmica más difundida en el NOA. El cultivar posee un gran potencial de producción (6-9 Tn MS/ha), alto valor forrajero (60% Dig. MS, 12% PB) y es tolerante al pastoreo y a la sombra, por lo que se adapta bien a los sistemas silvopastoriles. Su principal limitante es la sensibilidad al estrés abiótico (bajas temperaturas, salinidad y sequía). Incrementar su tolerancia a tales condiciones aumentaría la superficie implantada y las opciones de siembra mejorando la oferta forrajera. Sin embargo, la falta o desconocimiento de la variabilidad en los materiales presentes en el país sumado a su complejo sistema reproductivo (apomixis) dificultan el mejoramiento. El desarrollo y la aplicación de técnicas biotecnológicas permitirá aumentar su variabilidad genética, hacer más eficientes los programas de mejoramiento y colaborar en el desarrollo de un mercado de cultivares de origen nacional que fortalecerá la sustentabilidad de la expansión ganadera en la región. En primer lugar, para esta tesis se dispuso de una muestra de semillas comerciales cuya calidad fue confirmada mediante citogenética ($2n=32$), test de viabilidad por tetrazolio (67,3%) y poder germinativo (29,7%). También se estudiaron metodologías para quebrar la dormición y para la desinfección de las semillas. Luego, se sembró un *stand* de plantas en invernáculo y evaluó la capacidad de regeneración *in vitro* de diversos explantes del cultivar

(semillas maduras, tallos e inflorescencias inmaduras) bajo distintas concentraciones y combinaciones hormonales. Así, se ajustó un protocolo de embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras (R0) sembradas en un medio MS con 5 mg/l 2,4 D y 0,15 mg/l BAP. De este modo, se obtuvo un 85,32% de inducción de callos y un 15,13% de callos embriogénicos, los cuales fueron repicados a un medio con 1 mg/l Kin y 1 mg/l Ga₃, donde regeneró un 2% de plantas completas. También se registraron problemas de oscurecimiento de callos y albinismo (10%). A los 50-65 días se obtuvieron 132 plantas entre las cuales se observó un individuo variegado que no transmitió su fenotipo a la progenie. El mismo protocolo también fue exitoso con el cultivar "Green Panic" (*P. maximum* var. *trichoglume* cv. Petrie) pero con menor eficiencia. Por otro lado, se estudió el tratamiento de semillas con dos agentes mutagénicos (EMS y rayos x) a diferentes concentraciones y condiciones de trabajo. Se calculó la DL₅₀ y la eficiencia (estimada como la proporción de mutaciones clorofílicas en la M2 en relación a la frecuencia de efectos indeseables, como letalidad o nivel de daño de las plantas M1) de cada mutágeno. Se ajustó un protocolo de mutagénesis química sobre semillas secas tratadas con una solución de EMS al 3‰ durante 18 h (eficiencia=0,083). Del mismo modo, se ajustó un protocolo de mutagénesis con rayos x exponiendo semillas prehumedecidas en agua (16h) a 120 Gy (eficiencia=0,058). Ambos protocolos son complementarios. Tales herramientas servirán para generar variabilidad. Luego, en búsqueda de un método de selección se analizó la respuesta de la germinación del cultivar comercial ante condiciones artificiales de sequía y salinidad (concentraciones isosmóticas de manitol y NaCl). De este modo, se observó que la reducción del potencial afectó el porcentaje, la velocidad

y el tiempo medio de germinación del cultivar. Asimismo, el tratamiento con NaCl generó un efecto detrimental aditivo debido a su componente iónico. Una concentración de 76 mM NaCl aprox. ($\psi_0 = -0,28$ Mpa) redujo la germinación en un 50%. De la misma manera, se analizó el crecimiento de plántulas cultivadas en hidroponía bajo diferentes concentraciones de NaCl. Se reveló que a partir de los 100 mM NaCl ($\psi_0 = -0,36$ MPa) en la solución de riego las plántulas evidenciaron signos notorios de estrés salino (fase iónica) (caída brusca en la tasa de expansión foliar en las hojas jóvenes y puntas senescidas en las hojas adultas) al sexto día de iniciado el tratamiento. En consecuencia, se redujo un 30,5% el área foliar acumulada, un 29,5% la altura y un 46,4% la biomasa seca acumulada a la finalización del ensayo. Tales concentraciones servirán como parámetro para la selección *in vitro* e *in vivo* de nuevos individuos tolerantes en sus diferentes etapas fenológicas. Por último, se realizó una transferencia exitosa de SSR diseñados en otras especies poáceas que permitió diferenciar al cultivar "Green Panic" del "Gatton Panic". La adaptación de un mayor número de SSR podrá utilizarse como herramienta para la detección molecular de variabilidad genética.

Palabras claves: conteo cromosómico – poder germinativo – dormición – embriogénesis somática – mutagénesis – EMS – rayos x – hidroponía – estrés hídrico salino – transferencia de SSR.

ABSTRACT

In recent years the increase in agriculture caused a territorial reorganization of livestock towards "extra pampeanas" regions that have more restrictive environments. "Gatton Panic" (*Panicum maximum* Jacq. cv. Gatton) is the warm forage specie most cultivated in the NOA but it has growth limitations. Improve its abiotic stress tolerance (to drought and/or salinity, for example) could increase forage implanted area and meat production, enriching the national forage seed market. The absence or lack of variability in the genetic material of Argentina and its complex reproductive system (apomixis) promoted the application of non-conventional breeding tools. In this thesis two mutagenesis protocols were adjusted. Dry seeds were treated with 3 ‰ EMS solution for about 18 h (efficiency = 0.083), and moistened seeds (16 h on H₂O) were exposed to 120 Gy x-rays (efficiency = 0.058). These dosis have showed higher efficiency according to germination rates and growth of seedlings. Both methods are complementary. Furthermore, a somatic embryogenesis protocol from immature inflorescences, which had not been reported in the literature, was developed. Regenerants from Gatton Panic and Green Panic were obtained. Cases of albinism and a variegated plant were reported but that phenotype was not transmitted to the offspring. Under artificial drought conditions (low osmotic potentials) the percentage, velocity and average time of germination were affected. An additive effect of salt treatments was observed due to ionic component. A concentration of 76 mM NaCl (7.6 dS/m) approx. ($\Psi_0 = -0.28$ Mpa) reduced the germination by 50%. Likewise, the seedlings growing at 100 mM NaCl ($\psi_0 = -0.36$ MPa) under

hydroponic system began experimenting salt stress (phase change) at the sixst day after treatment starts, showing a 30.5% reduction in leaf area, 29.5% in height and 46.4% of dry biomass at the end of the trial. Such concentrations could be used for the selection of new tolerant individuals at different phenological stages under "*in vitro*" or "*in vivo*" systems. Finally, a successful transferability of SSRs designed from filogenetically related grass species was achieved, allowing us to differentiate the Green Panic of Gatton Panic. The adaptation of more SSRs will allow it to be used as a tool for molecular detection of genetic variability.

Keywords: chromosome counting - germination - dormancy - mutagenesis - x-ray - EMS - somatic embryogenesis - hydroponic - abiotic stress - drought - salinity - SSR - cross amplification.

**CAPÍTULO I:
INTRODUCCIÓN GENERAL**

I. Introducción General

1.1. La ganadería en la Argentina: Problemática actual

La llegada de Cristóbal Colón al continente americano es considerada un hito histórico por la magnitud del impacto cultural que esta generó. Este “choque cultural” trajo consecuencias drásticas para las sociedades americanas, como la pérdida de idiomas y creencias motivada por la evangelización española y, aún peor, la pérdida masiva de pueblos ocasionada por la difusión de nuevas enfermedades y las luchas a causa de la extracción y comercialización de riquezas, tierras y esclavos en manos de los europeos (Ortiz, 1940).

No obstante, es importante destacar que aquella transculturación* también modificó y enriqueció la dieta habitual en ambos continentes, ya que fomentó el intercambio de productos alimentarios: principalmente la difusión mundial de los alimentos americanos (maíz, papa, batata, zapallo, tomate y ají) e incluso el tabaco y la introducción al “nuevo mundo” del ganado ovino, bovino, equino y otros animales de granja.

En la región del Plata, el ganado bovino, favorecido por los buenos pastos y aguadas, se adaptó y multiplicó en forma extraordinaria como ganado “silvestre” o cimarrón, dando origen al ganado criollo. Durante los siglos XVII y XVIII la cacería de vacunos, llamadas comúnmente “vaquerías”, fue la principal forma de explotación bovina y, prácticamente, la única actividad productiva de nuestros campos; siendo los productos

* “El vocablo *transculturación* expresa mejor las diferentes fases del proceso transitivo de una cultura a otra, porque éste no consiste solamente en adquirir una distinta cultura, sino que el proceso implica también necesariamente la pérdida o desarraigo de una cultura precedente y, además, significa la consiguiente creación de nuevos fenómenos culturales” (Ortiz, 1940).

exportados cebo, lanas y cueros. En cambio, la agricultura se efectuaba sólo en escala muy reducida (Giberti, 1986).

Con la expansión de la frontera militar hacia fines del siglo XVIII y el otorgamiento de tierras mediante la Ley de Enfitéusis[^] a principios del XIX nace el concepto del "rodeo" y "la estancia". Luego, este proceso se vio reforzado con la constitución del Estado Nacional, la incorporación de territorio a través de las "Campañas del Desierto" y el fomento de la compra-venta de tierras públicas, sentando las bases de la ganadería actual (Giberti, 1986).

Durante ese periodo, el establecimiento de saladeros permitió la obtención de productos cárnicos exportables. Prontamente, con la incorporación de tecnología a la navegación marítima (buques frigoríficos), se inició la exportación de carnes refrigeradas hacia Europa (Giberti, 1986).

Simultáneamente, la promoción de inversiones locales en cultivos y silos junto con el desembarco de inversiones inglesas en ferrocarriles y finanzas favoreció el veloz desarrollo de la agricultura en la región pampeana, siendo el trigo y el maíz sus principales productos exportables.

Así, en el país se instauró un modelo económico netamente agroexportador, que tuvo su auge durante el periodo 1880-1916, y adquirió la denominación de "granero del mundo" (Giberti, 1986).

A partir de 1930, el sector agrícola comenzó a mostrar signos de decadencia y estancamiento. Pero luego, en la década del 60, la

[^] La enfitéusis es un contrato mediante el cual el propietario de un bien inmueble (*enfitéuticario*) trasmite a otro (*enfitéuta*) el dominio útil de la cosa por un plazo largo o a perpetuidad, y éste se obliga a pagar anualmente un precio (*canon*). La Ley de Enfitéusis, sancionada el 18 de mayo de 1826, fue promulgada bajo el gobierno de Bernardino Rivadavia (Infesta de Guerci, 2007).

generalización de la cosecha mecánica, el uso de los agroquímicos, la difusión de los híbridos y el perfeccionamiento de las prácticas de cultivo produjeron un salto tecnológico y su reactivación.

En la década del 90, la crisis sanitaria internacional ocasionada por el Síndrome Espongiforme Bovino ("síndrome de la vaca loca") promovió en forma directa la exportación de carnes argentinas, libres de tal enfermedad. Indirectamente, este acontecimiento también impulsó la suba de los precios internacionales de granos, ya que los sistemas ganaderos intensivos y semi-intensivos europeos y norteamericanos necesitaron reemplazar la fuente de proteínas en la dieta: las de origen animal (harina de carne, sangre o hueso) por vegetal (harina de soja, principalmente).

Esta fuerte demanda sumada a la disminución de los precios relativos de los insumos y bienes de capital debido a la convertibilidad promovió una serie de modificaciones en la agricultura. La difusión de la siembra directa[♥] junto con la generalización del doble cultivo trigo-soja RR[♦] y la utilización del herbicida glifosato de amonio como paquete tecnológico, le confirió a la actividad agrícola una mayor rentabilidad. Asimismo, posibilitó la incorporación y modernización de la maquinaria agrícola y el aumento en la aplicación de fertilizantes, factor determinante de los mayores rendimientos alcanzados (FAUBA, 2003).

[♥] Sistema de producción que consiste en la remoción del suelo exclusivamente en el surco donde se efectuará la siembra (Santanatoglia *et al.*, 2000).

[♦] En 1991, se crea la CONABIA encargada de regular y evaluar la bioseguridad de los cultivos genéticamente modificados, y en 1996 se modifica la Ley de Patentes brindando la protección de los procesos y productos biotecnológicos. Comienza la producción y comercialización de soja RR ("Roundup Ready", resistente al glifosato) por Monsanto Argentina S.A.I.C. (Solleiro & Castañon, 2003).

En consecuencia, durante la década del 90 se produjo una expansión de la agricultura y un record de cosecha año tras año. En efecto, el incremento de la producción de soja fue del 39%, principalmente, debido al aumento del área cultivada (36%) en zonas tradicionales y a la expansión del área cultivada hacia zonas ganaderas. Cabe aclarar que dicha expansión no implicó una reducción en los rendimientos por hectárea (FAUBA, 2003).

Este avance de la frontera agrícola sobre campos típicamente destinados a pasturas provocó el desplazamiento de la ganadería hacia regiones extra-pampeanas (Rearte, 2011). Si bien la región pampeana mantuvo su liderazgo conteniendo el 51% del stock ganadero nacional, en el periodo 2003-2011 el número de cabezas disminuyó un 25,5% *versus* un aumento del 10,9% y 35,1% que se produjo en las regiones del NEA y NOA, respectivamente (Canosa, 2012).

El Noroeste Argentino (NOA), comprendido por las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santiago del Estero, oeste de Chaco y Formosa, y norte de Córdoba, es la región extrapampeana que posee el mayor potencial de crecimiento ganadero. Si bien la participación de la región en el stock nacional durante el período 1947-1988 osciló entre 3% y 5%, su aporte desde la década del 90 a la actualidad ha ido en aumento, llegando a representar el 6% en el 2012 (Observatorio Ganadero, 2012).

Esta región cuenta con 24,7 millones de ha con aptitud ganadera caracterizadas por presentar lluvias escasas y estacionales, altas temperaturas e insolación durante el verano y suelos heterogéneos con diferentes texturas y grados de salinidad (De Leon, 2004). Tales condiciones determinaron que la estructura de la vegetación se componga

casi exclusivamente de gramíneas nativas de crecimiento estival, un estrato arbustivo dominante y un estrato arbóreo que ha sufrido históricamente procesos de talado. Bajo estas limitantes edafoclimáticas, sumado a la rápida degradación del pastizal natural por el progreso de la agricultura, se realizan las actividades de cría y recría de ganado vacuno (De Leon, 2004; Rearte, 2004 y 2007).

Aquel reordenamiento territorial de la ganadería hacia estos ambientes más restrictivos implicó la necesidad de modificar la oferta forrajera en cuanto a cantidad, calidad y distribución de la producción, para cubrir el aumento de la carga animal y los diferentes requerimientos nutricionales de los “nuevos” sistemas ganaderos (recría-invernada) (Rearte, 2010).

En relación a ello, se observa que la distribución de los animales en el NOA tiene mayor preponderancia en la región este de Salta y Santiago del Estero, y oeste de Chaco en correspondencia con la mayor oferta forrajera alcanzada en estos departamentos. Esta diferencia de receptividad es explicada por la incorporación de tierras de monte en sistemas silvopastoriles y la implantación de pasturas megatérmicas* de gran rendimiento forrajero (Observatorio Ganadero, 2013).

En el 2008, el NOA registró unas 700.000 ha de forrajeras implantadas, de las cuales, el 80% correspondió a *Panicum maximum* cv. Gatton, conocido comúnmente como “Gatton panic” (Perez, 2005). En

• Pasturas compuestas por gramíneas forrajeras con la vía fotosintética de C4. Se caracterizan por su alta eficiencia en el uso de la luz y el agua, por lo que se encuentran adaptadas a condiciones de clima tropical y subtropical. En climas templados presentan un crecimiento marcadamente estival (Deregibus & Ayala Torales, 2003).

una encuesta del 2010 se observó que aproximadamente un 9,7% de la superficie de Chaco estaba destinada a pasturas perennes, de las cuales el 68% estaba representado por este cultivar (Chiossone & Vicini, 2012) (ver 1.2). Vale aquí mencionar que el territorio del NOA posee el potencial para implantar 4 millones de hectáreas con pasturas cultivadas perennes (Fundación del Tucumán, 2010).

Para finalizar, cabe recordar que la población mundial está creciendo a un ritmo sostenido, lo que se traduce en un aumento constante de la demanda de alimentos. En este sentido, vale la pena resaltar el caso particular de la economía emergente de China, donde se observa una notable movilidad de clases socioeconómicas y el consiguiente aumento del poder adquisitivo de su población, que genera un cambio en el hábito del consumidor. Ambos factores determinan no solo un aumento en la demanda de alimentos sino, especialmente, en la demanda mundial de proteínas animales (Canosa, 2012).

En este contexto internacional, en el 2010 la Argentina acordó un Plan Estratégico Agroalimentario y Agroindustrial donde fijó metas y objetivos para la cadena de la carne, entre otras, que permitirían aumentar un 10% el stock ganadero, un 26% la faena y un 46% la producción de carne, permitiendo aumentar la exportación en un 400% para el 2020 (MAGYP, 2010).

En esta línea, hay que destacar el reciente reconocimiento de la Argentina como país libre de aftosa por parte de los Estados Unidos y la conveniente reapertura del mercado de productos cárnicos (cerrado hace 14 años) hacia este país, México y Canadá (MAGYP, 2015).

1.2. "Gatton Panic" (*Panicum maximum* cv. Gatton): la especie megatérmica con mayor índice de siembra

1.2.1. Descripción botánica

Panicum maximum Jacq. pertenece a la familia de las Poáceas, subfamilia *Panicoideae*, tribu *Paniceae*.

Son plantas perennes que forman densas matas, de hasta 3 m de altura y de 1 a 1,5 m de diámetro. Los tallos son comprimidos, erectos y ascendentes, con base aplanada de coloración violácea y entrenudos cortos. Las vainas son verdes a rojizas y pueden contener pelos según el cultivar. La zona de unión de la vaina con la lámina presenta un mechón de pelos que se continúa hasta la base y las lígulas son ciliadas. Las láminas foliares son lanceoladas, largas y sedosas, con una vena central fuerte y pronunciada en el envés. La inflorescencia se presenta en forma de panoja abierta piramidal de 12 a 40 cm de longitud, compuesta por espiguillas oblongas de aproximadamente 3,5 mm de largo y coloración rojiza a la madurez. Las raíces son fibrosas, largas y nudosas, y ocasionalmente tienen rizomas (Figura 1.1).

Son plantas de producción estival (tipo C4) y alto valor forrajero, muy utilizadas en climas tropicales y subtropicales.

En su zona de origen, Kenia y Tanzania, África, integra un complejo agámico con otras dos especies, *P. infestum* Anders y *P. trichocladum* K. Schum., que poseen igual número cromosómico ($2n=32$), y generan híbridos por cruzamientos espontáneos. Sin embargo, su modo de reproducción es preferentemente apomíctico facultativo (Savidan, 1980; Savidan & Pernès, 1982).

La apomixis es definida como la reproducción asexual a través de semilla. En *P. maximum* resulta de la formación de un saco embrionario apospórico seguido por el desarrollo autónomo del embrión (partenogénesis) junto con la fertilización del endosperma (pseudogamia) (Carneiro *et al.*, 2006).

En esta especie existen poblaciones naturales de individuos estrictamente sexuales y otros apomícticos entre los cuales la recombinación genética es posible. Sin embargo, como el modo reproductivo está asociado al nivel de ploidía, el flujo génico es complejo y sucede a través de un ciclo diploide-tetraploide-dihaploide (Asker, 1979; Savidan & Pernès, 1982).

Así, los genotipos estrictamente sexuales son sólo un 7-8% y diploides ($2n=16$); mientras que la gran mayoría son tetraploides ($2n=32$) y apomícticos facultativos, es decir, experimentan una baja tasa de sexualidad residual (Savidan, 1980; Savidan & Pernès, 1982; Ebina *et al.*, 2007).



Figura 1.1. *Panicum maximum* Jacq. (tomado de Watson & Dallwitz, 1992).

1.2.2. Características agronómicas y productivas

A nivel productivo existe una variedad de cultivares, que pueden ser agrupados agronómica y comercialmente en base a su altura y requerimiento hídrico:

- tipo intermedio, cuyos requerimientos van desde los 700 mm anuales, como "Gatton panic" y "Green panic" (*P. maximum* var. *trichoglume* cv. Petrie);
- tipo alto, cuyos requerimientos alcanzan los 1200 mm anuales, como los cultivares Centenario, Tanzânia y Mombaça.

"Gatton panic" fue desarrollado a partir de materiales originarios de Zimbabwe por la *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO) en 1964 y registrado en Queensland, Australia, en 1971 (Barnard, 1972a). Probablemente, fue introducido en Argentina en la década del setenta y se distribuyó ampliamente entre los 450 mm de precipitaciones anuales al oeste y los 900 mm al este, siendo el cultivar de mayor difusión en el NOA (Perez, 2005).

El mismo es destacado por presentar un gran potencial de producción (6-9 Tn MS/ha), mayor calidad que otros pastos tropicales (60% digestibilidad MS, 12% proteína bruta) y responde rápidamente al aumento de las precipitaciones con picos explosivos de producción. En efecto, se observa que entre los meses de noviembre y febrero produce casi el 80% de la materia seca del ciclo (Figura 1.2).

Las pasturas de "Gatton Panic" son utilizadas tanto para pastoreo en verde como diferido en pie y, además, poseen una excelente aptitud para la confección de rollos. Estas son de fácil manejo y persistencia ya que el cultivar presenta una alta tasa de resiembra natural y exhibe alta tolerancia

al pastoreo y a la sombra, razón por lo cual se adapta bien a los sistemas silvopastoriles (Aganga & Tshwenyane, 2004; Perez, 2005).

A diferencia del "Gatton Panic", el "Green panic" tiene hojas de color verde claro, tallos pilosos y tolera la sequía en mayor grado (Barnard, 1972b).

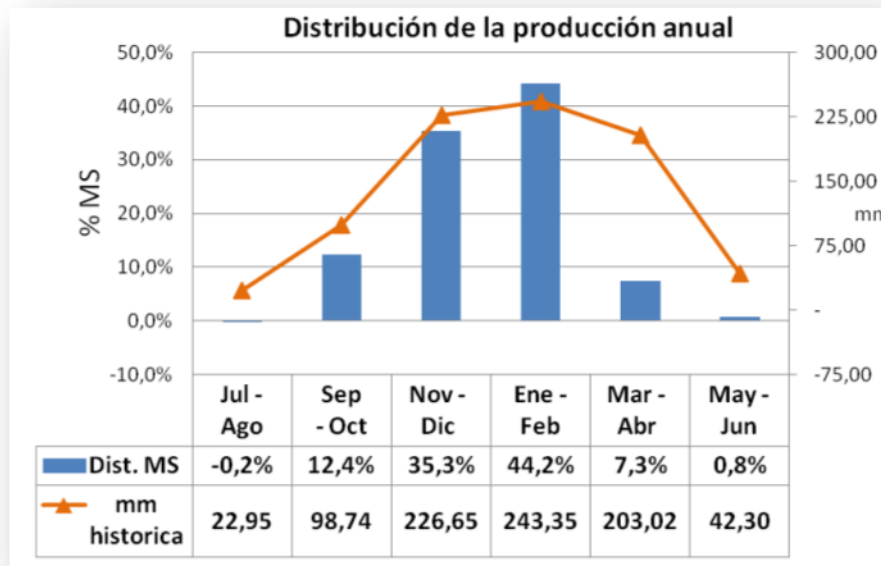


Figura 1.2. Distribución de la producción anual de pasturas de "Gatton Panic" en el oeste chaqueño. (Tomado de Chiossone & Vicini, 2012)

Las principales limitantes señaladas para esta especie en la Argentina son la sensibilidad a las bajas temperaturas (Ludlow, 1980) y la baja tolerancia a la salinidad y a la sequía. En efecto, cuando las temperaturas disminuyen por debajo de los 15 °C durante el otoño se desencadena la senescencia foliar y la pérdida de la biomasa aérea. Del mismo modo, hasta que las temperaturas no superan los 15 °C se retrasa el rebrote primaveral. Este doble efecto determina un ciclo productivo corto y una producción de materia seca de la pastura acotada.

En forma similar, el otro factor que determina la concentración de la producción es la distribución de las precipitaciones y, por lo tanto, el contenido de agua del suelo (Figura 1.2). En relación a ello, la implantación de la pastura en suelos que inducen condiciones de estrés hídrico o hídrico-salino (siembra sobre suelos salinos) es dificultosa debido a los efectos negativos sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas, determinando menores rendimientos y persistencia de la pastura.

Tal merma de producción a causa de las condiciones edafoclimáticas de ciertos ambientes (bajos salinos) puede ser cubierta con la incorporación de otras especies a la cadena forrajera (*Chloris gayana* o *Cenchrus ciliaris*) (Radrizzani *et al.*, 2003, 2004; Cornacchione, 2008). Sin embargo, el mejoramiento genético de este cultivar orientado a incrementar su tolerancia a tales condiciones, no sólo incrementaría la superficie implantada y la producción de materia seca acumulada de las pasturas en beneficio de la producción de carne en la región, sino que aumentaría las opciones de siembra de forrajeras megatérmicas de alta calidad enriqueciendo el mercado de semillas.

1.2.3. Mejoramiento genético. Limitantes.

El mejoramiento genético convencional de cualquier cultivo recurre a la variabilidad natural presente en los diferentes ecotipos, explotada a través de la recombinación sexual y la posterior selección de los individuos. Sin embargo, con genotipos altamente apomícticos aquella disponibilidad de variabilidad se ve limitada y el procedimiento es complejo.

Para llevar adelante un programa de mejoramiento de una especie apomíctica es necesario no solo contar con disponibilidad de germoplasma diverso para la característica deseada, sino también identificar

introducciones sexuales o altamente sexuales (apomícticas facultativas con alta expresión de sexualidad) que permitan recombinar y transferir tal variabilidad hacia los genotipos no sexuales. En este sentido, Burton y colaboradores (1973), evaluando 158 accesiones de *P. maximum* del USDA, registraron variabilidad morfofisiológica y encontraron 2 genotipos sexuales, indicando la factibilidad del mejoramiento clásico. Sin embargo, sugirieron que ante la falta de variabilidad para algún carácter se podría recurrir a otras técnicas como la mutagénesis.

El Banco de Germoplasma de *P. maximum* de la *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (Embrapa-Brasil) es el más completo del mundo. En este se encuentra representada toda variabilidad de esta especie presente en su zona de origen, la cual fue evaluada por medio de caracteres fenotípicos (morfofisiológicos) y mediante marcadores moleculares (De Sousa *et al.*, 2009). A su vez, el mismo grupo lleva a cabo un programa de mejoramiento de *P. maximum*, realizando cruzamientos entre genotipos tetraploides apomícticos y autotetraploides sexuales, estos últimos obtenidos a partir de genotipos diploides estrictamente sexuales duplicados con colchicina (Savidan, 1980; Savidan *et al.*, 1989). No obstante, el programa está focalizado en el mejoramiento de los *P. maximum* tipo alto de mayores requerimientos.

En nuestro país, el mejoramiento genético de *P. maximum* es incipiente. En el marco del Programa de Mejoramiento Genético de Pasturas Megatérmicas del Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS) - INTA Leales, recientemente la Ing. Zootec. Florencia Ortega colectó en diferentes regiones del NOA (350-880 mm pp. anuales) seis poblaciones de *P. maximum* y evaluó sus características estructurales

(ancho de hoja, altura de planta, hábito de crecimiento, número de macollos vegetativos y porcentaje de materia seca) y morfogenéticas (tasa de elongación foliar) encontrando una amplia variabilidad para estos caracteres.

Sin embargo, aún no se registró variabilidad específicamente para la tolerancia al estrés hídrico-salino, ni en la semilla comercializada como "Gatton Panic", ni en aquellos ecotipos adaptados, que son sus derivados.

Tal falta o desconocimiento de la variabilidad en el material genético de la Argentina, sumado al restrictivo sistema legal brasilero que dificulta el pedido e intercambio de material (especialmente de los genotipos sexuales) con su Banco de germoplasma imposibilita el, ya de por sí, complejo sistema de mejoramiento clásico de esta especie, impulsando el desarrollo de técnicas alternativas de mejoramiento no convencional.

Es así que, resulta necesario explorar otras formas para generar variabilidad, ya sea por mutagénesis o a través de la técnica de cultivo *in vitro*, mediante variación somaclonal, transgénesis, entre otras, que permitan el mejoramiento en forma rápida y directa.

1.3. Hipótesis y objetivos

1.3.1. Hipótesis

La aplicación de herramientas no convencionales para la creación y detección de variabilidad genética permitirá ampliar la base genética de *Panicum maximum* Jacq. y generar nueva información, que facilitará y acelerará el proceso de mejoramiento y producción de la especie en la región del NOA.

1.3.2. Objetivo general

Propender al desarrollo y la aplicación de técnicas biotecnológicas para aumentar la variabilidad genética en forrajeras megatérmicas, hacer más eficientes los programas de mejoramiento y colaborar en el desarrollo de un mercado de cultivares de origen nacional que fortalecerá la sustentabilidad de la expansión ganadera en la región extra-pampeana.

1.3.3. Objetivos específicos

El objetivo general de esta tesis será abordado por medio de los siguientes objetivos específicos enunciados, los cuales se desarrollarán en capítulos independientes.

- Evaluar la calidad de la semilla de *P. maximum* mediante estudios fisiológicos y citogenéticos.
- Desarrollar y ajustar un protocolo de cultivo *in vitro* en *P. maximum* cv. Gatton.
- Desarrollar y ajustar un protocolo de mutagénesis inducida en semillas de *P. maximum* cv. Gatton.
- Definir un sistema de selección de tolerancia a estrés hídrico-salino.
- Ajustar herramientas de detección de variabilidad genética (microsatélites) en *P. maximum* cv. Gatton.

CAPÍTULO II:
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE SEMILLAS
DE *P. MAXIMUM* CV. GATTON

II. Evaluación de la calidad de semillas de *P. maximum* cv. Gatton

2.1. Introducción

Para muchos agricultores, una semilla de calidad es, simplemente, aquella que germina y está libre de especies invasoras indeseadas. Sin embargo, la calidad de la semilla es mucho más que eso, es un concepto múltiple que comprende diversos componentes que pueden ser agrupados en tres categorías:

- Descripción: pureza físico-botánica, pureza genética, peso de semillas.
- Higiene o sanidad de semillas: contaminación con patógenos, insectos y ácaros.
- Potencial de desempeño o calidad fisiológica: viabilidad, germinación, vigor, emergencia y uniformidad en campo.

Esta última categoría es la que presenta una mayor importancia.

2.1.1. Descripción

2.1.1.1. Pureza varietal

El "Gatton Panic" ($2n=4x=32$) fue introducido en la Argentina a fines de la década del 70 y, en la actualidad, presenta una amplia distribución y amplia variabilidad fenotípica (Ortega Masagué *et al.*, 2011).

La falta de conocimiento con respecto al comportamiento reproductivo del cultivar en el país y al funcionamiento de los sistemas de producción de semillas, hace necesario corroborar tentativamente la fidelidad de la semilla comercializada, para ser utilizada en los ensayos.

Para declarar la autenticidad de género y especie de una muestra de semillas se puede realizar la evaluación de los caracteres morfológicos de

las semillas (Figura 2.1) comparándola con una muestra de referencia y/o recurrir a herramientas de la citogenética o marcadores moleculares.



Figura 2.1. Cariopse de *Panicum maximum* Jacq. (Tomado de http://plants.usda.gov/gallery/pubs/urma3_001_php.jpg)

2.1.1.2. Pureza físico-botánica

Mediante el estudio de los caracteres morfológicos se determina la composición en peso de la muestra de semillas separando las fracciones de semillas puras y semillas extrañas, principalmente. También se puede considerar la fracción de material inerte. Dentro del primer grupo se incluyen semillas, órganos florales y, en el caso de gramíneas, frutos de la especie identificada. Dentro del segundo grupo se incluyen a las semillas de otras especies cultivadas y malezas. Luego los valores se expresan en porcentaje de la muestra.

2.1.1.3. Pureza genética: recuento cromosómico

Una de las herramientas útiles para la identificación varietal es la citogenética.

Por medio de las técnicas convencionales de tinción y el bandeo cromosómico se puede caracterizar cromosómicamente a una especie. Esto es, identificar todos sus cromosomas y describirlos fenotípicamente

(cariotipo) en cuanto al número, tamaño, forma, posición del centrómero, contenido y distribución de la heterocromatina, entre otros. De este modo, mediante comparación de cariotipos pueden realizarse estudios filogenéticos (Poggio *et al.*, 2009).

Del mismo modo, mediante el análisis del comportamiento meiótico de los cromosomas también es posible determinar el nivel de ploidía en poliploides e híbridos.

Por otro lado, las técnicas mencionadas han sido muy utilizadas para detectar daño cromosómico (deleciones, rearrreglos y translocaciones) y esterilidad de las gametas en plantas obtenidas mediante tratamientos mutagénicos (Prina, 1994), o para corroborar la fidelidad y uniformidad genética de las plantas obtenidas mediante la regeneración *in vitro*.

Para determinar el número somático ($2n$)¹ de un individuo mediante el recuento cromosómico es necesario realizar la tinción de las células meristemáticas en el estadio de metafase mitótica². En primer lugar, se utiliza el tejido meristemático o meristemas (ápices radicales y caulinares, yemas axilares) ya que están conformados por células que permanecen en

¹ El número básico (x) es el número menor de cromosomas necesario para que un organismo sea viable y representa el mínimo de cromosomas de una serie poliploide; el número gamético (n) es el número de cromosomas que llevan las gametas y puede coincidir o no con el número básico, de acuerdo con el nivel de ploidía, y el número somático ($2n$) es el número de cromosomas que llevan las células somáticas (Seijo *et al.*, 2010).

² En *Metafase* los pares de cromátidas alcanzan el punto máximo de condensación, desaparece la envoltura nuclear, quedan en contacto con el citoplasma y se alinean en un solo plano alrededor del centro de la célula, por lo que sus límites son visibles y se observan perfectamente definidos bajo el microscopio óptico (Orrillo & Bonierbale, 2009).

activa división mitótica durante todo el ciclo de vida del organismo y, por lo tanto, exhiben un alto índice mitótico.

En primer lugar, se utiliza el tejido meristemático o meristemas (ápices radicales y caulinares, yemas axilares) ya que están conformados por células que permanecen en activa división mitótica durante todo el ciclo de vida del organismo y, por lo tanto, exhiben un alto índice mitótico.

Estos órganos son pre-tratados con diversas sustancias que inhiben la formación del huso mitótico (colchicina, 8-hidroxiquinoleína, paclosol, tratamientos con frío, etc.) a los efectos de acumular metafases, dispersar los cromosomas en el citoplasma y producir una mayor condensación de los mismos. Los materiales se fijan y luego se tiñen con colorantes nucleares (fucsina básica, orceína acética, carmín, giemsa, etc.). Finalmente, se confeccionan los preparados por macerado y aplastado ("squash") del material sobre un portaobjetos. Así, mediante la observación microscópica es posible determinar el número cromosómico somático ($2n$) (Seijo *et al.*, 2010).

De acuerdo con los antecedentes citogenéticos, en *P. maximum* se han registrado distintos números somáticos correspondientes con diferentes niveles de ploidía, así existen cultivares $2n=2x$, $4x$ y $6x$ con 16, 32 y 48 cromosomas, respectivamente (Nakajima *et al.*, 1979; Nakagawa & Hanna, 1992). En trabajos previos, Combes (1975), ya había registrado ecotipos con $2n=16$, 24, 32, 40, 48, 64 y 72 correspondientes con un número básico de $x=8$. En cambio, otros autores observaron genotipos con $2n=18$ y 36 sugiriendo un $x=9$ (Jauhar & Joshi, 1969; Gould & Soderstrom, 1974).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la técnica ha sido muy utilizada en el cultivo *in vitro* de *P. maximum* para comprobar la

fidelidad y uniformidad genética de las plantas regenerantes con respecto al genotipo dador de explantes (Bajaj *et al.*, 1981; Hanna *et al.*, 1984).

2.1.2. Sanidad de semillas

Uno de los factores determinantes de la calidad de la semilla comercializada es el estado fitosanitario. Este factor no sólo afecta la viabilidad de la semilla al momento de la siembra y la germinación sino también durante su almacenaje. La presencia de hongos fitopatógenos es uno de los principales causantes de la baja viabilidad de la muestra y, generalmente, está determinado por las condiciones ambientales y sanitarias de la pastura al momento de la cosecha.

Cuando la semilla se utiliza para la implantación de pasturas con fines productivos se debe mantener una baja tolerancia a la presencia de estos patógenos ya que disminuiría mucho la eficiencia de implantación y se introduciría enfermedades en el campo. La aplicación de agroquímicos preventivos sobre las semillas (curasemillas) contra el ataque de hongos e insectos del suelo es una práctica agronómica cada vez más extendida para la protección de las plántulas al momento de la implantación.

Cuando las semillas son utilizadas para ensayos con fines científicos también existen técnicas de desinfección que posibilitan eliminar, reducir o controlar dicho problema (Ver 3.2.1.1).

2.1.3. Calidad fisiológica

La *viabilidad* de las semillas, entendida como la capacidad potencial de germinación, se determina mediante el test de tetrazolio. Por medio de esta prueba de tinción bioquímica es posible distinguir los tejidos

metabólicamente activos del embrión de los que no lo son, según su correcta actividad enzimática.

Las semillas, al ser hidratadas, incrementan la actividad de las enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración), resultando en la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), incoloro, a formazán (1,3,5-trifenilformazán), de color rojo.

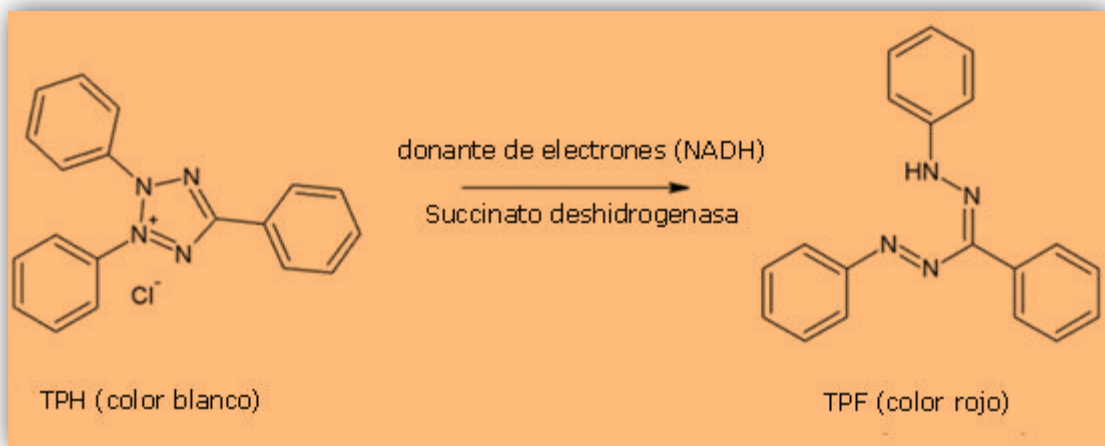


Figura 2.2. Reacción de reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio a 1,3,5-trifenilformazán.

El formazán tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. De esta manera, la viabilidad se puede expresar como el porcentaje de semillas vivas observadas en la muestra de semillas analizada.

De igual forma, el *poder germinativo* es una medida que se calcula sembrando sobre un sustrato determinado una muestra de semillas en condiciones ambientales controladas y contabilizando el número de semillas que presentan germinación normal. Este índice se expresa en porcentaje.

En general, las semillas alcanzan su máximo potencial (máximo peso seco, germinación y vigor) cuando ocurre la madurez fisiológica (siempre y cuando no posean dormición). Luego, el vigor y la germinación de las semillas decaen en el tiempo en forma progresiva e irreversible como resultado de alteraciones físicas, bioquímicas y fisiológicas durante el almacenamiento.

Tales alteraciones están determinadas por factores genéticos, factores ambientales (clima, nutrición, insectos), procedimientos de cosecha, secado, acondicionamiento, transporte y almacenamiento de las semillas.

Las semillas de determinadas especies que son potencialmente viables pero no germinan al colocarlas en condiciones favorables para hacerlo se encuentran en estado de dormición. Se denomina *dormición* o *dormancia* al estado de crecimiento suspendido o metabolismo reducido de la semilla. La dormición está genéticamente determinada y, a su vez, el grado de dormición puede estar influenciado por el ambiente durante el desarrollo del cultivo.

Según Nikolaeva (1977) existen dos tipos generales de dormición que impiden o retrasan la germinación: la dormición endógena, determinada por algunas características propias del embrión; y la exógena, ocasionada por las características de las estructuras acompañantes (endosperma, cubiertas seminales, pared de los frutos).

Dentro de los primeros se mencionan factores fisiológicos, morfológicos y morfofisiológicos inherentes a la inmadurez del embrión. En el segundo tipo se agrupan factores físicos, químicos y mecánicos relativos a la permeabilidad, presencia de inhibidores y resistencia de las estructuras.

La gran mayoría de las especies del género *Panicum* manifiestan latencia absoluta de las semillas al momento de su cosecha. La duración de este estado varía, desde pocos meses hasta más de 1 año, de acuerdo a la/s causa/s de la latencia propias de la especie y el genotipo. Dentro de las principales causas se mencionan barreras fisicoquímicas del tegumento que recubre la semilla (dureza, impermeabilidad), al igual que barreras a nivel bioquímico y fisiológico en la activación de enzimas del embrión (Baskin & Baskin, 2001).

La dormición de las semillas es calculada simplemente como la diferencia entre la viabilidad de la muestra y su poder germinativo, expresado en porcentaje.

Existen algunos métodos para quebrar la dormición, especialmente para el tercer tipo de dormición, como la escarificación química o física de las semillas previo a la siembra, la aplicación de hormonas (GA_3) o KNO_3 en el agua de riego, o el manejo de las condiciones ambientales durante la germinación (alternancia de luz y temperatura), entre otros.

La escarificación química con ácido sulfúrico disuelve por completo la lemma y la palea que recubren el cariopse y debilita la estructura del tegumento mejorando el intercambio de agua y oxígeno necesario para el proceso de la germinación.

Para realizar una implantación eficiente de toda pastura es deseable contar con semillas de calidad, que presenten una germinación rápida y sincronizada, y así evitar la competencia de las malezas por los recursos y la herbivoría de postsiembra. La mayoría de las especies gramíneas megatérmicas no cumplen con estos requisitos presentando una baja germinación y periodos variables de emergencia.

Los trabajos realizados para quebrar la dormición en *P. maximum* citados en la bibliografía son contradictorios. Según Smith (1971) y Usberti (1981), el tratamiento con ácido sulfúrico durante 5 minutos aumentó los porcentajes finales de germinación de las semillas. Por el contrario, Toledo y colaboradores (1995), utilizando la misma técnica no lograron romper la dormición de 5 cultivares de *P. maximum* (Colonião, Tobiataã, Centenário, Centauro y Tanzânia). Otro fue el caso de Usberti y colaboradores (2000), quienes evaluaron la germinación de semillas de 15 híbridos de *P. maximum* tratadas con ácido sulfúrico y observaron diferentes niveles de dormición asociados a la duración del ciclo de floración de los híbridos y diferente respuesta al tratamiento. Del mismo modo, Smith (1979) comparó tratamientos químicos con H₂SO₄, KNO₃, ácido giberélico y agua en combinaciones factoriales y observó que los 9 genotipos utilizados respondieron de una manera diferente impidiendo hacer recomendaciones generales.

De este modo, la mayoría de los autores concluyen que esta respuesta diferencial ante el quiebre de la dormición es dependiente del genotipo, lo que fundamenta la necesidad de ajustar una metodología que mejore los porcentajes de germinación de la semilla a utilizar en esta tesis.

2.2. Materiales y métodos

Para los ensayos se contó con una muestra de semillas del cultivar Gatton de *Panicum maximum* Jacq., conocido comercialmente como "Gatton Panic", cosechada en el 2009, peleteada y comercializada por el semillero Pemán y Asociados S.A.

2.2.1. Sanidad de semillas

Previo a la determinación de la calidad fisiológica de las semillas se ajustó una técnica para quitar el incrustado o peleteado comercial que pudiera interferir en los ensayos posteriores.

Limpieza "Despeleteado": 5 g de semillas comerciales peleteadas fueron sumergidas en una solución de 20 ml de lavandina comercial al 50% (hipoclorito de sodio con 2,75% de Cl⁻ activo) con el agregado del tensioactivo Tween 20 (0,5 g/ml) en un tubo Falcon de 50 ml. Luego se las sometió a agitación constante en un vórtex durante 10 minutos y se procedió al lavado de las mismas en agua corriente durante 30 minutos. A *posteriori* fueron secadas con un papel de filtro friccionándolas suavemente para despegar las cubiertas seminales del tegumento. Por último, mediante un flujo suave de aire se eliminaron las cubiertas obteniendo la semilla desnuda.

2.2.2. Pureza genética: conteo cromosómico

Para lograr una aproximación a la corroboración de la especie se realizó un conteo cromosómico a partir de raicillas de una muestra de 50 semillas del cultivar Gatton, utilizando el protocolo de Craven y colaboradores (2009) con modificaciones desarrollado para festuca.

Se colectaron raicillas de aproximadamente 5 mm de largo a partir de plántulas de 5-7 días germinadas en placas de Petri sobre papel de filtro y agua destilada en condiciones controladas a 24 ± 2 °C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz ($70-100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$). Luego de la colecta las plántulas fueron trasplantadas y conservadas hasta estado adulto.

Pre-tratamiento: Las raicillas colectadas se mantuvieron sumergidas en agua destilada a temperatura ambiente por 1 hora. Luego se sumergieron en una solución de colchicina al 0,2% en metanol:H₂O_d (1:1) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Fijación: Posteriormente, las raicillas fueron fijadas sumergiéndolas en una solución de etanol:ácido acético glacial (3:1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El fijador se preparó al momento de ser usado. Este paso es optativo y puede ser obviado.

Hidrólisis: Luego, se colocaron en HCl 1N precalentado en un baño térmico a 60 °C durante 8 minutos. Pasado ese tiempo las raicillas fueron lavadas con agua destilada para retirar los excedentes del HCl.

Tinción y aplastado (o "squash"): Para realizar la tinción se diseccionaron los ápices que se colocaron sobre un portaobjeto junto con una gota del colorante orceina acética (ANEXO) y se cubrieron con un cubreobjeto. Se machacaron suavemente, con una varilla de vidrio, hasta lograr la disociación del tejido. Por último se presionó fuerte con el dedo pulgar, tratando de evitar cualquier movimiento lateral del cubreobjeto.

Observación: Se observaron los preparados en un microscopio óptico Olympus BX40. Se contabilizaron células intactas, no superpuestas ni con artefactos que pudieran distorsionar el conteo de los cromosomas.

2.2.3. Calidad fisiológica

2.2.3.1. Test de viabilidad de semillas – Tetrazolio (TZ).

El test de viabilidad mediante tetrazolio se realizó sobre una muestra del cultivar "Gatton panic" de 100 semillas con 4 repeticiones. Las etapas del procedimiento incluyeron:

Hidratación: En primer lugar, las semillas se mantuvieron en placas de Petri con un disco de papel de filtro embebido en H₂O_d por 24 horas para provocar la imbibición y la activación enzimática del embrión. Asimismo, también se provocó el ablandamiento del tegumento y los tejidos que facilitaron el corte posterior.

Corte o pinchazo: Luego, utilizando una lupa binocular Carl Zeiss (20X), las semillas fueron cortadas con un bisturí en forma longitudinal por su cara ventral, dividiendo el endosperma y el embrión en partes iguales (Figura 2.3) manteniendo ambas mitades unidas (corte incompleto) una mitad de la semilla actúa como control de la otra.

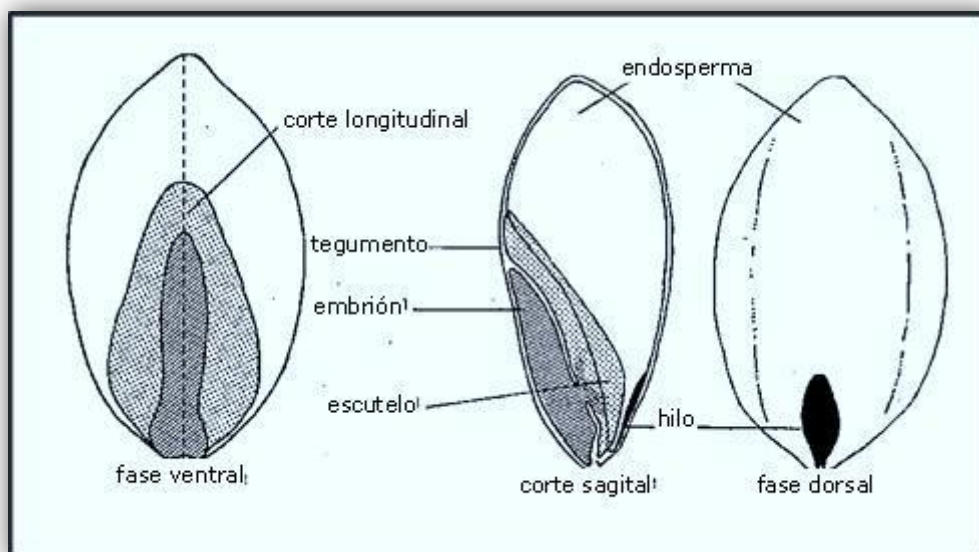


Figura 2.3. Esquema del caripso de *Panicum maximum* Jacq.
(Tomado de Rene, 1973)

Tinción: A continuación, las semillas se sumergieron en una solución de tetrazolio 0,5% (Sigma cat. #T8877) y se incubaron en oscuridad durante 2 horas a 37 °C (ISTA, 2003).

Evaluación: Posteriormente, las semillas fueron lavadas y contabilizadas bajo la lupa. Como criterio de clasificación se consideró: semillas con embriones nítidamente coloreados (viables), semillas con embriones no coloreados (inviabiles) y semillas con el endosperma y embrión coloreado (dañadas). Los datos muestrales fueron analizados por χ^2 y se expresaron en frecuencias con su desvío estándar.

2.2.3.2. Evaluación del poder germinativo (PG) bajo diferentes sustratos.

El poder germinativo de las semillas se evaluó en dos sustratos: medio semisólido estéril, agar agua (agar 0,6%) y papel de filtro embebido en H₂O_d estéril. Para cada tipo de sustrato se sembraron 100 semillas previamente desinfectada (3.2.1.1) en cuatro placas (submuestras de 25 semillas por placa) en condiciones controladas (24±2 °C; 16 h luz, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$); cada tratamiento se repitió cuatro veces siguiendo un diseño completamente aleatorizado.

Se contabilizó el número de semillas germinadas a los 7, 14, 21 y 28 días siguiendo el criterio de germinación *sensu stricto*, es decir, se consideró semilla germinada a toda aquella que evidenció la emergencia de la radícula (ISTA, 2003).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de y las medias de los tratamientos se compararon mediante el método de Tukey con un nivel de significancia de 5%. Los valores de germinación, cuando no

presentaron normalidad, fueron previamente transformados (Ecuación 2.1) según (Sokal y Rohlf, 1969):

$$\sin^{-1} \sqrt{\frac{\%}{100}}$$

Ecuación 2.1

2.2.3.3. Evaluación de la dormición de semillas

Para determinar el porcentaje de dormición (D%) de las semillas se realizó la prueba de PG (Ver 2.2.3.2) en muestras de 100 semillas con 4 repeticiones de un mismo *pool* de semillas, sembrándolas sobre papel de filtro y H₂O_d en placas de Petri (25 semillas por placa). Luego de los recuentos de las semillas germinadas al día 28 se realizó el test de tetrazolio (Ver 2.2.3.1) con las semillas restantes de cada placa. Los datos fueron calculados y expresados en porcentajes con sus desvíos estándar según la Ecuación 2.2:

$$V\% = \frac{\text{sem. germinadas} + \text{sem. restantes viables}}{\text{sem. totales}} \times 100$$

$$PG\% = \frac{\text{sem. germinadas}}{\text{sem. totales}} \times 100$$

$$D\% = V\% - PG\%$$

Ecuación 2.2

2.2.3.4. Quiebre de la dormición por escarificación química de semillas.

Siguiendo la metodología del ensayo de PG descrito en la sección 2.2.3.2 se probaron dos tratamientos para el quiebre de la dormición:

Tratamiento con KNO₃: Se tomó una muestra de 100 semillas en placas con papel de filtro estéril embebido con una solución de KNO₃ al 0,2%.

Escarificación química con H₂SO₄: Se aplicaron dos tratamientos: Solución de H₂SO₄ 96%, con una inmersión de 5 minutos y solución de H₂SO₄ 50% durante 30 minutos, frente al tratamiento control. El ensayo se realizó en un diseño completamente aleatorizados (DCA) utilizando una muestra de 100 semillas para cada tratamiento y se repitió 3 veces.

Las semillas fueron dispuestas en un tubo de 1,5 ml conteniendo 1 ml de H₂SO₄ y mantenidas en agitación constante a 150 rpm durante el tiempo correspondiente. Posteriormente, se les retiró el H₂SO₄ por medio de una pipeta, y mantuvo en remojo en abundante H₂O_d estéril por 1 hora. Luego del lavado las semillas se secaron con papel de filtro, luego se sembraron en placas de Petri con papel de filtro y H₂O_d.

Quiebre de dormancia con ácido giberélico (GA₃) y alternancia de temperaturas: Se evaluó el efecto de aplicar, en presiembra, concentraciones crecientes de ácido giberélico (GA₃) en condiciones de la alternancia de temperaturas durante la incubación, sobre el poder germinativo (PG).

Siguiendo un diseño en bloque completamente aleatorizado (DBCA), una muestra de 100 semillas, previamente desinfectadas, con 3 repeticiones por tratamiento (una por bloque) fueron embebidas durante 18 horas, en oscuridad, en una solución con las siguientes concentraciones: 0, 50, 100, 250, 500 ppm GA₃. Posteriormente, las muestras de semillas fueron lavadas, subdivididas y sembradas en 4 placas de Petri (25 semillas por placa) con papel de filtro estéril y H₂O_d. Las semillas se incubaron en

una cámara de cultivo (Sanyo) en condiciones de luz, temperatura y humedad controlada (70%), bajo un fotoperiodo de 16 h de luz a 30 °C y 8 h de oscuridad a 15°C. Cada estante de la cámara conformó un bloque.

2.3. Resultados

Para este trabajo se contó con un *pool* de semillas del cultivar comercial de *P. maximum* cv. Gatton (Ver 2.2) razón por la cual fue necesario corroborar tentativamente la fidelidad de la semilla recibida. Para ello se realizó una comparación morfológica. A partir de semillas sin pelet (Ver 2.2.1) se inspeccionaron los cariopses siguiendo las descripciones de guías y claves botánicas (ISTA, 2014); así como también se evaluaron los caracteres vegetativos (Martinat *et al.*, 2013) de las plantas adultas obtenidas, comprobando que las semillas correspondían a la especie mencionada. A su vez para determinar que la muestra no presentaba contaminaciones con semillas de otros materiales de diferente ploidía se ajustó un método para realizar el conteo cromosómico (Ver 2.2.2). Se observó que en todas las plántulas analizadas las células presentaban $2n=32$ cromosomas correspondientes con el número cromosómico reportado para la especie y el cultivar de trabajo. A modo de ejemplo, se presentan dos imágenes de microscopía obtenidas de preparados de ápices radiculares de *P. maximum* cv. Gatton (Figura 2.4).

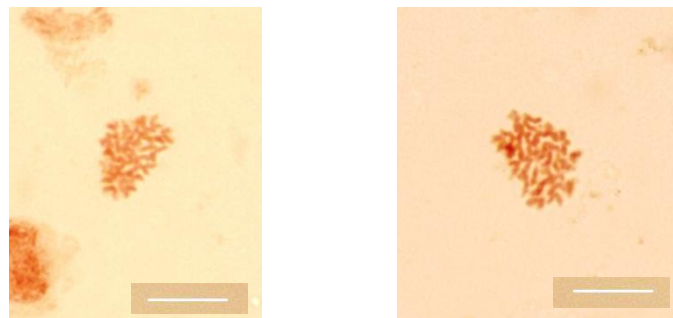


Figura 2.4 Conteo cromosómico de ápices radiculares de *P. maximum* cv. Gatton. $2n=32$. (100X)

Para evaluar la calidad de la semilla se evaluó la pureza físico-botánica de la muestra. Se determinó que el peso de 1000 semillas fue de 658 ± 33 mg como promedio de 10 muestras. También, se contabilizó el número de semillas extrañas y vacías, determinando un $1,3 \pm 0,4\%$ de impurezas y $20,8 \pm 5,4\%$ de semillas vanas. Luego, sobre las muestras puras de semillas se calculó, nuevamente, el peso de 1000 semillas (llenas) siendo de $894,3 \pm 19$ mg.

Otro criterio de evaluación fue la calidad fisiológica de la semilla. En este sentido se estudió la viabilidad de la muestra por el test de tetrazolio (Ver 2.2.3.1) siendo el porcentaje de semillas viables de $67,25 \pm 6,02\%$ (Tabla 2.1, Figura 2.5).

Tabla 2.1. Test de tetrazolio (TZ) de semillas de *P. maximum* cv. Gatton.

Muestra	Viables (%)	inviabiles (%)	dañadas (%)	Total (%)
1	67	23	10	100
2	73	20	7	100
3	59	27	14	100
4	70	16	14	100
Promedio	$67,25 \pm 6,02$	$21,5 \pm 4,65$	$11,25 \pm 3,40$	

Muestras homogéneas según χ^2 ($p=0,2586$)

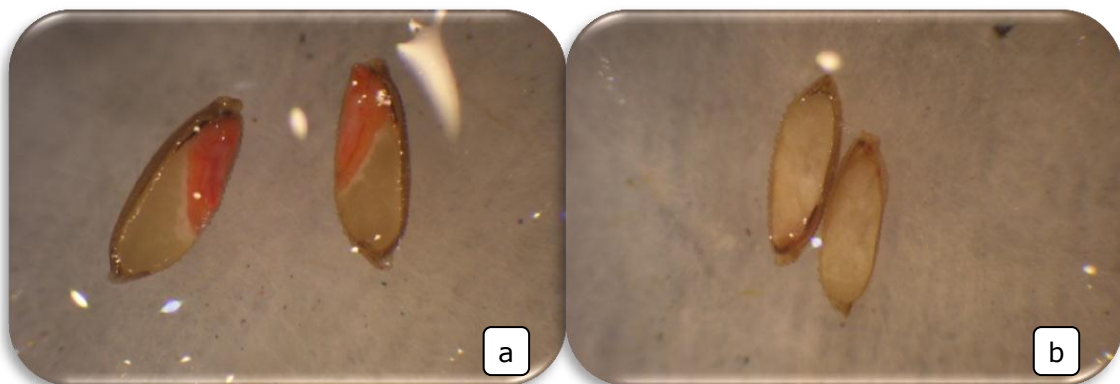


Figura 2.5. Viabilidad de semillas por test de tetrazolio (solución al 0,5%) de *P. maximum* cv. Gatton. **a.** semillas viables. **b.** semillas inviables.

Del mismo modo, se realizaron ensayos de germinación. Al comparar distintos sustratos (agar agua vs. papel de filtro) no mostraron diferencias significativas ($p=0,1034$) ni diferencias entre bloques ($p=0,9700$). Al utilizar una solución de KNO_3 (0,2%) se observó una leve mejora en el porcentaje de germinación no siendo un efecto significativo, solo produjo plántulas más verdes y robustas. En promedio se obtuvo un porcentaje de germinación de 29,67% (Figura 2.6).

Para determinar el porcentaje de dormición de las semillas se calculó el poder germinativo y la viabilidad de cuatro muestras y, a partir de la diferencia de ambos valores, se estimó que el cultivar presentó en promedio un $37\pm 7,4\%$ de dormición (Tabla 2.2).

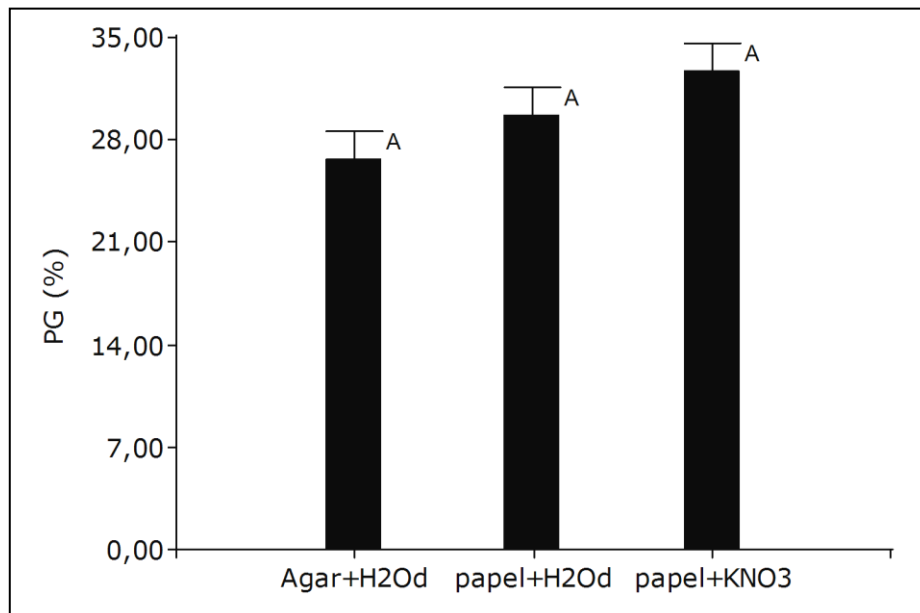


Figura 2.6. Efecto del sustrato de germinación y el KNO_3 (0,2%) sobre el poder germinativo de *P. maximum* cv. Gatton. Promedio de 4 repeticiones. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia.

Tabla 2.2. Parámetros de calidad fisiológica de semillas de *P. maximum* cv. Gatton: viabilidad (V), poder germinativo (PG) y dormición (D).

Muestra	V (%)	PG (%)	D (%)
1	65±6,83	30±5,16	35±8,25a
2	69±6,83	29±3,83	40±8,64a
3	67±8,25	30±7,66	37±3,83a
4	67±6,00	31±8,25	36±9,80a
Promedio	67±6,45	30±5,84	37±7,38

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de calidad tanto de pureza físico-botánica como fisiológica se ajustan a los parámetros de calidad comercial establecidos por la norma (Res. N° 350/2011 del INASE). Sin embargo, para los fines de este trabajo se realizaron ensayos en vías de disminuir el porcentaje de dormición obtenido y lograr de esta manera reducir el volumen de semillas a utilizar posteriormente.

Para quebrar la dormición de la semilla se utilizaron soluciones de ácido sulfúrico en distintas concentraciones, estos tratamientos no mostraron resultados satisfactorios. Más aún, el tratamiento utilizando H_2SO_4 al 96% durante 5 minutos redujo los niveles de germinación un 37,8% con respecto al control ($p < 0,05$) (Figura 2.7). Del mismo modo, el ensayo utilizando un pretratamiento con ácido giberélico (GA_3) y su combinación con la alternancia de temperaturas, tampoco produjo una mejora en la germinación ($p = 0,1441$) (Figura 2.8).

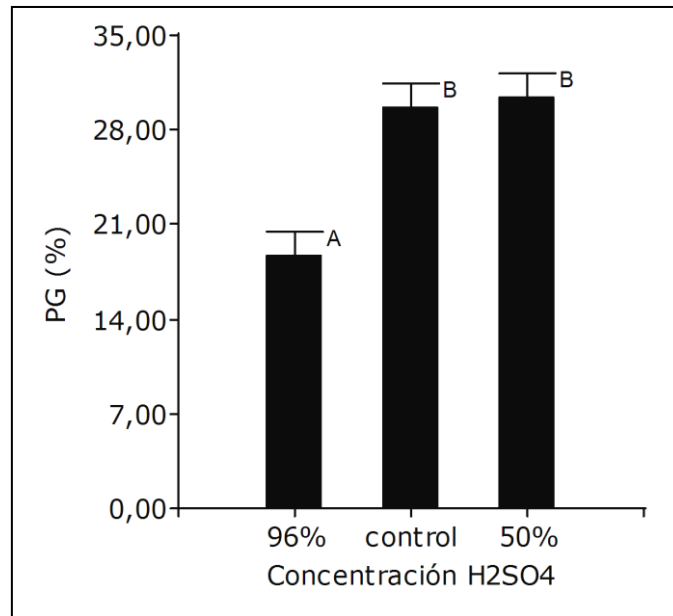


Figura 2.7. Efecto de la escarificación química con ácido sulfúrico en la germinación de *P. maximum* cv. Gatton. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia.

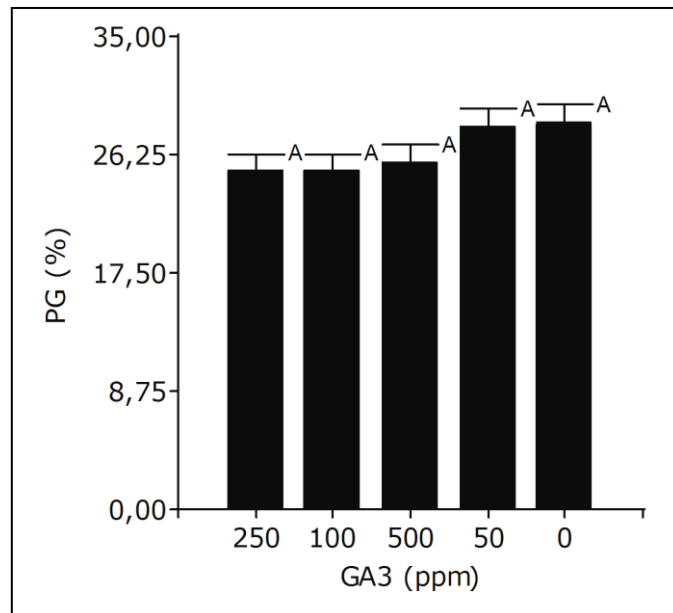


Figura 2.8. Efecto del pretratamiento con ácido giberélico (GA₃) y la alternancia de temperaturas en la germinación de *P. maximum* cv. Gatton. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia.

2.4. Discusión

Para llevar a cabo este trabajo se dispuso de una muestra comercial de semillas del cultivar Gatton de *Panicum maximum* Jacq., cosechada en el 2009, peleteada. Dado el origen de la muestra resultó necesario conocer la fidelidad de la especie y sus parámetros de calidad.

En primer lugar se realizó una caracterización morfológica de los cariopses y la planta adulta siendo coincidente con las descripciones del cultivar. Del mismo modo, para determinar la pureza genética se realizó un conteo cromosómico de 32 cromosomas, este resultado se corresponde con lo reportado para la especie por otros autores utilizando otras técnicas (Barnard, 1972a; Nakajima *et al.*, 1979; Savidan, 1980; Savidan & Pernès, 1982; Hanna *et al.*, 1984; Nakagawa & Hanna, 1992; Ebina *et al.*, 2007; Ortega *et al.*, 2011).

En cuanto a la calidad comercial de las semillas, según la Resolución Nº 350/2011 del Instituto Nacional de Semillas, perteneciente al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, se establece que los límites de tolerancia para la comercialización de la semilla de *P. maximum* Jacq. cv. Gatton son de 90% de semilla pura y 5% de semillas extrañas, con un poder germinativo de 15% ó 25% de viabilidad.

La muestra analizada presentó valores superiores a los estipulados para cada uno de los parámetros analizados (29,67% de germinación y 67,25% de viabilidad). Al igual que el peso de 1000 semillas obtenido (894,3 mg) fue cercano al reportado por Burton y colaboradores (1973) (800 mg). Por lo tanto, podemos afirmar que se contó con una muestra de aceptable calidad comercial.

Aun así, los valores de germinación obtenidos fueron bajos con respecto a los reportados por Martínez y colaboradores (1992) quienes, analizando la interacción entre el tiempo de conservación de las semillas y la temperatura de incubación, registraron que las semillas recién colectadas de *P. maximum* alcanzaban una germinación del 57% a 25 ó 35°C, mientras que las semillas almacenadas presentaban una germinación del 80 y 99% a 25 y 35°C, respectivamente. Este aumento en la germinación registrada se debió a la pérdida de la dormición en el tiempo.

Con respecto a este tema, la dormición produce una baja germinación que dificulta la realización de experimentos científicos en cuanto a la metodología a desarrollar y el análisis de los datos, debido a que, en compensación, se requiere utilizar un mayor volumen de semillas.

Según las indicaciones de las normas ISTA, la incubación con KNO_3 y la exposición de las semillas a temperaturas alternas mejora la germinación mediante el quiebre de la dormición. En este sentido, Tomaz y colaboradores (2010) trabajando con el cv. Tanzania bajo estas condiciones lograron, no sólo aumentar los porcentajes de germinación, sino también acelerar su velocidad, acortando los tiempos del test a 4 días. Gutiérrez y colaboradores (2006), también obtuvieron una mejora en la germinación de las semillas sobre papel utilizando la alternancia de temperaturas. Por el contrario, en los ensayos realizados en esta tesis bajo estas condiciones, si bien se observó la misma tendencia, los resultados no fueron estadísticamente significativos (Figura 2.6). Del mismo modo, Martínez y colaboradores (1992), tampoco encontraron diferencias en cuanto a la germinación con temperaturas alternas (20-25, 20-32, 20-40 °C), ni diferencias en la germinación en presencia de NO_3^- bajo distintas

concentraciones. Sin embargo, estos autores registraron una alta germinación inicial mayor al 96%, lo que indicaría que el quiebre de la dormición ya había sucedido previamente.

Por otro lado, los ensayos para quebrar la dormición y mejorar la germinación utilizando ácido sulfúrico no dieron buen resultado, sino por el contrario, la disminuyeron. A iguales resultados arribaron Toledo y colaboradores (1995) quienes no lograron romper la dormición de 5 cultivares de *P. maximum* (Colonião, Tobiata, Centenário, Centauro y Tanzânia) utilizando la misma técnica. Tomaz y colaboradores (2010) también concluyeron en este sentido. Por el contrario, Smith (1971) y Usberti (1981) aumentaron los porcentajes finales de germinación de semillas en *P. maximum* mediante el tratamiento con ácido sulfúrico durante 5 minutos.

A una observación particular arribaron Usberti y colaboradores (2000), quienes evaluando la germinación de semillas de 15 híbridos de *P. maximum* tratadas con ácido sulfúrico, observaron diferentes niveles de dormición asociados a la duración del ciclo de floración de los híbridos y diferente respuesta al tratamiento.

Por último, Smith (1979) comparó tratamientos químicos con H_2SO_4 , KNO_3 , ácido giberélico y agua en combinaciones factoriales y observó que los 9 genotipos analizados respondieron de una manera diferente impidiendo hacer recomendaciones generales, concluyendo que las respuestas son dependientes del genotipo.

Es difícil revelar las causas de los bajos porcentajes de germinación logrados aún sobre semillas escarificadas bajo diferentes sistemas. Entre ellas se podría hipotetizar, desde interacciones con el tratamiento previo de

desinfección hasta la posible variabilidad para el carácter, citada anteriormente. De igual modo, la probable heterogeneidad madurativa de la muestra podría explicar parte de los mismos. En este sentido, la inmadurez de las semillas al momento de la cosecha es un problema frecuente reportado en los cultivos forrajeros, donde las semillas no maduran de forma sincrónica, incluso observándose grandes diferencias en la madurez de las semillas provenientes de una misma planta (Valdez *et al.*, 2003). Cuando la abscisión o cosecha de la semilla precede a la maduración, el alto porcentaje de semilla sin madurar, afecta la germinación de la muestra.

En *Panicum sp.* la duración del período de maduración depende de las condiciones ambientales siendo muy variable. Desconocemos en qué condiciones se cultivó y obtuvo la muestra de semillas que adquirimos para esta tesis.

2.5. Conclusión

Se pudo ajustar la técnica del conteo cromosómico en puntas de raíces de *Panicum maximum* cv. Gatton en forma satisfactoria, arribando al número cromosómico propio de la especie ($2n=32$).

La herramienta podría ser utilizada para evaluar daños o cambios a nivel cromosómico en plantas mutagenizadas o en regenerantes obtenidas por cultivo *in vitro*.

Si bien la muestra de semillas pudo ser caracterizada como una muestra de buena calidad comercial, no se pudo mejorar el bajo poder germinativo por medio de los tratamientos recomendados por las normas ISTA para el quiebre de la dormición ni mediante el pretratamiento con ácido sulfúrico. Por lo tanto, en los experimentos subsiguientes se empleará mayor número de semillas para compensar tal déficit.

2.6. Bibliografía

- Ahloowalia, B. S. (1965). A root tip squash technique for screening chromosome number in *Lolium*. *Euphytica* 14, 170-172.
- Andrada, A. B., Boggiatto, A. J., Auad, L. G., y Collado, M. L. (1975). Estudios citogenéticos en el híbrido intergenérico *Euchlaena perennis* Hitch. por *Zea mays* L. I. Análisis meióticos en plantas de dos generaciones. *Rvta. Agron. N.O. Argent.*, 12(3-4), 323-330.
- Bajaj, Y. P. S., Sidhu, B. S., y Dubey, V. K. (1981). Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass – *Panicum* spp. *Euphytica* 30, 135-140.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2001). Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Kentucky, United States: Academic Press.
- Burton, G. W., Millot, J. C., & Monson, W. G. (1973). Breeding procedures for *Panicum maximum* Jacq. suggested by plant variability and mode of reproduction. *Crop Science* 13(6), 717-720.
- Craven, K. D., Clay, K., & Schardl, C. L. (2009). Cap 2. Systematics and morphology. En H. A. Fribourg, D. B. Hannaway, & C. P. West. *Tall fescue for the twenty first century*. Agronomy N°53.
- Combes, D. (1975). Polymorphisme et modes de reproduction dans la section des *Maximae* du genre *Panicum* (Graminées) en Afrique. Paris: ORSTOM.
- de Toledo, F. F., Chamma, H. M. C. P., & Novembre, A. D. L. C. (1995). Germinação de sementes de *Panicum maximum* Jacq. prétratadas com ácido sulfúrico. *Sci. Agri.*, 52(1), 20-24.

- Ebina, M., & Nakagawa, H. (2001). RAPD analysis of apomictic and sexual lines in Guineagrass. *Grassland Science* 47(3), 251-255.
- Gould, F. W., & Soderstrom, T. R. (1974). Chromosome numbers of some Ceylon grasses. *Canad. J. Bot.* 52, 1075-1090.
- Gutiérrez, C., Herrera, J., & Añizaga, R. (2006). Optimización de las condiciones de germinación de cuatro especies de pastos tropicales II *Brachiaria humidicola* y *Panicum maximum*. *Tecnología en Marcha* 19(3), 27-37.
- Hanna, W. W., Lu, C., & Vasil, I. K. (1984). Uniformity of plants regenerated from somatic embryos of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass) *Theor. Appl. Genet.* 67, 155-159
- ISTA Purity Committee. (2014) *Urochloa maxima* (Jacq.) R. D. Webster [*Panicum maximum* L.] (*Poaceae*). ISTA Universal List . Recuperado de <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/ULfactsheetPanicumm maximum-Urochloa.pdf>
- Jauhar, P. P., & Joshi, A. B. (1969). Cytotaxonomic investigation in the *Panicum maximum* complex III. Cytological features, chromosome diminution and evolution of the karyotype. *Cytologia.(Tokyo)*. 34, 222-233.
- Leme De Lima Dias, M. C., & Alves, S. J. (2008). Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes* 30(3):152-158.
- Martinat, J. E., Coraglio, J. C., Vieyra, C. & Fuentes E. (2013). Reconocimiento de pasturas megatérmicas mediante caracteres vegetativos. REDITA –FCA (UNCa) N° 40

- Martinez, M. L., Valverde, T., & Moreno-Casasola, P. (1992). Germination response to temperature, salinity, light and depth of sowing of ten tropical dune species. *Oecologia* 92:343-353.
- Nakagawa, H. & Hanna, W. W. (1992). Induced sexual tetraploids for breeding guineagrass (*Panicum maximum* Jacq). *J. Japan. Grassl. Sci.* 38(2), 152-159.
- Nakajima, K., Komatsu, T., Mochizuki, N., & Suzuki, S. (1979). Isolation of diploid and tetraploid sexual plants in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Japan. J. Breed.*, 29(3), 228-238.
- Orrillo, M., y Bonierbale, M. (2009) Biología reproductiva y citogenética de la papa – Manual Técnico. Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Ortega Masagué, M. F., Erazzu, L., Pastoriza, A., y Andrada, A. B. (2011). Estudio citogenético en *Panicum maximum* Jacq. cv. Gatton panic. *Biología en agronomía* 1(1), 37-42.
- Ortega Masagué, M. F., Erazzú, L., Andrés, A., Pérez, H., Martinez Calsina, L., Guariniello, J., Coviella, A., y Pastoriza, A. (2011) "Caracterización estructural, morfogenética y nivel de ploidía de poblaciones de *Panicum maximum* Jacq. distribuidas en la Región del Noroeste Argentino". Simposio SIMF III. Brasil.
- Prina A. (1994). Consideraciones sobre la aplicación eficiente de la mutagénesis inducida en fitomejoramiento. *Mendeliana*, 9(1), 5-49.
- Poggio, L., y Naranjo, C. (2004). Citogenética. (I-2, pp. 69-79). En V. Echenique, C. Rubinstein, y L. Mroginsky. *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires: INTA.
- Rene J. (1973) Etude de la germination chez *Panicum maximum* Jacq. par culture d'embryon. ORSTOM. 7pp

- Ruiz M. de los A. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. EEA INTA Anguil. Publicación Técnica N° 77:1-20
- Seijo, G., Lavia, G. I., Robledo, G., Fernández, A. y Solís Neffa, V. G. (2010). La citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales. (I-3). En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, y L. Mroginsky. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Buenos Aires: INTA, ARGENBIO.
- Smith, C. J. (1971). Seed dormancy in *Sabi Panicum*. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, 36, 81-97.
- Smith, R. L. (1979). Seed dormancy in *Panicum maximum* Jacq. *Tropical Agriculture*, 56, 233-239.
- Tomaz, C. de A., Martins, C. C., de Carvalho, L. R., & Nakagawa, J. (2010). Duração do teste de germinação do capim-tanzânia. *Rev. Bras. Sementes*, 32 (4), 80-87.
- Usberti, R. (1981). Nova metodologia para o teste de germinação de sementes de capim-colonião. Casa da Agricultura, São Paulo, p.12-16.
- Usberti, R., Usberti Jr., J. A., & Paterniani, R. S. (2000). Flowering cycle-related seed quality characteristics of 15 guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) hybrids. *Seed Science and Technology*, 28, 437-443.
- Valdez, H. A., Steinberg, M. R., Coraglio, J. C., Vieyra, C. A., Minuzzi, P. A. & Nienstedt, E. F. (2003) Determinación del momento óptimo de cosecha de semillas de gramíneas tropicales: *Panicum maximum*. XXVI Congreso Argentino de Producción Animal, Mendoza, 22-24/10.

2.7. ANEXO

Orceinaacética 2%

- Disolver 2 g orceina en 55 ml de ácido acético glacial.
- Llevar a ebullición y mantener 10 minutos.
- Dejar enfriar y llevar a volumen con H₂O_d (100 ml)
- Mantener 12 horas en reposo y filtrar

Solución de trabajo: Orceina acética 2%:HCl 1N (9:1)

CAPÍTULO III:
CULTIVO *IN VITRO*

III. Cultivo *in vitro*

3.1. Introducción

La técnica del cultivo de tejidos consiste, esencialmente, en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente y en asepsia, las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca & Mroginski, 1991).

En otras palabras, las células de cualquier tejido vegetal podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y el estímulo que reciban. Esta característica típica de las células vegetales fue postulada por Haberlandt, en 1902, y se la denomina *totipotencia*. De esta manera, mediante técnicas de laboratorio se puede hacer uso de tal propiedad y regenerar una planta completa idéntica a la planta madre (Roca & Mroginski, 1991).

En general, por medio de esta herramienta se pueden alcanzar distintos objetivos como realizar estudios biológicos, fisiológicos, bioquímicos o similares; producir compuestos y metabolitos secundarios; acelerar procesos productivos y de mejoramiento (rescate embrionario, haploidización mediante cultivo de anteras, diploidización con colchicina); obtener plantas libres de patógenos (cultivo de meristemas); facilitar la conservación e intercambio de germoplasma (semilla sintética y crioconservación); desarrollar la micropropagación clonal (microesquejes) con fines comerciales o incrementar la variabilidad genética (variación somaclonal o transgénesis)(Roca & Mroginski, 1991).

Este último objetivo es de fundamental importancia ya que para la obtención de una planta transgénica, ya sea por biobalística o mediante

Agrobacterium, es necesario ajustar, previamente, un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente (Roca & Mroginski, 1991).

3.1.1. Clasificación

En el cultivo *in vitro* de especies vegetales se destacan dos procesos morfogénicos: la *embriogénesis somática* y la *organogénesis*.

Mediante el primero se obtiene una estructura similar a un embrión cigótico (estructura bipolar) sin que medie la fertilización de las gametas, mientras que por el segundo pueden originarse tallos, raíces, e incluso flores.

A su vez, el desarrollo de las nuevas estructuras puede suceder en forma *directa* a partir de la diferenciación de una célula o de un grupo de células en activa división, o en forma *indirecta* cuando, previamente, se desarrolla un callo a partir del explante. Es decir, se produce la desdiferenciación del tejido sembrado y una proliferación desordenada de células que genera una masa sin ninguna función predeterminada (Roca & Mroginski, 1991).

El genotipo y las condiciones de cultivo determinarán el tipo y la vía de proceso morfogénico promovido, entre otros factores. Así, existen especies más propensas a desarrollar embriones somáticos, como las Poaceas, y especies que tienden a la organogénesis, como las dicotiledóneas leñosas (Roca & Mroginski, 1991).

En la Figura 3.1 se esquematizan las diferentes etapas de la regeneración *in vitro* por embriogénesis somática. Dependiendo del genotipo es frecuente que algunas etapas transcurran de forma simultánea sin necesidad de modificar las condiciones de cultivo.

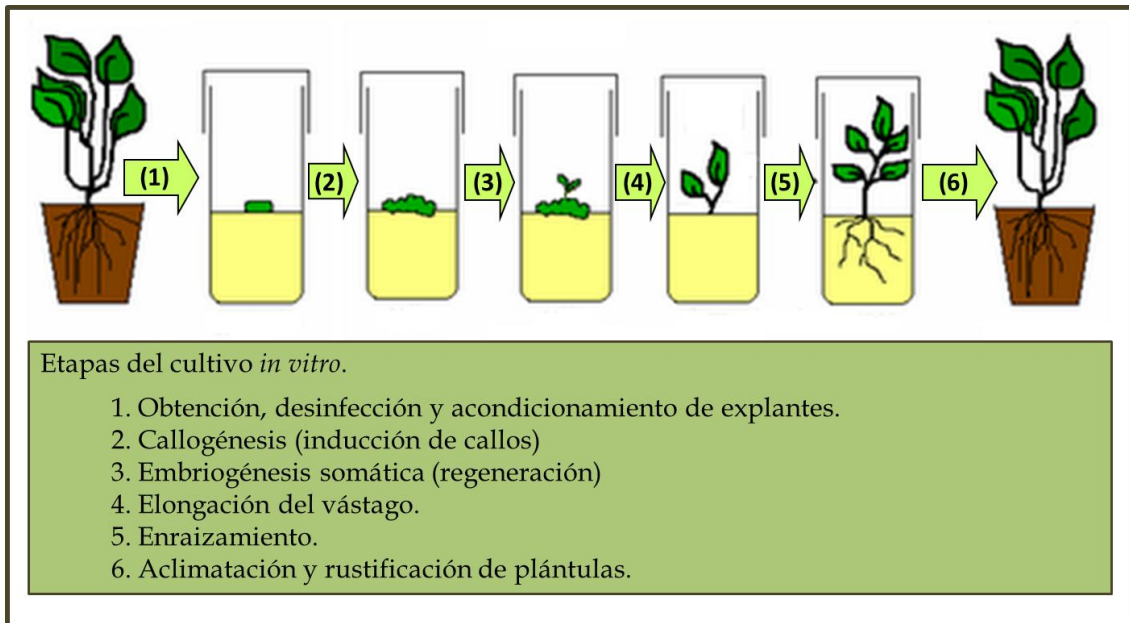


Figura 3.1. Etapas de la regeneración *in vitro* por embriogénesis indirecta. Adaptado de Muñoz de Malajovich (2012).

3.1.2. Aspectos generales

Para el establecimiento de un cultivo *in vitro*, en cualquiera de los sistemas, es necesario tener en cuenta algunos aspectos comunes relacionados con el control de la asepsia, el explante, el genotipo, y las condiciones químicas (medio de cultivo) y físicas de la incubación.

3.1.2.1. Desinfección

El primer requisito básico para el éxito de la técnica es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes. Dichos contaminantes pueden encontrarse sobre o dentro del material vegetal inicial, por lo que, para comenzar el cultivo *in vitro*, es primordial mantener a las plantas donantes de explantes en óptimas condiciones fitosanitarias. Bajo este manejo, es de esperar que sólo se necesite recurrir a una desinfección superficial del tejido previo a su utilización. Para ello, existen diversos métodos que combinan agentes oxidantes (alcohol, NaClO), tensioactivos (Tween 20™), bacteriostáticos (cefotaxima sódica), fungistáticos (benomil,

carbencilina), entre otros, variando sus concentraciones y los tiempos de exposición, finalizando con sucesivos lavados con agua bidestilada. Todo el proceso o, por lo menos, la fase final se debe realizar en condiciones asépticas trabajando dentro de un gabinete de flujo laminar y con el material de laboratorio correctamente esterilizado.

3.1.2.2. Material vegetal

Al realizar la técnica de cultivo *in vitro* se debe considerar la fuente donante de los explantes. Generalmente, cuando se trata de obtener una determinada respuesta en un explante se toma en cuenta su tamaño, posición, patrón de crecimiento, edad, microambiente y totipotencialidad celular. Estas variables en cierta forma indican su "estado o edad fisiológica" y sus posibilidades de reproducción vegetativa. Es así como, en general, explantes provenientes de tejidos con activa proliferación celular (meristemas) o provenientes de órganos jóvenes (brotes del año, ápices, hojas nuevas, yemas, plántulas, embriones) tienen mejor respuesta.

De igual modo, la respuesta al cultivo de tejidos es dependiente del genotipo. Se han encontrado diferencias entre especies de un mismo género, e incluso entre clones, cultivares o ecotipos de una misma especie (Roca & Mroginski, 1991).

3.1.2.3. Condiciones químicas: medio de cultivo

El medio de cultivo es el componente fundamental del sistema. La optimización de un medio de cultivo requiere de un trabajo meticuloso, basado en pruebas de ensayo y error. Esto se debe a que todavía se tiene escaso conocimiento acerca de los requerimientos nutricionales precisos de las células vegetales cultivadas *in vitro*. Así, se tiene evidencia de que estos

requerimientos pueden variar entre diferentes especies vegetales e incluso entre diferentes estados de desarrollo de una misma especie (Leifert *et al.*, 1995).

Un medio de cultivo puede ser definido como “una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos” (Mroginski *et al.*, 2010). Básicamente, los medios de cultivo se componen de elementos que suministran:

- *Nutrientes minerales (Composición salina del medio)*

Los medios de cultivo están compuestos por un *pool* de macro y micronutrientes que se consideran esenciales para la vida de una planta completa, similares a las formulaciones diseñadas para los cultivos hidropónicos, como Hoagland & Arnon (1950), entre otras. La composición salina (o medio basal) más empleada para el cultivo *in vitro* y la regeneración de especies vegetales, es la de Murashige & Skoog (1962) (MS). Sin embargo, existen muchas formulaciones diseñadas específicamente para inducir determinados patrones morfogénicos en diferentes especies, como el medio basal de Lloyd & McCown (1981) (WPM) utilizado en especies leñosas, o el de Gamborg y colaboradores (1968) (B5) diseñado para soja (*Glicine max*). Los diferentes medios varían, principalmente, en su contenido de sales (medios ricos vs. pobres) y en la relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Mroginski *et al.*, 2010).

- *Sustancias vitamínicas*

Si bien las plantas verdes presentan un comportamiento autótrofo para las vitaminas, la síntesis se produce en determinados órganos y luego se traslada hacia otros. Por lo tanto, dependiendo del explante inicial y el

objetivo del cultivo *in vitro*, puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas. Por ejemplo, los ápices radiculares no sintetizan tiamina, por consiguiente, cuando se realiza un cultivo de raíces se requiere el suplemento constante.

Con todo, se considera benéfico añadirle a la mayoría de los medios tiamina, piridoxina y ácido nicotínico. En cambio, otras como ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina pueden ser útiles pero no absolutamente necesarias (Mroginski *et al.*, 2010).

- *Sustancias reguladoras del crecimiento*

Las sustancias reguladoras del crecimiento o fitohormonas son pequeñas moléculas químicas que afectan al desarrollo y crecimiento de los vegetales a muy bajas concentraciones. Se conocen cinco grupos principales: las auxinas, las citocininas o citoquininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico.

En el cultivo *in vitro* las auxinas y las citoquininas son las que presentan mayor uso e importancia. Las primeras esencialmente provocan la elongación de las células. Entre ellas podemos citar al ácido indolbutírico (IBA), ácido indolacético (AIA), ácido α -naftalenacético (ANA) y al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Por otro lado, las citoquininas promueven la división y la diferenciación celular. Entre ellas podemos mencionar a la kinetina (KIN), zeatina (ZEA) y a la N⁶-bencilaminopurina (BAP).

Alterando las concentraciones relativas de auxinas y citocininas en el medio, los investigadores han podido modificar el desarrollo de las células indiferenciadas de los cultivos de tejidos. En general, cuando es mayor la concentración de auxinas el tejido indiferenciado organiza raíces. Por el contrario, con una mayor concentración de citoquininas se forman yemas

vegetativas. Finalmente, con una concentración más o menos equilibrada de las dos hormonas, las células permanecen indiferenciadas formando callos.

Las giberelinas (ácido giberélico, GA₃) son hormonas relacionadas con el tamaño celular y, por lo tanto, son utilizadas para promover el crecimiento de los vástagos y los frutos. Por el contrario, el ácido abscísico (ABA) y el etileno intervienen en la senescencia foliar y la abscisión de los frutos (Mroginski *et al.*, 2010).

- *Fuente de carbono*

Los tejidos y células incubados *in vitro* se comportan de forma autótrofa por lo que requieren de una fuente carbonada como suministro de energía. La sacarosa (2 a 5% p/v) es el azúcar más utilizado pero puede ser reemplazado por glucosa, fructosa, maltosa, entre otras.

- *Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)*

El agente gelificante más empleado en el cultivo *in vitro* es el agar (0,6 a 1% p/v) extraído de diversas algas marinas. Las diferentes calidades existentes en el mercado difieren en el grado de pureza y pueden modificar la expresión morfogénica al contener sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento. Otros gelificantes son el Phytigel™ y la agarosa (Mroginski *et al.*, 2010).

- *Otros*

Es frecuente incluir en los medios de cultivo otras fuentes nitrogenadas como extracto de levadura o caseína hidrolizada; aminoácidos como cisteína y prolina al igual que otros compuestos orgánicos complejos como el agua de coco, jugo de tomate o puré de banana.

3.1.2.4. Condiciones físicas

La composición del microambiente gaseoso está condicionada por el tipo y tamaño del envase seleccionado así como también por el sistema de cobertura del mismo. El nivel de oxígeno disponible para el explante condiciona el crecimiento y los procesos morfogénicos. Es necesario una buena aireación para obtener cualquier tipo de proceso morfogénico. Asimismo, los niveles de dióxido de carbono y etileno liberado afectan los procesos en forma inhibitoria. La cantidad de etileno producida *in vitro* varía con la especie, el tipo de explante, la concentración y tipo de citoquinina en el medio de cultivo, el tipo de agar seleccionado y la luz. La composición gaseosa puede ser regulada variando la frecuencia de los repiques.

La temperatura de incubación de los cultivos es otro factor de importancia. Si bien en las condiciones naturales de cultivo las plantas tienen diferencias térmicas durante el día y la noche, las temperaturas *in vitro* se mantienen casi estables. Por lo general, cuanto más se asemejen las condiciones *in vitro* a las óptimas de crecimiento de la especie estudiada, mayor será la respuesta esperada.

La respuesta morfogénica de un explante puede variar según se le proporcione luz o no. Para estimular la formación de callo es común que se incuben los explantes en oscuridad. Por el contrario, la luz favorece la diferenciación de órganos. De igual manera, la respuesta difiere en cuanto a la calidad, intensidad y el período de suministro de luz. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo "luz día".

3.1.3. Variación somaclonal

Al utilizar la técnica del cultivo de tejidos, con frecuencia se detectan "variantes" entre las plantas regenerantes. Esta variación originada *in vitro*,

que se manifiesta como mutaciones heredables en la progenie, es denominada "variación somaclonal" (Larkin & Scowcroft, 1981).

Se cree que el proceso de variación somaclonal requiere de múltiples eventos genéticos y/o epigenéticos que afectan a los patrones de expresión o dan lugar a la alteración de genes. Existen muchas hipótesis pero las causas que la originan y los factores que la influyen no han sido hasta el presente suficientemente explicados (Roca & Mroginski, 1991; Pessino & Ortiz, 2010).

Dentro de las posibles causas podemos mencionar al daño del ADN y la mutación, errores en la reparación del ADN dañado o mutado, la alteración en los mecanismos de control del ciclo celular y los cambios en el patrón de metilación del ADN. Otro origen de la variación somaclonal es la activación de elementos transponibles.

Durante el cultivo *in vitro*, la frecuencia de la variación es determinada por distintos factores como el método de propagación, la naturaleza del tejido utilizado como material inicial, el tipo y la concentración de los reguladores, así como el efecto del estrés y el genotipo. Del mismo modo, diversos estudios avalan que la variación somaclonal es particularmente aparente y más elevada en plantas regeneradas tras un largo período de cultivo (Ibáñez Alcocer, 2013).

La organización celular es una característica relevante y, en la mayoría de casos, la variación somaclonal se relaciona con sistemas de propagación ligados a la inestabilidad y el crecimiento celular desorganizado como, por ejemplo, la embriogénesis somática indirecta (Sivanesan, 2007).

Los tejidos altamente diferenciados como las raíces, hojas y tallos generalmente producen más variación que los explantes obtenidos a partir de

yemas axilares y brotes apicales en los cuales existen pre-meristemas (Sharma *et al.*, 2007).

Mediante la aplicación de técnicas de citogenética, el uso de marcadores moleculares y la evaluación fenotípica es posible comprobar la estabilidad/inestabilidad del sistema *in vitro* y detectar variación somaclonal en las diferentes etapas del proceso.

3.1.4. Antecedentes

Los primeros trabajos de cultivo de tejidos en cereales evaluaron la utilización de semillas maduras y embriones maduros aislados en arroz (*Oryza sativa*) (Nishi *et al.*, 1968; Nakano & Maeda, 1979), maíz (*Zea mays*) (Harms *et al.*, 1976), avena (*Avena fatua*) (Carter *et al.*, 1967; Cure & Mott, 1978), trigo (*Triticum aestivum*) (Cure & Mott, 1978) y cebada (Bayliss & Dunn, 1979; Lupotto, 1984).

A diferencia de las dicotiledóneas, la inducción de callos a partir de segmentos de hojas jóvenes, en un principio, falló en la regeneración de plantas completas o fue muy rara. Sin embargo, en estudios posteriores se pudo expresar la capacidad morfogénica en primer lugar para el sorgo (Wernicke & Brettell, 1980; Wernicke *et al.*, 1982), el pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) (Haydu & Vasil, 1981), el pasto guinea (*Panicum maximum*) (Lu & Vasil, 1981a), el pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) (Hanning & Conger, 1982), como también para el arroz (*Oryza sativa*) (Wernicke *et al.*, 1981) y el trigo (*Triticum aestivum*) (Ahuja *et al.*, 1982).

Del mismo modo, la regeneración de plantas a partir de inflorescencias inmaduras se informó para el sorgo (Brettell *et al.*, 1980), el raigrás anual (*Lolium multiflorum*) (Dale *et al.*, 1981) y el pasto elefante

(Wang & Vasil, 1982), entre otros. La idoneidad de estas fuentes de explantes fue confirmada también para el trigo (Ozias-Akins & Vasil, 1982; Maddock *et al.*, 1983; Rajyalakshmi *et al.*, 1988; Sharma *et al.*, 1995) y la cebada (Thomas & Scott, 1985).

Numerosos autores sentaron las bases del cultivo *in vitro* y la regeneración en el género *Panicum* utilizando diferentes explantes, medios y especies, en particular, pasto varilla (*Panicum virgatum*) (Bajaj *et al.*, 1981; Fladung & Hesselbach, 1986; Denchev & Conger, 1994, 1995; Alexandrova *et al.*, 1996; Burriss *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2008, 2010). Esta es la primera y única especie del género modificada genéticamente mediante *Agrobacterium*. Somleva y colaboradores (2002), de esta manera, lograron disminuir los contenidos de lignina y aumentar el rendimiento de biocombustible producido. Del mismo modo, Lu & Vasil (1981a y b, 1982), Akashi & Adachi (1991), Lajonchere y colaboradores (1993) y Chen y colaboradores (2002a y b), también estudiaron y aplicaron las técnicas del cultivo *in vitro* pero, específicamente, sobre diferentes cultivares de *Panicum maximum*.

Para finalizar, la bibliografía referida a la variación somaclonal indica que los primeros casos fueron registrados en plantas de reproducción agámica, como la caña de azúcar y la papa, pero luego el fenómeno también fue observado en dicotiledóneas como tabaco, tomate, zanahoria y col, entre otras, y en monocotiledóneas como trigo, maíz, avena, arroz, pasto miel y pasto llorón.

A pesar del uso extensivo de esta herramienta, pocas especies de gramíneas han liberado un cultivar al mercado obtenido por medio de esta técnica, como es el caso de *Cynodon dactylon* cv. Brazos R3, donde se logró

incrementar la resistencia a la oruga militar (Croughan *et al.*, 1994) o el cultivar AC Malone, el primer cultivar de cebada obtenido *in vitro* y seleccionado por resistencia a mildew (*Erysipe graminis* DC ex Merat f. sp. *hordei* EM) (Li *et al.*, 2001).

En *P. maximum*, Seguí y colaboradores (1993) analizaron las características productivas de 12 regenerantes obtenidos por organogénesis *in vitro* a partir del cultivar Likoni, los cuales demostraron variabilidad morfológica, agronómica e isoenzimática promisorias.

Desarrollar y ajustar un protocolo de cultivo *in vitro* eficiente en *P. maximum* cv. Gatton permitirá incorporar variabilidad a la especie, ya sea mediante variación somaclonal o transgénesis, o combinar técnicas como la mutagénesis y la selección *in vitro*.

3.2. Materiales y métodos

Para la obtención de explantes a utilizar se estableció un *stand* de 20 plantas madres en el invernáculo a partir de una muestra de semillas del cultivar Gatton de *Panicum maximum* Jacq., conocido comercialmente como "Gatton Panic", y de otra de *Panicum maximum* var. *trichoglume* cv. Petrie, conocido como "Green Panic".

Para tal fin, semillas de ambos cultivares fueron sembradas en macetas de barro de 16 cm de diámetro, conteniendo un sustrato de $\frac{3}{4}$ parte de tierra y $\frac{1}{4}$ parte de vermiculita. Las plantas fueron mantenidas en condiciones ambientales semicontroladas, con un fotoperiodo de 16 horas de luz, a una temperatura promedio de 25 ± 5 °C.

Para el genotipo "Gatton Panic" se utilizaron como explantes: semillas maduras, segmentos de tallo, inflorescencias inmaduras y maduras y ovarios. Para el genotipo "Green Panic" sólo se utilizaron inflorescencias inmaduras. A continuación se detallará para cada explante la metodología a seguir.

3.2.1. Semillas maduras

3.2.1.1. Desinfección

En primer lugar, para ajustar la desinfección superficial de las semillas, se evaluó el efecto de la concentración (20, 30 y 50%) del agente desinfectante, en este caso hipoclorito de sodio comercial (55 g/l de cloro activo), en la solución y el tiempo de exposición (15 y 30 min) de las semillas sobre la contaminación y la germinación de las mismas.

Para ello, muestras de 200 semillas fueron sumergidas durante 1 minuto en alcohol 70°, luego en cada solución de NaOCl con el agregado de Tween 20 al 0,1% y por último llevadas a agitación constante a 180 rpm,

durante el tiempo estipulado. A continuación, las semillas se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril y secaron con papel de filtro. Este proceso se realizó dentro de un gabinete de flujo laminar para mantener la asepsia del proceso.

A posterioridad, las muestras fueron subdivididas y sembradas en 4 placas por tratamiento (25 semillas por placas) conteniendo el medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tabla 3.1), de las cuales se calculó el porcentaje de contaminación por placa. Otras 4 placas fueron sembradas en papel de filtro estéril para evaluar el efecto del tratamiento sobre el porcentaje de germinación.

Los tratamientos fueron incubados a 24 ± 2 °C en oscuridad y evaluados a los 28 días. Los datos fueron estudiados por análisis de variancia y comparación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia. Las placas que presentaron contaminación de semillas fueron repicadas para evitar la propagación de la contaminación. El experimento fue repetido 3 veces.

3.2.1.2. Inducción y regeneración

Para realizar la inducción de callos se realizó un experimento factorial comparando el efecto de diferentes concentraciones de la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) y de la citoquinina N⁶-bencilaminopurina (BAP) presentes en el medio de cultivo. Los tratamientos evaluados fueron: 1; 2,5; 5 y 10 mg/l 2,4 D y 0; 0,05; 0,15 y 1 mg/l BAP.

Se utilizó un medio constituido por sales MS, semisólido (0,65% (p/v) agar), enriquecido con 3% (p/v) de sacarosa. El pH del medio fue ajustado a 5,8 con K(OH) 1N y luego autoclavado a 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

Para ello se sembraron 20 semillas por placa de Petri (5 placas por tratamiento) conteniendo 25 ml del medio.

Tabla 3.1. Composición del medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962).

<i>Macronutrientes</i>	(mg/l)
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1900
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1650
Cloruro de calcio, anhidro (CaCl ₂)	332,2
Sulfato de magnesio, anhidro (MgSO ₄)	180,7
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	170
<i>Micronutrientes</i>	
Ioduro de potasio (KI)	0,83
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0,025
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6,2
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,26
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,025
Sulfato ferroso (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	27,8
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ ·H ₂ O)	16,9
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8,6
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,25
<i>Vitaminas y aminoácidos</i>	
Piridoxina·HCl	0,5
Glicina	2
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina ·HCl	0,1
<i>Otros</i>	
Mio-inositol	100
ph = 5,8	

La incubación se efectuó en oscuridad a 25±2°C, realizando repiques a un medio fresco cada 15 días. A los 30 días se evaluó el porcentaje de inducción de callo y todos los callos fueron repicados a medios de regeneración donde se discriminó entre callos “embriogénicos”, “no

embriogénicos” y, eventualmente, “rizogénicos”, según sus características visuales y las detalladas en la bibliografía (Ecuación 3.1).

Posteriormente, los callos obtenidos fueron repicados a placas de Petri conteniendo el medio de regeneración descrito por Chen y colaboradores (2002) con modificaciones. El mismo consta de MS + 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA₃ + 2,5 g/l Phytigel™. Los callos fueron incubados en condiciones de día con un fotoperiodo de 16 h luz (70 μmol.m⁻²s⁻¹) a la misma temperatura.

A medida que los embriones somáticos de los callos germinaron (regeneración) estos fueron repicados a frascos de 125 ml de capacidad conteniendo 30 ml del mismo medio de cultivo para favorecer el desarrollo y elongación de los vástagos. Luego de 30 días en este medio se evaluó la frecuencia de regeneración (Ecuación 3.2).

$$\% \text{ inducción} = \frac{n^{\circ} \text{ de callos}}{n^{\circ} \text{ de explantes}} \times 100$$

Ecuación 3.1

$$\% \text{ regeneración} = \frac{n^{\circ} \text{ de callos regenerados}}{n^{\circ} \text{ de explantes}} \times 100$$

Ecuación 3.2

El ensayo se repitió tres veces.

Los datos fueron graficados y estudiados mediante el análisis de varianza y las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante el test de Tukey al 5% de significancia.

3.2.1.3. Aclimatación-Rustificación

Los vástagos que evidenciaron algún tipo de formación radical conservando su parte aérea verde fueron trasplantados a macetas de plástico de 7 cm de diámetro, con un sustrato estéril compuesto por

tierra:vermiculita 3:1 (v/v) para su aclimatación en cámara húmeda a 75% HR, 25 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 horas de luz, a $70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidad lumínica.

Cuando los plantines alcanzaron una altura cercana a los 10 cm y generaron 2 – 3 hojas nuevas fueron trasplantados a macetas de barro de 10 cm de diámetro y llevados al invernáculo para su rustificación, conservando el mismo sustrato y fotoperíodo. Se contabilizaron los individuos adultos y las pérdidas.

3.2.2. Segmentos de tallo

3.2.2.1. Desinfección

Se cosecharon macollos basales de aproximadamente 6-8 cm de longitud en estado E0 (comienzo de la elongación de entrenudos, previo a la aparición del primer nudo visible/palpable) (ANEXO), los cuales fueron desinfectados superficialmente sumergiéndolos en alcohol 70° durante 1 min y luego en lavandina comercial (NaClO , 5,5% Cl⁻activo) al 30% con Tween 20 al 0,1%, en agitación constante a 150 rpm, durante 30 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril y secaron con papel de filtro. Finalmente, se procedió a la limpieza de los extremos de los tallos dañados y decolorados por la oxidación del proceso.

3.2.2.2. Inducción y regeneración

Se estudió la capacidad de inducción y regeneración del explante utilizando el mismo diseño experimental, tratamientos y análisis estadístico que en semillas (Ver 3.2.1.2). Para ello se sembraron 10-15 segmentos de tallo por placa (5 placas por tratamiento). El ensayo se repitió tres veces.

3.2.2.3. Inducción según la posición

Por otro lado, se evaluó la capacidad de inducción del segmento según su posición longitudinal en el tallo. Para ello las fracciones fueron sembradas en disposición espiralada de acuerdo al sentido acrópeto de crecimiento, bajo el tratamiento que produjo el mejor resultado en el ensayo 3.2.2.2. Se realizaron 15 repeticiones (1 tallo por placa) y expresaron los valores en frecuencia según el segmento posicional.

3.2.2.4. Producción de vástagos *in vitro*.

De igual modo se estudió el efecto de la desinfección de tallos sobre la inducción de callos, comparando el cultivo a partir de tallos desinfectados provenientes de plantas establecidas en el invernáculo *versus* la utilización de tallos desarrollados en condiciones axénicas, provenientes de cultivos *in vitro* (micropropagación por inducción de yemas vegetativas).

Para ello se utilizó el protocolo de Pongtongkam y colaboradores (2005) modificado. Semillas desinfectadas fueron sembradas en un medio MS semisólido conteniendo 100 mg/l caseína hidrolizada, suplementado con 3% (m/v) de sacarosa y 5 mg/l Kin. Se cosecharon tallos cada 30 días y sembraron siguiendo la metodología y utilizando el tratamiento de mejor respuesta obtenido en 3.2.2.2. Los resultados se analizaron en forma conjunta.

3.2.3. Inflorescencias maduras e inmaduras. Ovarios

3.2.3.1. Desinfección

Se cosecharon macollos reproductivos en R0 y desinfectó en forma superficial la vaina de la hoja bandera con alcohol 70° durante 1 min. Luego se extrajo la panoja inmadura cortando segmentos de 2 cm de longitud

aproximadamente, los cuales fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% (0,55% de cloro activo), adicionada de Tween 20 (0,5 ml/100 ml), durante 20 min, en agitación constante a 150 rpm. Por último, se realizaron 3-5 lavados con agua bidestilada estéril y secaron los explantes con papel de filtro.

3.2.3.2. Inducción y regeneración

Se estudió la capacidad de inducción y regeneración del explante utilizando el mismo diseño experimental, tratamientos y análisis estadístico que en semillas (3.2.1.2). Para ello se sembraron 10 segmentos de 1-2 cm de panoja por placa (100-150 espiguillas aprox.) y 3 placas por tratamiento. El ensayo se repitió tres veces.

Luego, con el protocolo de mayor eficiencia obtenido se evaluaron inflorescencias inmaduras provenientes del cv. Green.

3.2.3.3. Inducción vs. posición

Por otro lado, se evaluó la capacidad de inducción de callo de las espiguillas provenientes de panojas en R1 según su ubicación en la misma (mitad superior y mitad inferior de la panoja). Para ello se sembraron 5 segmentos de cada mitad de la panoja por placa (10 panojas) utilizando el tratamiento de mejor respuesta obtenido en 3.2.3.2. A los 30 días se contabilizó el número total de callos para cada fracción y analizó la independencia de las variables (capacidad de inducción vs. posición) por chi cuadrado.

3.2.3.4. Inducción de ovarios pre y post-antesis

Por último, se analizó la inducción a partir de ovarios provenientes de panojas en pre y post-antesis (R3 y R5). Para ello las espiguillas fueron

desinfectadas directamente en una solución de hipoclorito de sodio 10% y lavadas con agua bidestilada. Luego se sembraron 10 gineceos por placa (10 placas/estado fenológico) utilizando el tratamiento de mejor respuesta obtenido en 3.2.3.2. Los resultados se analizaron siguiendo la misma metodología utilizada para semillas (Ver 3.2.1.2).

3.2.3.5. Inducción de floración *in vitro*

Para obtener inflorescencias inmaduras de forma constante durante todo el año se buscó, además, inducir la floración *in vitro* siguiendo el protocolo de Alexandrova y colaboradores (1996) desarrollado en *P. virgatum*.

3.3. Resultados

3.3.1. Semillas maduras

En un primer momento se evidenció que la desinfección de la semilla peleteada no era 100% efectiva. Probablemente, esto se debió a que durante el procedimiento las semillas perdían el peleteado comercial pero mantenían las cubiertas (glumas) quedando menor superficie de la testa expuesta a los agentes desinfectantes.

De este modo, los resultados demostraron interacción entre la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición de las semillas ($p < 0,05$). Se observó que a mayor concentración y mayor tiempo de exposición disminuyó el nivel de contaminación de las semillas, destacándose el tratamiento 6, que reduce los niveles de contaminación al 5,5% (Figura 3.2).

Sin embargo, cuando se analizó el efecto sobre la germinación se observó que los factores son independientes ($p = 0,2785$) siendo la germinación afectada en forma proporcional al aumento de la concentración y del tiempo de inmersión.

Por este motivo se probó un doble proceso: primero realizar un lavado previo de la semilla, para quitar los componentes del pelet y retirar las cubiertas por fricción (Ver Capítulo II, Calidad de Semillas), y luego repetir los tratamientos 1 y 2.

De este modo, se logró mayor eficiencia en la desinfección superficial y menor daño en la germinación de la semilla, incluso utilizando una menor concentración de hipoclorito de sodio. Se determinó que realizando una desinfección en una dilución de NaClO comercial al 20% (1,1% Cl⁻ activo) durante 15 minutos luego del procedimiento de "despeleteado" se obtiene

los mejores resultados, logrando una germinación del 25,25% y un 5,5% de contaminación. Se observó la proliferación rápida de hongos como principal agente patógeno.

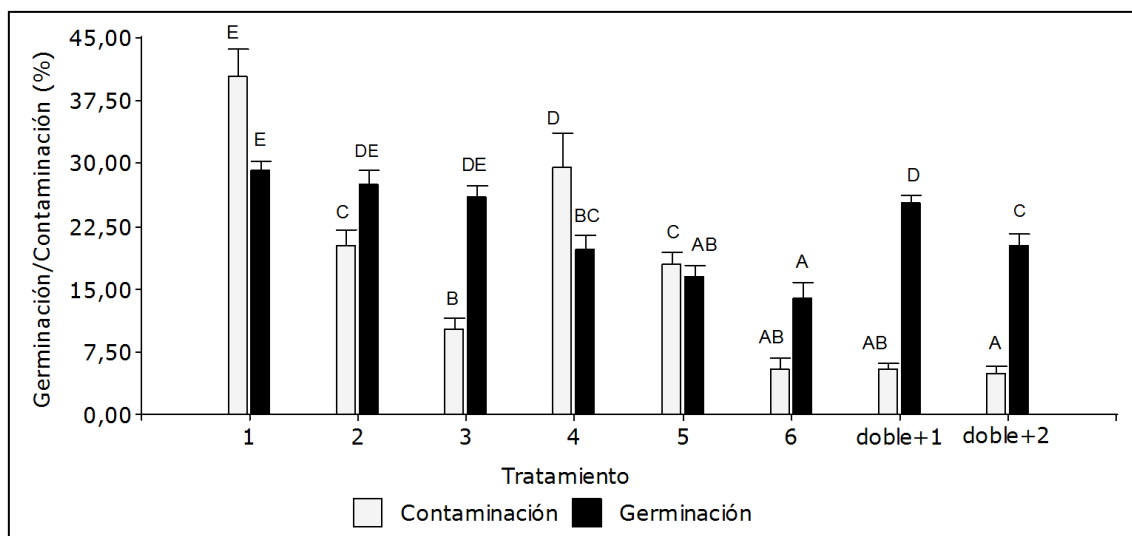


Figura 3.2 Efecto de la concentración y el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio sobre la contaminación y germinación de semillas de *P. maximum* cv. Gatton. Barras representan el error estándar de tres repeticiones. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia, para cada variable.

Tabla 3.2. Tratamientos de desinfección de semillas de *P. maximum* cv. Gatton.

Tratamiento	Alcohol 70°	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)
1	1 min	20	15
2	1 min	30	15
3	1 min	50	15
4	1 min	20	30
5	1 min	30	30
6	1 min	50	30

En el cultivo *in vitro* de semillas maduras del cultivar Gatton se observó que a los 5 a 7 días de la siembra comenzaron a aparecer pequeñas callosidades en concordancia con la imbibición de la semilla. Los callos aumentaron de tamaño en el tiempo presentando un color claro traslucido y consistencia acuosa. Se demostró que la inducción y generación de callo, expresada como porcentaje de callos por placa, respondió al

aumento en la concentración de la auxina 2,4 D ($p < 0,001$). No obstante, no se encontró diferencias utilizando medios con concentraciones mayores a los 5 mg/l de 2,4 D, por lo que se determinó que esta es la dosis óptima para la inducción de callos (Figura 3.3). Tampoco se encontró interacción con la aplicación de BAP ($p = 0,9741$).

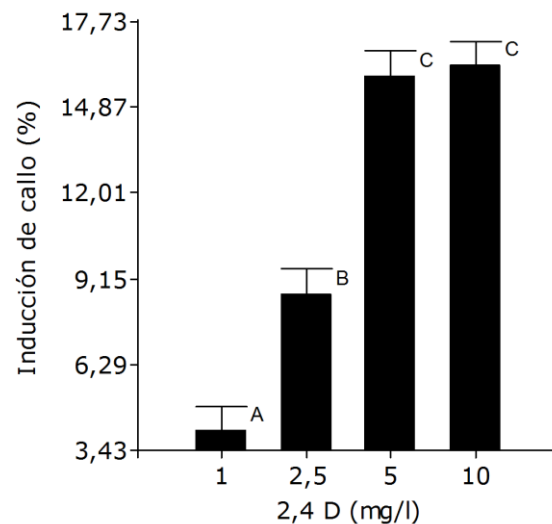


Figura 3.3. Efecto de la aplicación de 2,4 D en la inducción de callos a partir de semillas de *P. maximum* cv. Gatton. Barras representan el error estándar de tres repeticiones. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia, para cada variable.

Del total de semillas sembradas se obtuvo un 15,92% de callos. Sin embargo, dentro de los 30 días establecidos de cultivo no se observaron callos embriogénicos. Por el contrario, se evidenció en algunos casos la presencia de pelos radicales y crecimiento radical profuso (callo rizogénico) (Figura 3.7a). Se registró entre un 0,75 y 2,5% de callos rizogénicos destacándose, especialmente, en el tratamiento con la mayor dosis de 2,4 D ($p < 0,001$). Para esta variable también se detectó la relación con la citoquinina pero con un efecto contrario, ya que a mayor concentración se redujeron los casos de callos rizogénicos ($p < 0,05$) (Figura 3.4). Aún

repicando reiteradas veces el material en el tiempo, estos callos no revirtieron su condición ni se observaron callos embriogénicos.

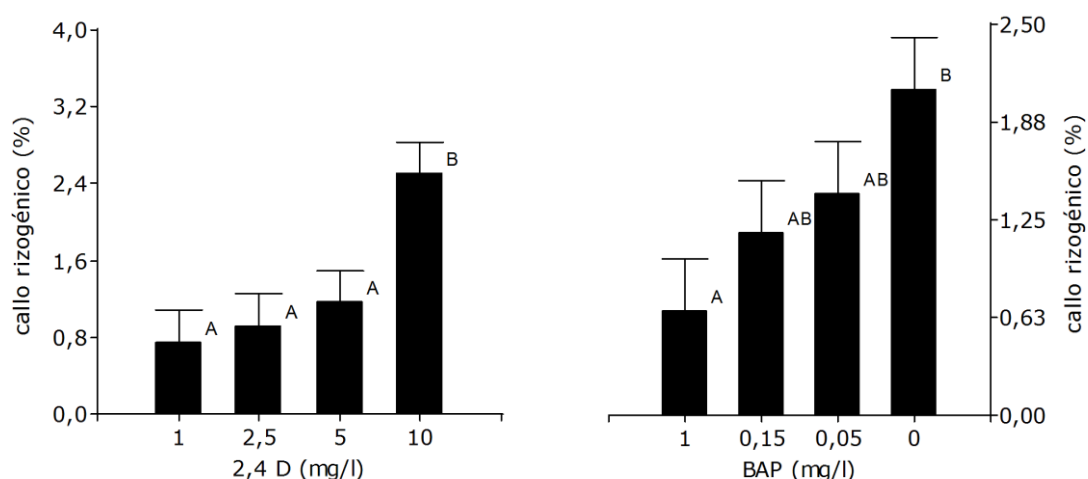


Figura 3.4. Efecto de la aplicación de 2,4 D y BAP en la inducción de callos rizogénicos a partir de semillas de *P. maximum* cv. Gatton. Barras representan el error estándar de tres repeticiones. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia, para cada variable.

3.3.2. Tallos

En el cultivo *in vitro* de segmentos de tallo, se observó en los primeros 3 días desde la siembra la elongación del tejido, principalmente de las hojas interiores del segmento, acompañado luego por el aumento de tamaño de las células del mesófilo expuesto por el corte.

En este sentido, se demostró que la inducción de callo respondió al aumento en la concentración de 2,4 D ($p < 0,001$), siendo la dosis óptima de 5 mg/l de 2,4 D (Figura 3.5). En cuanto a la aplicación de BAP no se encontró interacción ni diferencias entre las medias ($p = 0,0735$).

La dediferenciación del tejido y formación de callos fue visible a partir de la primera semana, siendo los segmentos basales los que manifestaron la mayor frecuencia de inducción (Tabla 3.3, Figura 3.6a y b).

De un 42,2% de callos obtenidos a partir de explantes provenientes de 15 tallos (1 por placa), casi un 96% estuvo representado por explantes

obtenidos en los 4 cm basales, siendo los primeros 2 cm los que registraron la mayor capacidad de inducción (91,7%).

Por el contrario, los segmentos distales a la base evidenciaron un rápido oscurecimiento de la cara expuesta por el corte y, prácticamente, no desarrollaron callos.

Tabla 3.3. Efecto de la posición del explante en el tallo sobre la capacidad de inducción de callo de *P. maximum* cv. Gatton.

Segmento (cm)	Inducción	
	% del segmento	% del total
0 - 2	91,7	72,37
2 - 4	30	23,68
4 - 6	5	3,95

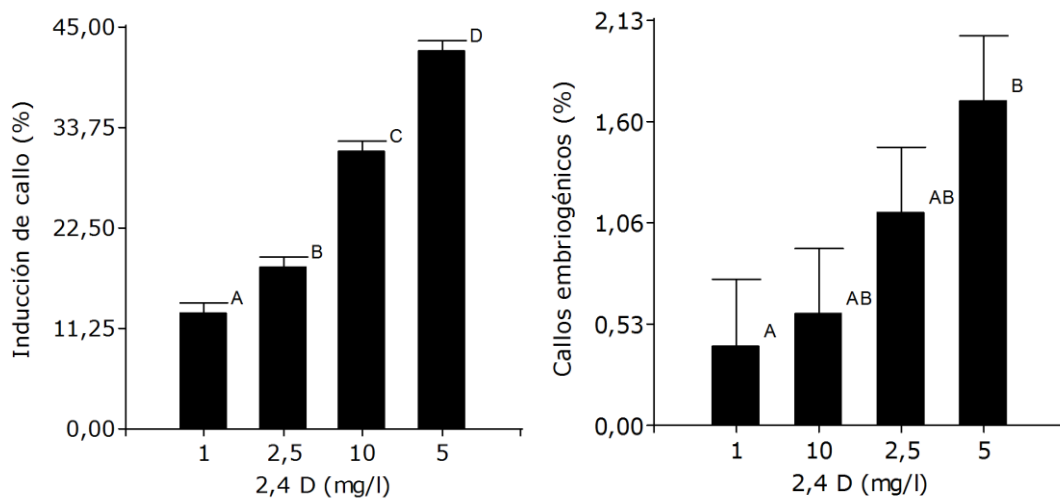


Figura 3.5. Efecto de la aplicación de 2,4 D en la inducción de callos a partir de segmentos de tallo de *P. maximum* cv. Gatton. Barras representan el error estándar de tres repeticiones. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia, para cada variable.

Los callos primarios muestran un aspecto acuoso, traslucido, brillante y blando, idénticos a los obtenidos a partir de semilla. Los mismos fueron cuidadosamente separados del tejido no inducido o necrosado y repicados hasta 5 veces al medio de inducción. No obstante, la gran mayoría no cambió su aspecto ni su capacidad embriogénica (callos no embriogénicos) sino que solo evidenciaron crecimiento en volumen.

Por el contrario, a partir de algunos explantes se observó inicialmente una región de consistencia, color y aspecto diferencial que derivó en un callo embriogénico. Los mismos desarrollaron sectores blancos, de consistencia dura y compacta, registrándose un bajo porcentaje (0-2,34%) de callos embriogénicos a los 30 días de la siembra. A pesar de ello, de un total 27 callos embriogénicos provenientes de todos los tratamientos no se obtuvieron regenerantes a los 30 días de repicados al medio de regeneración.

Por otro lado, a mayor concentración de 2,4 D los explantes comenzaron a desarrollar callos rizogénicos (Figura 3.7b). Estos callos tampoco revirtieron su condición ni se observó presencia de estructuras embrionarias en el medio de inducción. Más aún, cuando se los repicó a medios de regeneración en condiciones de luz, se produjo la pigmentación verde de las raíces. La presencia de callos rizogénicos fue observada en la siembra de semillas y tallos y, en menor medida, inflorescencias.

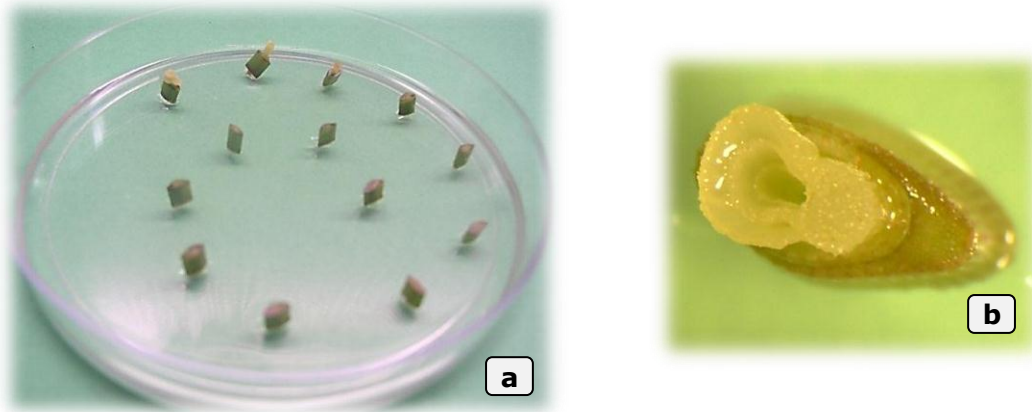


Figura 3.6. Inducción de callos a partir de segmentos de tallo de *P. maximum* cv. Gattón en función de su posición en el macollo. **a.** La capacidad de inducción disminuye en sentido acrópeto (disposición espiral hacia adentro). **b.** Las láminas internas presentan mayor capacidad de inducción.

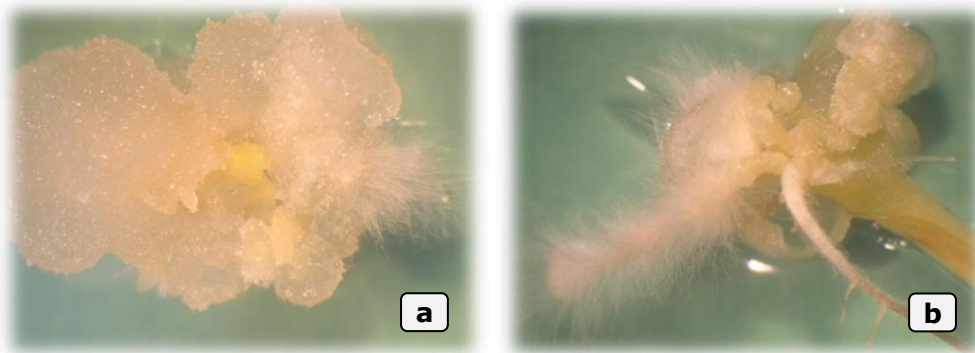


Figura 3.7. Inducción de callos rizogénicos a partir de semilla madura (**a**) y tallos (**b**).

A partir de semillas desinfectadas y germinadas *in vitro* en el medio MS + 5 mg/l Kin + 100 mg/l caseína, descrito por Pongtongkam y colaboradores (2005), se indujo la proliferación de yemas y el crecimiento de macollos (Figura 3.8), los cuales fueron cosechados mensualmente y sembrados siguiendo el mismo protocolo de regeneración que para los tallos provenientes del invernáculo, exceptuando su desinfección superficial. En promedio se contabilizaron $5,4 \pm 0,97$ macollos a los 2 meses de la germinación (n=10 plantas).

Figura 3.8. Inducción de yemas y proliferación de macollos *in vitro* de *P. maximum* cv. Gatton. MS + 5 mg/l KIN + 100 mg/l caseína (Pongtongkam *et al.*, 2005).



Los tallos juveniles obtenidos *in vitro*, sembrados a los niveles hormonales que produjeron la mayor inducción de los tallos desinfectados previamente, no demostraron un comportamiento diferente arribando al mismo resultado ($p=0,9864$).

3.3.3. Inflorescencias inmaduras y ovarios

Siguiendo la misma línea, el protocolo utilizado por Alexandrova y colaboradores (1996) para la generación de inflorescencias *in vitro* de *P. virgatum* no fue efectivo en *P. maximum*. Si bien la totalidad de los tallos cosechados al estado E4 (4º nudo palpable o visible) presentaban primordios florales en el ápice, observados bajo la lupa binocular, los mismos experimentaron una rápida necrosis de los tejidos probablemente asociada a la concentración de BAP empleada (Figura 3.9).



Figura 3.9. Inducción de floración *in vitro* de *P. maximum* cv. Gatton a partir de tallos (E4). MS + 1 mg/l BAP + 30 g/l maltosa (Alexandrova *et al.*, 1996).

Luego, se cosecharon y sembraron inflorescencias inmaduras en estado de bota (R0), a partir de las cuales se observaron callos rápidamente a los 5 a 10 días. Los callos producidos tenían un aspecto traslucido, acuoso pero firme.

Se observó diferencias en la inducción de callos según la concentración de 2,4 D ($P < 0,05$) (Figura 3.10). Así, el tratamiento con 5 mg/l 2,4 D registró el mayor porcentaje de callo (84,58%), mientras que con concentraciones superiores la inducción se vió afectada y comenzaron a observarse callos rizogénicos.

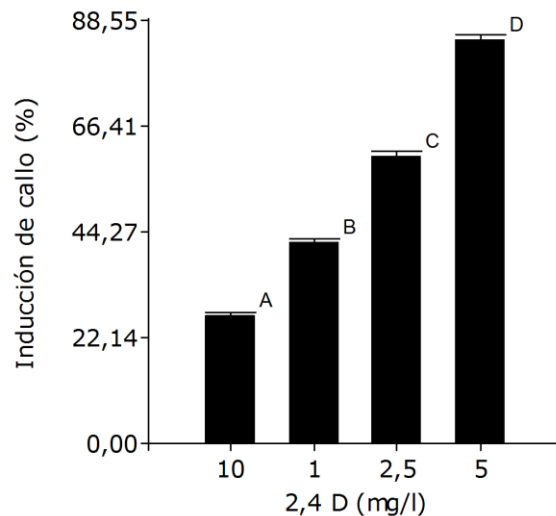


Figura 3.10. Efecto de la aplicación de 2,4 D en la inducción de callos a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de *P. maximum* cv. Gatton. Barras representan el error estándar de tres repeticiones. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey al 5% de significancia, para cada variable.

No se observó interacción con la aplicación de BAP en la inducción ($p=0,9359$) ni en la generación de callos embriogénicos ($p=0,0744$), sin embargo la incorporación de pequeñas cantidades de la citoquinina mejoró la textura de los callos y el porcentaje de callos embriogénicos del total, obteniéndose el mejor resultado con la adición de 0,15 mg/l BAP (15,13%) ($p < 0,05$) (Tabla 3.4).

Los callos embriogénicos se identificaron por conformar una masa compacta y dura, blanca o amarillenta a partir de la cual desarrollaron abundantes ondulaciones y formas cónicas desde donde emergieron los embriones. Por lo general, en las espiguillas sembradas se observaron ambos tipos de callo. Los callos embriogénicos se desarrollaron más frecuentemente en la base de las espiguillas próximo al ovario y, en ocasiones, en la base del raquis primario y secundario de la panoja (Figura 3.11a).

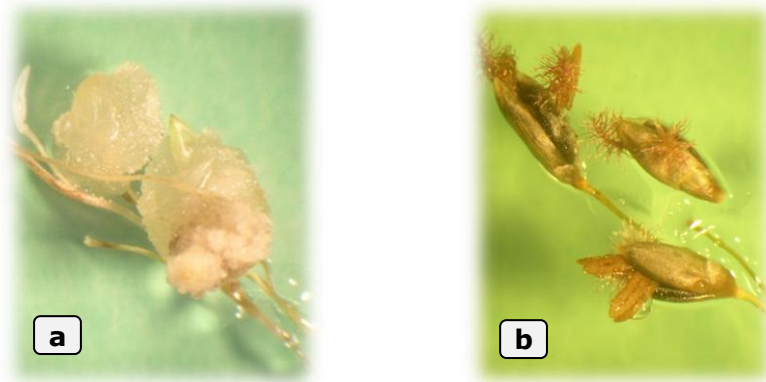


Figura 3.11. Inducción de callos a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de *P. maximum* cv. Gatton. **a.** Presencia de callos embriogénicos originados en la base de las espiguillas (R0). **b.** Espiguillas en anthesis *in vitro* (R3). MS + 5 mg/l 2,4 D + 0,15 mg/l BAP + 6,5 g/l agar.

Del mismo modo, se encontraron diferencias significativas en la regeneración de callos embriogénicos ($p < 0,05$), obteniéndose el mayor porcentaje sobre callos inducidos bajo el tratamiento de 5 mg/l 2,4 D + 0,15 mg/l BAP (Tabla 3.3, Figura 3.12).

Tabla 3.4. Efecto de la concentración de 2,4 D y BAP sobre la inducción y regeneración de callos a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de *P. maximum* cv. Gatton. $n=3$. Media \pm desv. est.

Concentración hormonal (mg/l)		Callos		Callos embriogénicos		Callos regenerados	
2,4 D	BAP	Nº	(%) ¹	Nº	(%) ¹	Nº	(%) ¹
1	0	628	41,40 \pm 6,82	37	2,46 \pm 1,57	3	0,19 \pm 0,29
1	0,05	652	43,02 \pm 6,66	45	3,03 \pm 1,65	3	0,20 \pm 0,30
1	0,15	683	45,07 \pm 6,63	53	3,54 \pm 1,61	5	0,33 \pm 0,32
1	1	578	37,97 \pm 5,73	30	1,98 \pm 1,52	3	0,20 \pm 0,30
2,5	0	887	58,36 \pm 6,35	87	5,67 \pm 1,07	10	0,63 \pm 0,42
2,5	0,05	913	60,02 \pm 6,02	98	6,33 \pm 1,17	10	0,64 \pm 0,45
2,5	0,15	950	62,45 \pm 5,86	124	8,06 \pm 1,24	16	1,04 \pm 0,34
2,5	1	897	59,01 \pm 6,26	77	4,96 \pm 1,16	7	0,45 \pm 0,37
5	0	1297	84,60 \pm 5,61	184	11,98 \pm 1,17	18	1,16 \pm 0,46
5	0,05	1304	85,03 \pm 5,82	198	12,96 \pm 1,20	19	1,23 \pm 0,39
5	0,15	1307	85,32 \pm 5,95	232	15,13 \pm 1,12	31	2,02 \pm 0,46
5	1	1274	83,38 \pm 5,53	168	10,96 \pm 1,15	11	0,70 \pm 0,45
10	0	400	26,21 \pm 5,81	68	4,44 \pm 1,07	5	0,32 \pm 0,31
10	0,05	409	26,79 \pm 5,94	71	4,60 \pm 1,18	6	0,38 \pm 0,20
10	0,15	412	27,01 \pm 5,85	84	5,46 \pm 1,18	3	0,19 \pm 0,23
10	1	397	26,01 \pm 5,92	61	4,01 \pm 1,15	6	0,40 \pm 0,20
total		12988		1617		156	

¹ Nº de callos/nº de explantes x 100

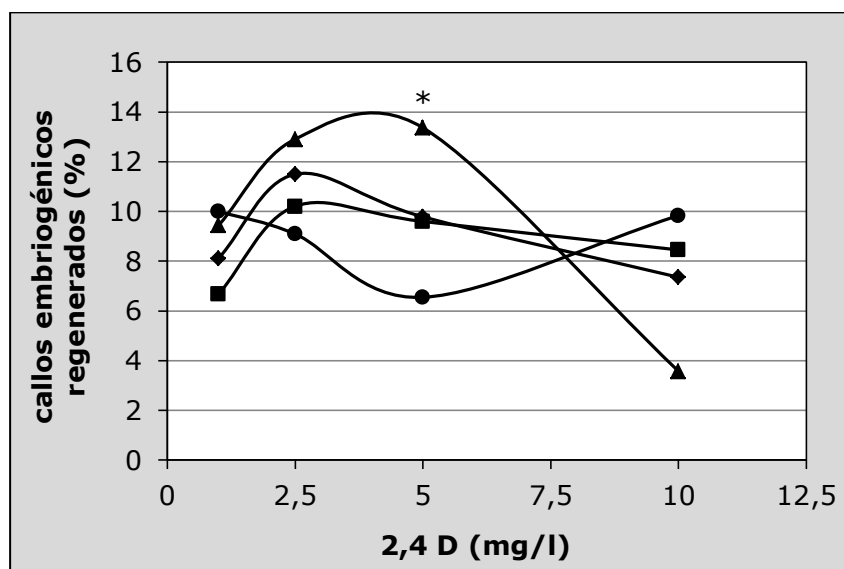


Figura 3.12. Efecto de la concentración de 2,4 D (1; 2,5; 5 y 10 mg/l) y BAP (0 -♦-; 0,05 -■-; 0,15 -▲- y 1 -●- mg/l) en la regeneración (%) de callos embriogénicos. *diferencias significativas según Tukey al 5%.

A su vez, las espiguillas cosechadas en R0 presentaron diferente grado de madurez dentro de la panoja; las que poseían un estado de madurez más avanzado (y sus anteras ya desarrolladas) produjeron la antesis *in vitro* (Figura 3.11b). Estas espiguillas no originaron ningún tipo de callo y se necrosaron por completo.

Similar resultado se observó cuando se sembraron espiguillas de inflorescencias en R1 en el mismo medio de cultivo. De 1657 espiguillas sembradas (10 panojas) las provenientes de la mitad superior de la panoja (40%) produjeron una menor proporción de callos (51%) en comparación con las originadas en la mitad inferior (80%) ($p < 0,0001$), sin embargo no existió asociación de la posición en la panoja con la proporción de callos embriogénicos y no embriogénicos ($p = 0,1034$) (Figura 3.13).

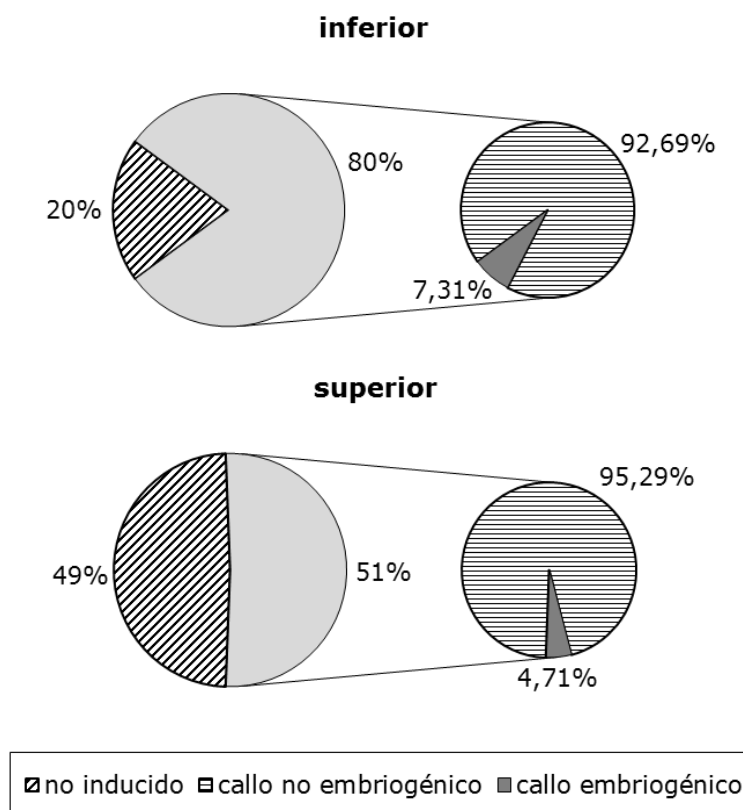


Figura 3.13. Inducción de callos a partir de espiguillas de inflorescencias inmaduras (R1) según su posición en la panoja. MS + 5 mg/l 2,4 D + 0,15 mg/l BAP + 6,5 g/l agar.

En el caso de los ovarios provenientes de panojas en R3 y R5 (de 3 a 5 días anteriores y posteriores a la antesis del 50% de la panoja) incubadas en el mismo medio los explantes rápidamente se oscurecieron y necrosaron en su totalidad.

Por otro lado, los explantes que se desdiferenciaron y produjeron callos en la etapa de inducción (Figura 3.14a) comenzaron a oxidarse en cuanto generaron callos embriogénicos. Cuando los mismos fueron repicados a medios de regeneración en presencia de kinetina y ácido giberélico y llevados a la luz directa, el oscurecimiento y la necrosis se aceleró y fue mayor.

Sin embargo, cuando estos fueron cuidadosamente separados del tejido no embriogénico adyacente y se los incubó bajo luz difusa ($15-30 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$) los embriones comenzaron a germinar entre los 5 a 15 días. A pesar de ello, el problema de la necrosis no se redujo totalmente (Figura 3.14b).

Por otro lado, los callos no embriogénicos repicados y mantenidos en oscuridad no produjeron oscurecimiento ni tampoco generaron callos embriogénicos en los sucesivos repiques.

En algunos casos, durante la germinación de los embriones somáticos, los tejidos exhibieron una coloración rojiza o verde-rojiza que indicó la presencia y producción de antocianas, presentes también en la base de los tallos de las plantas adultas. La mayoría de los embriones con estas características revirtieron la pigmentación de los tejidos al estado normal a medida que continuaron con su desarrollo (Figura 3.14c).

Luego, los embriones germinados que alcanzaron 1 a 2 cm de longitud fueron repicados a frascos conteniendo el mismo medio e

incubados bajo luz directa para favorecer el desarrollo del vástago (Figura 3.14 d).

Durante esta fase (elongación-enraizamiento), los embriones evidenciaron un abundante crecimiento radical casi en paralelo al crecimiento y elongación del vástago, por lo que no fue necesario repicar a otro medio para tal fin, ni disminuir su concentración hormonal o modificar la composición (Figura 3.14 e).

Aproximadamente a los 50-65 días de iniciado el cultivo, se obtuvieron plantas regenerantes con un buen equilibrio raíz: parte aérea, las cuales fueron trasplantadas y llevadas al invernáculo para su rustificación (Figura 3.14f). El 95% de los regenerantes llegaron al estado de planta adulta y produjeron semillas, exceptuando aquellas plántulas albinas que no fueron trasplantadas (Figura 3.15). Queda por analizar la fertilidad de las mismas y el estudio de las progenies.

En resumen, se ajustó un protocolo de regeneración de plántulas de *P. maximum* cv. Gatton por embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras. Este produjo un 85,32% de callos y un 15,13% de callos embriogénicos, de los cuales sólo un 2% logró regenerar plantas completas, siendo un 10% de las mismas plántulas albinas. Las pérdidas en la regeneración se debieron principalmente a la necrosis, mientras que las causas del albinismo no fueron estudiadas.

Utilizando inflorescencias inmaduras del cultivar Green Panic bajo el mismo protocolo de cultivo *in vitro* se obtuvieron porcentajes de regeneración levemente inferiores a los obtenidos con Gatton Panic, siendo de un 52% la inducción de callos y 6% de callos embriogénicos, de los cuales el 1,3% desarrollaron regenerantes.

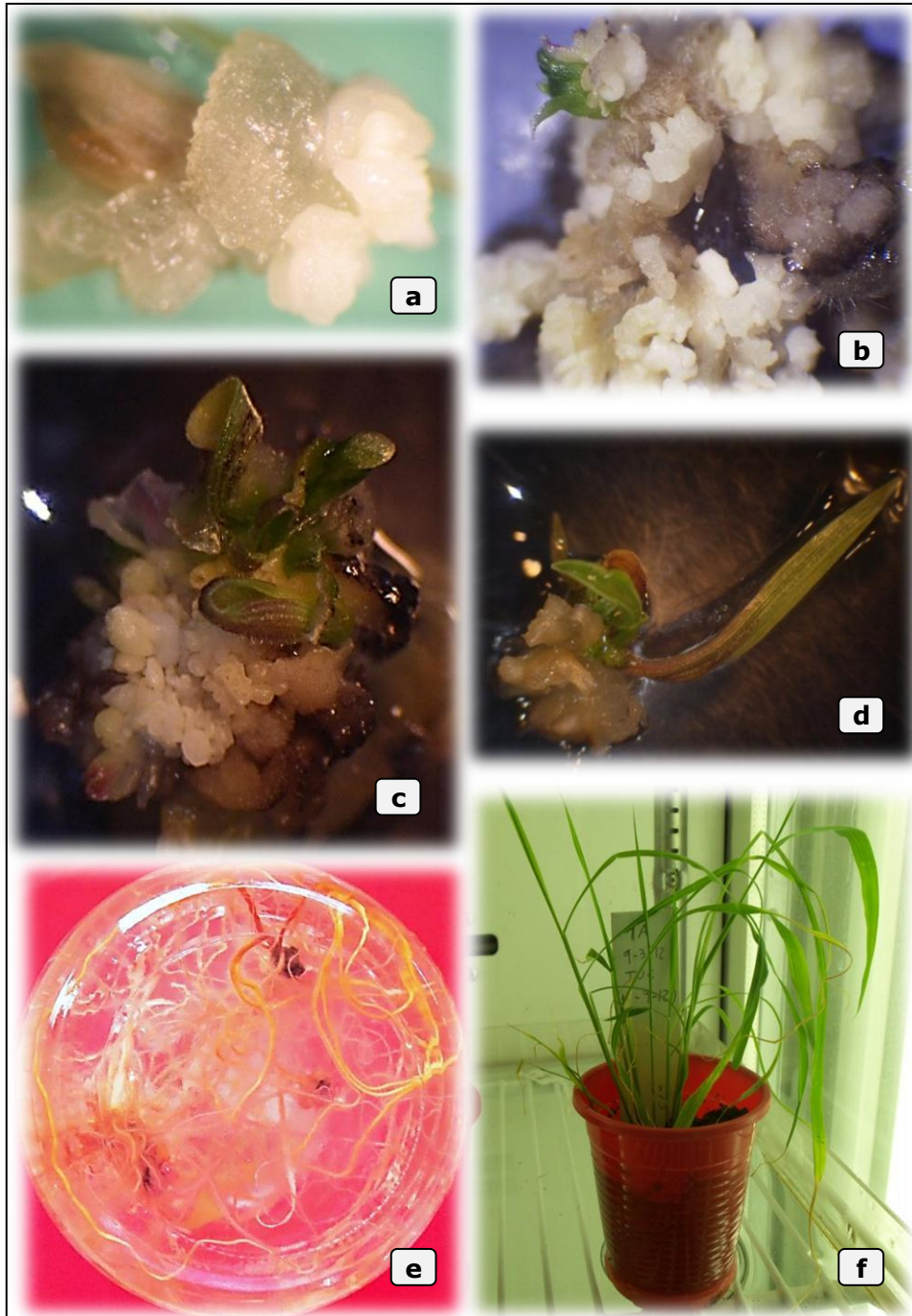


Figura 3.14. Esquema de la embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de *P. maximum* cv. Gatton. **a.** Inducción de callos en el medio MS + 5 mg/l 2,4 D + 0,15 mg/l BAP + 6,5 g/l agar en oscuridad a los 7 días de la siembra. **b.** Germinación de embriones somáticos a 7 días del repique al medio MS + 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA₃ + 2,5 g/l Phytigel en luz difusa. **c.** Presencia de antocianinas en embriones somáticos germinados en condiciones de luz. **d.** Elongación de vástagos en el medio de regeneración. **e.** Enraizamiento de vástagos a los 30 días del repique a frasco. **f.** Rustificación de regenerantes en tierra bajo condiciones controladas (25 °C, 70% HR)

De este modo, se obtuvieron 132 plantas regenerantes del cv. Gatton entre las cuales, cabe destacar, se aisló un individuo con un fenotipo marcadamente variegado que mostraba amplios sectores del tejido foliar con pigmentación verde claro-amarillento (Figura 3.16a). En su fenotipo, incluso, se observó la inversión del patrón de variación en las láminas de las hojas dentro del macollo principal y entre los macollos secundarios (Figura 3.16b). La planta presentó un crecimiento relativamente normal con respecto a las otras regenerantes obtenidas, sin embargo, los macollos de constitución quimérica se vieron rezagados en el crecimiento frente a los macollos normales.



Figura 3.15. Regeneración de plántulas por embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras (R0). Albinismo. **a.** y **b.** Presencia de plántulas verdes y albinas provenientes del mismo callo. MS + 1 mg/l Kin + 1 mg/l GA₃ + 2,5 g/l Phytigel.

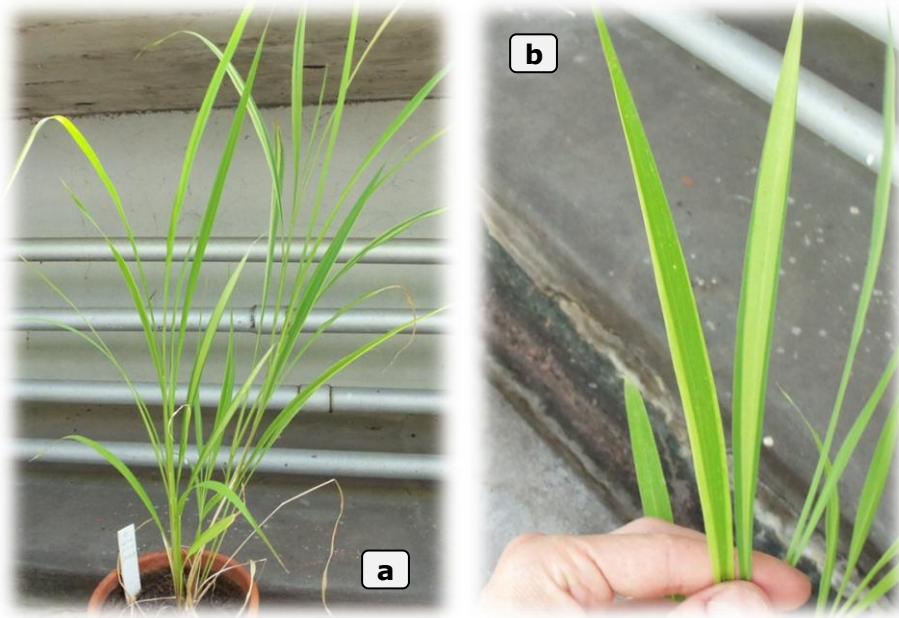


Figura 3.16. Regenerante con presencia de mutaciones clorofílicas en rustificación. **a.** Planta completa. **b.** Patrón de variación.

Al alcanzar el periodo reproductivo se cosecharon todas las panojas de esta regenerante en forma individual, las cuales fueron sembradas al año para evaluar la transmisión del fenotipo a la descendencia.

De las 10 panojas cosechadas se observó que las últimas en orden temporal de desarrollo presentaron mayor proporción de semillas llenas que las primeras (70% vs. 40% en promedio aprox.). Cuando las semillas de las primeras panojas fueron sembradas se registró que las provenientes de la 2ª panoja cosechada no germinaron y las de la 5ª produjeron un valor muy bajo (8%) (Figura 3.17). Esta última, además, presentaba un bajo número de espiguillas (41). Es probable que ambas panojas pertenecieran a la misma línea germinal y que esta presentara alguna mutación que afectó su fertilidad. El promedio de germinación de las panojas restantes fue de $46,62 \pm 8,57\%$. Las plántulas obtenidas no presentaron estrías, deficiencias

clorofílicas ni aberraciones morfológicas similares a lo observado en la planta madre.

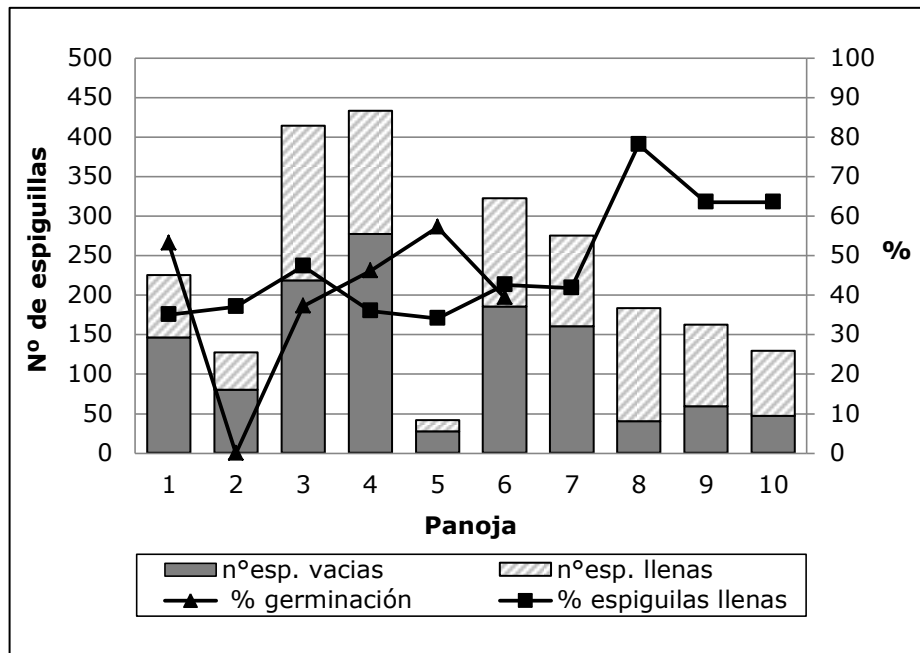


Figura 3.17. Estadística descriptiva de la cosecha de 10 panojas de la variante obtenida por cultivo *in vitro*.

3.4. Discusión

Para comenzar, en este trabajo se pudo ajustar un protocolo eficiente para la desinfección superficial de las semillas sin afectar su poder germinativo (Figura 3.2, Tabla 3.2). De este modo, realizando un doble lavado de las mismas se pudo quitar el peleteado comercial y los restos florales presentes que obstaculizaban el proceso. La mayoría de los trabajos publicados (Lu & Vasil, 1982; Seo *et al.*, 2008, 2010) detallan protocolos similares, aplicados siempre sobre semillas desnudas.

El cultivo *in vitro* a partir de semillas produjo un 15,92% de callos, sin embargo estos no desarrollaron embriones ni plantas regenerantes (Figura 3.3). Estos resultados concuerdan con los estudios de Seo y colaboradores (2008, 2010) quienes trabajando sobre 24 genotipos de 11 especies de *Panicum*, evidenciaron la diferente capacidad de regeneración a partir de semillas que existe en el género, siendo nula en *P. maximum*. También Bajaj y colaboradores (1981) observaron la respuesta diferencial dentro del género. Por el contrario, se puede citar el caso particular reportado por Lu & Vasil (1982), quienes observaron un 40-50% de inducción de callos a partir de semillas y obtuvieron plantas regenerantes de un cultivar de *P. maximum*, pero originados a partir de yemas y raíces adventicias (organogénesis) y no por estructuras embriogénicas. Del mismo modo, Denchev & Conger (1994) obtuvieron regenerantes a partir de semillas maduras de *P. virgatum*, tanto via organogénesis como embriogénesis.

En cuanto al medio de cultivo, en el primer trabajo mencionado los autores utilizaron el mismo medio (MS) ajustado a una concentración óptima de la auxina 2,4 D semejante (4 mg/l) a la utilizada en esta tesis,

mientras que Lu & Vasil (1982) y Denchev & Conger (1994, 1995) arribaron a la misma dosis óptima (5 mg/l). Sin embargo, estos últimos encontraron una interacción positiva de la combinación de 2,4 D y BAP sobre la inducción de callos embriogénicos obteniendo mayor proporción de regenerantes de *P. virgatum* utilizando 2,4 D junto con una alta concentración de BAP (10 mg/l). De modo similar, Chaudhury & Qu (2000) mejoró la capacidad embriogénica de inflorescencias de *Cynodon dactylon* pero con la incorporación de bajas concentraciones de BAP.

En este sentido, y a diferencia de la bibliografía existente sobre *P. maximum*, en esta tesis también se analizó la respuesta *in vitro* de la interacción del 2,4 D con la citoquinina BAP sobre diversos explantes.

En el cultivo *in vitro* a partir de semillas esto no logró mejorar los resultados obtenidos ni obtener callos embriogénicos. Colomba y colaboradores (2006), trabajando sobre semillas y embriones maduros de diferentes cultivares de *Cenchrus ciliaris* arribaron a resultados similares, donde el agregado de BAP al medio de cultivo tampoco mejoró la capacidad de inducción de callos sino que, por el contrario, la perjudicó aún más (Colomba *et al.*, 2006).

En referencia al explante, Seo y colaboradores (2008) relacionaron la capacidad inductiva de los genotipos con el poder germinativo de las semillas. Esto podría explicar la causa por lo que, a comparación con tal estudio, en este se obtuvo un menor porcentaje de inducción de callo (15,9 vs. 33,3%), ya que las semillas con las que se trabajó poseían menor poder germinativo que las utilizadas en la bibliografía (29,67 vs. 89%). En este sentido, los autores sugieren que agregando al medio ácido giberélico u óxido nítrico podría mejora la germinación y, por ende, la inducción de

callo, sin embargo tal hormona no favoreció la germinación en los ensayos de quiebre de dormición (Ver Capítulo II. Calidad de semillas).

Los callos provenientes de semillas observados en este trabajo presentaban una consistencia blanda, de aspecto acuoso, brillante y translucido. De igual modo, Seo y colaboradores (2008) describieron el mismo tipo de callo en el cultivar Gatton y, además, concluyeron que la morfología de los mismos depende del genotipo.

En el cultivo *in vitro* de segmentos de tallo se obtuvo 42,38% de inducción de callo. La mayor capacidad de inducción se observó a partir de los tejidos internos y basales del macollo de *P. maximum*. Esto se condice con los resultados observados por Chen y colaboradores (2001), quienes también utilizaron segmentos de tallo de *Paspalum notatum* cosechando solo los 2-3 cm basales del macollo removiendo las 4-5 hojas externas previo a la siembra. Del mismo modo, Denchev & Conger (2004) observaron una respuesta similar en tejidos de *P. virgatum*. En *P. maximum*, Chen y colaboradores (2002) obtuvieron casi un 9% de callos embriogénicos a partir de segmentos de tallo incubados en un medio con 2,4D, sin embargo no lograron la regeneración del cultivar. En esta tesis, se registró un porcentaje de callos embriogénicos más bajo (2,34%) y tampoco se consiguió mejorar la capacidad de regeneración de los mismos ante la aplicación conjunta de BAP. Por otro lado, los autores describieron el mismo tipo de callo y la regeneración de vástagos a partir de otros genotipos del género. En este sentido, los resultados coinciden con Seo y colaboradores (2008) quienes manifestaron la independencia entre la capacidad de inducir callo (callogénesis) y la de producir regenerantes (embriogénesis), al igual que la dependencia de las variables y el genotipo.

En este trabajo se logró ajustar un protocolo de regeneración por embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras (R0) de *P. maximum* cv. Gatton (Tabla 3.3, Figura 3.14).

En primer término, cabe citar como antecedente al trabajo de Creemers-Molenaar y colaboradores (1988), quienes también establecieron un protocolo de embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras de *Lolium sp.* evaluando el efecto de la aplicación de 2,4 D. En ese trabajo, los investigadores describieron, haciendo referencia a trabajos previos en *Pennisetum purpureum* y *Triticum aestivum*, el frecuente desarrollo "anormal" de embrioides semejantes a escutelos fundidos en forma de copa. Esta observación va en oposición con los antecedentes del cultivo *in vitro* de *P. maximum*, donde se detallan bajo estas mismas características a los embriones "normales", los cuales se encuentran en forma mayoritaria. Mediante el protocolo desarrollado en nuestro trabajo obtuvimos plantas regenerantes provenientes de embriones que concuerdan con esta morfología (Figura 3.11; Figura 3.14).

En segundo término, los mismos autores mencionan que en la etapa de inducción de callos también se registraron casos de presencia de callos rizogénicos al igual que plántulas albinas durante la regeneración. Ambas características están asociadas claramente a la auxina utilizada, 2,4 D. La presencia de callos rizogénicos dependería del genotipo y el tejido utilizado, y mayoritariamente estaría asociado a una concentración elevada de la auxina; mientras que el albinismo, característica frecuente en el cultivo *in vitro* de poaceas (Asaduzzaman *et al.*, 2003; Nien-Tsu *et al.*, 2007), se explicaría mejor por el tipo de auxina empleada.

La presencia de callos rizogénicos fue observada en la siembra de semillas y tallos y, en menor medida, inflorescencias (Figura 3.7), especialmente a mayores concentraciones de 2,4 D. A su vez, se observó un efecto contrario ante la aplicación de BAP (Figura 3.4). Del mismo modo, Lu & Vasil (1981a) observaron que el 90% de los callos embriogénicos provenientes de embriones inmaduros sembrados en el medio con 2,4 D desarrollaron raíces en el mediano plazo.

Por otro lado, podemos definir a una planta albina como una planta de aspecto normal pero que tiene afectada la producción de clorofila (sin pigmentación verde) y su aparato fotosintético, por lo que son plantas únicamente heterótrofas y totalmente inviables agrónomicamente.

Ampliando el tema, muchos autores sostienen que las causas del albinismo son mutaciones espontáneas provocadas y recuperadas por la técnica del cultivo *in vitro per se*. Esta afirmación va de la mano de aquellos que postulan que, tanto el ambiente de crecimiento de la planta madre donante de explantes como la composición del medio de cultivo *in vitro*, influyen en el porcentaje de plantas regenerantes albinas.

En este sentido, es sabido que la nutrición influye en la tasa de mutación espontánea en muchas plantas, la cual se incrementa por deficiencias de azufre, fósforo y nitrógeno. De igual modo, bajo una deficiencia de magnesio o de calcio se registra una muy alta incidencia de rotura de cromosomas, principalmente en el caso de la deficiencia de calcio.

Uno de los casos de albinismo citado frecuentemente en la bibliografía es en el cultivo de anteras de arroz (*Oryza sativa*) donde, Asaduzzaman y colaboradores (2003) registraron la presencia de plantas albinas regeneradas en una proporción similar a la observada en este

trabajo (11,27%). Si bien los autores utilizaron un tejido (reproductivo) y un medio de regeneración similar al utilizado en este ensayo, (MS + 1 mg/l Kinetina + 1 mg/l NAA), los mismos concluyeron que esta característica es dependiente del genotipo. Por el contrario, Amarasinghe (2009), trabajando sobre la misma especie pero con callos derivados de semillas comprobó que la suplementación al medio de cultivo con sulfato de cobre y cloruro de cobalto no sólo aumentó la inducción de callos sino que redujo la proporción de plantas albinas regeneradas, afirmando la hipótesis de la deficiencia nutricional.

En cuanto a la composición hormonal del medio de cultivo existen antecedentes que avalan que la exposición prolongada a altas concentraciones de 2,4-D durante el cultivo de tejidos afecta la frecuencia de regeneración y también causa anormalidades cromosómicas (Dale & Deambrogio, 1980; Nabors *et al.*, 1983; Ziauddin & Kasha, 1990; Baillie *et al.*, 1993). En este sentido, Bajaj y colaboradores (1981), utilizando 2,4 D en el cultivo *in vitro* de *Panicum miliaceum*, también observaron plantas albinas y detectaron individuos aneuploides entre los regenerantes con un número cromosómico de 29 a 36 cromosomas. Seo y colaboradores (2010), por otro lado, observaron que a concentraciones mayores de 1 mg/l de TDZ se produjeron plantas albinas en *P. meyerianum* y *P. longijubatum*. Del mismo modo, Lajonchere y colaboradores (1995), en sus ensayos de mutagenesis *in vitro* utilizando callos embriogénicos de *P. maximum* cv. K-249 en un medio con 3 mg/l de 2,4 D, registraron casi un 18% de regenerantes albinas en el tratamiento control, datos superiores a nuestros resultados (10%, aprox.). De este modo, los autores postulan como probables causas a la baja estabilidad genética de la embriogénesis o la

composición química del medio. Por el contrario, Hanna y colaboradores (1984) evaluando la fidelidad morfológica y cariotípica de plantas regenerantes de *P. maximum* y de sus progenies, provenientes de cultivos de segmentos de tallo bajo condiciones de cultivo similares, no encontraron evidencias de variabilidad alguna con respecto a la planta madre.

En gramíneas forrajeras puede citarse casos de variación cromosómica en *Festuca arundinacea* y *Eragrostis curvula*; albinismo en *Lolium perenne* y *Festuca pratense*; cambios en la morfología de planta, forma y tamaño de hoja y espiga, desarrollo floral, vigor y supervivencia en somaclones de *Lolium* y *Festuca arundinacea*; variación isoenzimática en *Festuca arundinacea*; y disturbios reproductivos y resistencia al moteado de hoja en *Cynodon dactylon*.

En este trabajo, entre los regenerantes de *P. maximum* cv. Gatton obtenidos, se reportó una planta quimérica con claras deficiencias clorofílicas. Sin embargo, al evaluar la germinación de su progenie y compararla cualitativamente con el fenotipo de la planta madre, no se observó la transmisión de los rasgos a la descendencia. Si bien la germinación de las semillas provenientes de la 2ª y 5ª panoja se vio afectada, no pudimos concluir que existió variación somaclonal estable y transmisible. Estas características concuerdan con los trabajos de mutagénesis de Fladung (1994) en *P. maximum*, quien obtuvo en la M2 un individuo denominado *var1* de morfología similar. En un análisis más profundo, el autor explica la diferente pigmentación de los sectores mutados en las láminas de las hojas debido a la ausencia de cloroplastos en las células de la vaina. Cuando este analizó su progenie también registró que la planta poseía una fertilidad y capacidad de germinación reducida, sin

embargo, a diferencia de nosotros, sí observó la segregación del carácter en la progenie.

Por otro lado, se observó que la posición de las espiguillas en la panoja R1 y, por lo tanto, su estado de madurez influye en la capacidad de inducción de callo, obteniéndose mayor proporción de callos a partir de espiguillas de los racimos inferiores (Figura 3.13). Sin embargo, esta variable no se asoció específicamente con la inducción de callos embriogénicos. Este fenómeno se relaciona en parte con lo citado por Noirot (1992) quien explica que la floración de *P. maximum* comienza con las primeras espiguillas ubicadas en los racimos de la parte superior de la panoja, y luego se extiende en sentido basípeto indicando su mayor desarrollo.

Chen y colaboradores (2002) estudiaron el cultivo *in vitro* de ovarios de *P. maximum* var. *trichoglume* cv. Petrie extraídos de espiguillas cosechadas entre los 0 - 7 días después de la antesis, observando que los ovarios fertilizados que contaban con un embrión inmaduro produjeron callos embriogénicos, mientras que los no fertilizados se necrosaron sin producir callo. Este resultado va en línea con lo observado en esta tesis, en cuanto a que las espiguillas inmaduras sembradas pero que maduraron y se indujeron a antesis *in vitro*, también se necrosaron por completo, al igual que los ovarios escindidos de las espiguillas en R3. Sin embargo, contrario a lo reportado por los autores, en esta tesis tampoco se obtuvieron callos en la siembra de ovarios extraídos de espiguillas en antesis (R5), mientras que aquellos lograron producir callos aún en un bajo porcentaje (3,3%). Las conclusiones obtenidas por este grupo en cuanto a que la inducción de callo es proporcional a la tasa de fertilización del ovario (y a la presencia del

embrión inmaduro) también se podría relacionar con lo observado por Seo y colaboradores (2008, 2010), donde a mayor porcentaje de germinación de las semillas (viabilidad del embrión) se obtiene mayor inducción de callos. Sin embargo, estos últimos no observaron regeneración a partir del embrión maduro de cv. Gatton, pero sí del inmaduro. De igual modo, el tamaño del explante o la técnica de extracción del ovario también pudieron influir en los resultados del cultivo *in vitro*.

Creemers-Molenaar y colaboradores (1988), al igual que en este trabajo, también describieron el problema frecuente del oscurecimiento y la necrosis de los callos, aunque le procuraron menor relevancia. Si bien en algún momento se hipotetizó que los agentes de desinfección podían ser los factores causantes de la oxidación y, por ende, del bajo porcentaje de inducción de callo de los tallos sembrados, al sortear esta etapa utilizando tallos obtenidos de material *in vitro* estéril obtuvimos los mismos resultados, indicando que es una característica intrínseca del genotipo y de su interacción con el sistema de cultivo. De hecho, en general, se observó mayor necrosis de los callos cuando desarrollaron estructuras embriogénicas, indicando que este fenómeno podría tener origen en la liberación de sustancias fenólicas o generadoras de estrés oxidativo a partir de células más especializadas. A la misma observación arribaron Lajonchere y colaboradores (1993) en el cultivo *in vitro* del cv. Likoni.

Akashi y Adachi (1991) también se encontraron con la dificultad de mantener el cultivo de callos embriogénicos en el tiempo debido a la necrosis y atribuyeron este fenómeno a un efecto del agar del medio sobre la superficie de contacto de los callos. Así, cuando el agente gelificante fue reemplazado por Gelrite los callos retuvieron su capacidad embriogénica.

Siguiendo esta observación en esta tesis se utilizó Phytigel™ en el medio de regeneración, sin embargo, el problema de la necrosis no fue sorteado por completo.

En este sentido, muchos investigadores (Lu & Vasil, 1981b, 1982; Akashi & Adachi, 1991; Lajonchere *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2002b) recurrieron al agregado de un 5 a 10% de agua de coco en el medio de cultivo; sin embargo, Lu & Vasil (1981a) no encontraron mejoras en la callogénesis de segmentos de tallo de *P. maximum*. Otros autores tampoco lo utilizaron (Chen *et al.*, 2002a; Seo *et al.*, 2008,2010), por lo que no fue probado en este trabajo.

En cuanto al ambiente de regeneración, en este trabajo se comprobó que exponer los callos embriogénicos o embriones a la luz directa agravaba la necrosis e interrumpía su germinación. Mientras que si se los incubaba ante luz difusa mejoraban los resultados. Chen y colaboradores (2002) arribaron a las mismas conclusiones.

La bibliografía muestra también otras estrategias para disminuir la necrosis de los tejidos que podrían probarse como la elección de otro medio de cultivo (bajo en sales, N y K) o de los reguladores de crecimiento (2,4 D y BAP son citados como los más problemáticos); la utilización de antioxidantes (ác. ascórbico, ácido cítrico, nitrato de plata) y/o adsorbentes (carbón activado, PVP, PVPP) como pretratamientos de los explantes o incluidos en el medio; la incubación de los explantes a baja intensidad lumínica y/o baja temperatura; y la realización de subcultivos o repiques con mayor frecuencia, entre otros.

3.5. Conclusión

De todos los explantes testeados, el protocolo de regeneración desarrollado a partir de inflorescencias inmaduras (R0) fue el único que aportó buenos resultados. De este modo, se obtuvieron regenerantes de Gatton Panic y Green Panic a partir de este explante que no había sido registrado en la bibliografía. Si bien la generación de inflorescencias es estacional, el volumen de material a cosechar durante la época de encañazón es alto.

La necrosis durante la regeneración fue parcialmente controlada mediante la exposición gradual de los callos embriogénicos a condiciones de luz difusa. Modificar la composición química del medio incorporando antioxidantes y adsorbentes permitiría afrontar el problema y aumentar la eficiencia del proceso.

En este trabajo, al igual que en la bibliografía, se reportaron casos de albinismo. También se obtuvo un individuo con un fenotipo variegado pero que no transmitió esta característica a la progenie, por lo que no podemos afirmar que se obtuvo una variante somaclonal. La recuperación de tal variabilidad seguiría la metodología de un protocolo de mutagénesis convencional.

Tales resultados dan evidencia de la capacidad de generación de variabilidad mediante la técnica *per se*, objetivo perseguido en este trabajo.

3.6. Bibliografía

- Ahuja, P. S., Pental, D. & Cocking, E. C. (1982). Plant regeneration from leaf base callus and cell suspensions from *Triticum aestivum*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 89, 139-147
- Akashi, R. & Adachi, T. (1991). High frequency somatic embryo formation in cultures of immature embryos of Guinea grass, *Panicum maximum* Jacq. *Japan. J. Breed.* 41, 85-93.
- Alexandrova, K. S., Denchev, P. D., & Conger, B. V. (1996). *In vitro* development of inflorescences from switchgrass nodal segments. *Crop Sci.* 36, 175-178.
- Amarashingue, A.A.Y. (2009). Effects of copper sulphate and cobalt chloride on *in vitro* performances of traditional indica rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Sri Lanka. *Journal of Agricultural Sciences*, 4(3);132-141
- Asaduzzaman, M., Bari, M. A., Rahman, M. H., Khatun, N., Islam, M. A. & M., Rahman. (2003). *In vitro* plant regeneration through anther culture of five rice varieties. *Journal of Biological Sciences* 3(2), 167-171.
- Bayliss, M. W. & Dunn, S. D. M (1979). Factors affecting callus formation from embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science Letters* 14, 311-316
- Bajaj, Y. P. S., Sidhu, B. S. & Dubey, V. K. (1981). Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass - *Panicum* spp. *Euphytica* 30, 135-140.
- Brettell, R. I. S., Wernicke, W. & Thomas, E. (1980). Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 104, 141-146

- Burris, J. N., Mann, D. G. J. & Blake, L. J. (2009). An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in Switchgrass. *Bioenerg. Res.* 2, 267-274.
- Carter, O., Yamada, Y. & Takahashi, E. (1967). Tissue culture of oats. *Nature* 214, 1029-1030
- Chen, L. Z., Okabe, R., Guan, L. M. & Adachi, T. (2002a). A simple and efficient culture of leaflets for plant regeneration in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Japan Plant Biotechnology*, 19(1): 63-68.
- (2002b). Effect of harvest seasons on the efficiency of ovary culture in *Panicum maximum* Jacq. *Plant Biotechnology*, 19(3): 173-179.
- Creemers-molenar, J., Loeffen, J. P. M. & van der valk, P. (1988). The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence-derived callus of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. *Plant Sci.* 57, 165-172.
- Croughan, S. S., Quisenberry, S. S., Eichhorn, M. M., Colyer, P. D. & Brown, T. F. (1994). Registration of Brazos-R3 bermuda grass germplasm. *Crop Sci.* 34, 542.
- Cure, W. W. & Mott, R. L. (1978). A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize, wheat and oats. *Physiologia Plantarum* 42, 91-96
- Dale, P. J. & Deambrogio, E. (1979). A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. *Zeitschriftfür Pflanzenphysiologie* 94, 65-77
- Denchev, P. D. & Conger, B. V. (1995). *In vitro* culture of Switchgrass: influence of 2,4D and picloram in combination with benzyladenine on

callus initiation and regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40, 43-48.

----- (1994). Plant regeneration from callus cultures of Switchgrass. *Crop Science* 34, 1623-1627.

Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P. & Ríos, R. D. (2004). Transformación Genética. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*, Echenique V., Rubinstein C. y Mroginski L. (eds). Ediciones INTA. pp 109-124.

Ebina M., Kouki K., Tsura S., Akashi R., Yamamoto T., Takahara M., Inafuku M., Okumura K., Nakagawa H. y Nakajima K. 2007. Genetic relationship estimation in guineagrass (*Panicum maximum*Jacq.) assessed on the basis of simple sequence repeat markers. *Grassland Science* 53:155-164.

Fladung, M. & Hesselbach, J. (1986). Callus induction and plant regeneration in *Panicum bisulcatum* and *Panicum milioides*. *Plant Cell Reports* 3, 169-173.

Franzone, P. M., Suárez, E., Solari, R., Favret, E. A., Ríos, R. & Díaz Paleo, A. 1996. Somaclonal variation in three argentinean varieties of *Triticumaestivum* with different karyotypic instability. *Plant Breeding*. 115: 89 - 93.

Freire Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología vegetal* 3(4):195-209.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. (1968). Nutrient Requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Research* 50, 151-158.

- Hanna, W., Lu, C., & Vasil, I. K. (1984). Uniformity of plants regenerated from somatic embryos of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass) *Theor. Appl. Genet.* 67, 155-159.
- Hanning, G. E., & Conger, B. V. (1982). Embryoid and plantlet formation from leaf segments of *Dactylis glomerata* L. *Theor. Appl. Genet.* 63, 155-159
- Harms, C. T., Lörz, H., & Potrykus, I. (1976). Regeneration of plantlets from callus cultures of *Zea mays* L. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 77, 347-351
- Haydu, Z., & Vasil, I. K. (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues and anthers of *Pennisetum purpureum* Schum. *Theor. Appl. Genet.* 59, 269-273
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347, 1-32.
- Ibáñez Alcocer, M. R. (2013). Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal. Universitat de València. Valencia, España. 106 pp.
- Lajonchere, G., Mesa, A. R., Prieto, M. & Sanchez-Quiroz, E. (1995). Curva de radiosensibilidad con ⁶⁰Co en Guinea (*Panicum maximum*) cv. K-249. *Pastos y Forrajes* 1(1):35-42.
- Lajonchere, G., Mesa, A. R., Prieto, M. & Toral, O. (1993). Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de ápices caulinares de *Panicum maximum* Jacq. cv. Likoni. *Pastos y Forrajes*, 16(3), 201-206

- Larkin, P. J. & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214.
- Leifert C., Murphy, K. P., & Lumsden, P. J. (1995). Mineral and carbohydrate nutrition of plant and cell tissue cultures. *CRC Critical Reviews* 14, 83-109.
- Li, J. C., Choo, T. M., Ho, K. M., Falk, D. E. & Blatt, R. (2001). Barley somaclones associated with high yield or resistance to powdery mildew. *Euphytica* 121: 349-356.
- Lloyd, G. & McCown, B. H. (1981). Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30, 421-427.
- Lu, C. & Vasil, I. K. (1981a). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. *Theoretical and Applied Genetics* 59, 275-280
- (1981b). Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely-suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq. *Ann. Bot.* 48, 543-548
- (1982). Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum maximum* Jacq. *Amer. J. Bot.* 69(1): 77-81.
- Lupotto, E. (1984). Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. *Annals of Botany* 54, 523-525
- Maddock, S. E., Lancaster, V. A., Risiott, R. & Franklin, J. (1983). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of

- 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 34, 915-926
- Mroginski, L., Sansberro, P. & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginsky. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. (I-1). (pp. 17-25). Buenos Aires: INTA.
- Muñoz de Malajovich, M. A. (2012). *Biotecnología*. (2a ed.). Bernal, Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nakano, H. & Maeda, E. (1979). Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 93, 449-458
- Nien-Tsu, L., Wann-Neng, J., Hsin-Sheng, T., Hui, W., Wei-Chin, C. & Choun-Sea, L. (2007). Chloroplast genome aberration in micropropagation derived albino *Bambusa edulis* mutants, *ab1* and *ab2*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 88, 147-156.
- Nishi, T., Yamada, Y. & Takahashi, E. (1968). Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219, 508-509
- O'Hara, J. F. & Street, H. E. (1978). Wheat callus culture: The initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. *Annals of Botany* 42, 1029-1038
- Ozias-Akins, P. & Vasil, I. K. (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110, 95-105

- Pessino, S. C. & Ortiz, J. P. A. (2010). Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. (V-3). En G., Levitus, V., Echenique, C., Rubinstein, E., Hopp & L., Mroginsky. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Buenos Aires: INTA, ARGENBIO.
- Rajyalakshmi, K., Dhir, S. K., Maheshwari, N. & Maheshwari, S. C. (1988). Callusing and regeneration of plantlets via somatic embryogenesis from inflorescence cultures of *Triticum aestivum* L.: Role of genotype and long-term retention of morphogenic potential. *Plant Breeding* 101, 80-85
- Roca, W. M. & Mroginski, L. A. (Eds.) (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Saalbach, G. & Koblitz, H. (1978). Attempts to initiate callus formation from barley leaves. *Plant Science Letters* 13, 165-169
- Seguí, E., Prieto, M., Fernández, E. y Martín, G. (1993). Avance genético en *Panicum maximum* a través del cultivo *in vitro*. *Pastos y forrajes*, 16(2), 147-153.
- Seo M.S., Takahara M., Ebina M. y Takamizo T. (2008). Evaluation of tissue culture response from mature seeds of *Panicum spp.* *Grassland Science* 54: 125-130.
- Seo, M. S., Takahara, M. & Takamizo, T. (2010). Optimization of culture conditions for plant regeneration of *Panicum spp.* through somatic embryogenesis. *Grassland Science* 56, 1-7.
- Sharma, V. K., Rao, A., Varshney, A. & Kothari, S. L. (1995). Comparison of developmental stages of inflorescences for high frequency plant

- regeneration in *Triticum aestivum* L. and *Triticum durum* Desf. *Plant Cell Reports* 15, 227-231
- Sivanesan, I. (2007). Shoot regeneration and somaclonal variation from leaf callus cultures of *Plumbago zeylanica* Linn. *Asian J. Plant Sci.* 6, 83-86.
- Somleva, M. N., Tomaszewski, Z. & Conger, B. V. (2002). Agrobacterium-mediated genetic transformation of Switchgrass. *Crop Science* 42, 2080-2087.
- Thomas, M. R., & Scott, K. J. (1985). Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum vulgare*. *Journal of Plant Physiology* 121, 159-169.
- Wang, D-Y. & Vasil, I. K. (1982). Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Science Letters* 25, 147-154.
- Wernicke, W. & Brettell, R. (1980). Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature* 287, 138-139
- Wernicke, W., Brettell, R., Wakizuka, T. & Potrykus, I. (1981). Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 103, 361-365
- Wernicke, W., Potrykus, I. & Thomas, E. (1982). Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor* – The morphogenetic pathways. *Protoplasma* 111, 53-62
- Zamora, B. & Scott, K. J. (1983). Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. *Plant Science Letters* 29, 183-189

3.7. ANEXO

Table 2. Primary and secondary growth stages as described by Moore et al. (1991) and their numerical indices and descriptions for staging growth and development of perennial grasses.

Stage	Index†	Description
<u>Vegetative – leaf development</u>		
Ve or Vo	1.0	Emergence of first leaf
V1	$(1/N) + 0.9$	First leaf collared
V2	$(2/N) + 0.9$	Second leaf collared
Vn	$(n/N) + 0.9$	N th leaf collared
<u>Elongation – stem elongation</u>		
Eo	2.0	Onset of stem elongation
E1	$(1/N) + 1.9$	First node palpable/visible
E2	$(2/N) + 1.9$	Second node palpable/visible
En	$(n/N) + 1.9$	N th node palpable/visible
<u>Reproductive – floral development</u>		
Ro	3.0	Boot stage
R1	3.1	Inflorescence emergence/first spikelet visible
R2	3.3	Spikelets fully emerged/peduncle not emerged
R3	3.5	Inflorescence emerged/peduncle fully elongated
R4	3.7	Anther emergence/anthesis
R5	3.9	Post-anthesis/fertilization
<u>Seed development and ripening</u>		
S0	4.0	Caryopsis visible
S1	4.1	Milk
S2	4.3	Soft dough
S3	4.5	Hard dough
S4	4.7	Endosperm hard/physiological maturity
S5	4.9	Endosperm dry/seed ripe

† Where n equals the event number (number of leaves or nodes) and N equals the number of events within the primary stage (total number of leaves or nodes developed). General formula is $P + (n/N) - 0.1$; where P equals primary stage number (1 or 2 for vegetative and elongation, respectively) and n equals the event number. When $N > 9$, the formula $P + 0.9 (n/N)$ should be used.

**CAPÍTULO IV:
MUTAGÉNESIS**

V. Mutagénesis

4.1. Introducción

Hugo de Vries, en su obra *Die Mutationstheorie, I und II* (1901-1903), define por primera vez a las mutaciones (del latín *mutare*=cambiar) como “cambios repentinos que muy ocasionalmente pueden sufrir los *factores mendelianos* (llamados posteriormente *genes*)”.

Específicamente, hoy nos referimos a alteraciones en el ADN, ya sea por cambios en una o unas pocas bases denominada *mutación puntual*, como por pérdidas, adiciones o translocaciones de grandes segmentos de ADN e incluso cromosomas y genomas enteros, generando *cambios estructurales*. Más recientemente, también podemos agregar en este grupo a las alteraciones heredables de naturaleza epigenética (Prina, 1994).

En la naturaleza se generan mutaciones constantemente y de manera espontánea pero en una frecuencia reducida (entre 10^{-8} y 10^{-5}). Tales *mutaciones espontáneas* son el origen primario de la variabilidad genética existente. Es así que el desarrollo de técnicas de mutagénesis inducida que incrementan su tasa de ocurrencia (10^{-5} y 10^{-2}) cobró gran importancia para el mejoramiento genético vegetal.

Los parámetros mejorados a través de las mutaciones inducidas incluyen caracteres de altura, sincronización de la floración, tiempo de maduración, rendimiento de materia seca, incremento en la producción de grano, tolerancia a estreses bióticos y abióticos, contenido de proteínas, porcentaje de aceite, entre otros (Ahloowalia *et al.*, 2004).

El uso directo de mutaciones inducidas en el mejoramiento es comparable con la metodología tradicional de retrocruzamiento, ya que se trata de modificar uno o pocos caracteres conservando el fondo genético inicial.

Principalmente, adquiere gran importancia cuando la variabilidad para el carácter a mejorar no se encuentra disponible o cuando el objeto de mejora tiene limitada su capacidad de intercambio genético, como los cultivos de propagación vegetativa o las especies altamente apomícticos.

Para desarrollar un protocolo eficiente de mutagénesis inducida es necesario considerar varios factores como el tipo de agente mutagénico, la dosis aplicada y el tiempo de exposición. De igual modo, intervienen las características del material vegetal, como el genotipo y el tipo de órgano o tejido tratado. Todos los componentes van a determinar el nivel de "daño" generado. Por último, se debe considerar al sistema reproductivo o de propagación de la especie que determinará la metodología de selección y recuperación de la mutación buscada (Prina, 1994).

4.1.1. Clasificación

En referencia a los agentes mutagénicos, estos pueden clasificarse según su naturaleza en tres grandes grupos: agentes físicos, químicos y biológicos.

4.1.1.1. Agentes físicos

Dentro de este grupo se concentran los distintos tipos de radiaciones ionizantes como los rayos x, los rayos gamma, los neutrones, los protones y las partículas alfa.

Los rayos x y los gamma son radiaciones electromagnéticas de baja energía lineal (o no densamente ionizantes), que pueden penetrar desde varios milímetros a centímetros, por lo que son adecuados para aplicar sobre semillas o yemas vegetativas (Figura 4.1).

El nivel y tipo de daño dependerá, tanto del poder de ionización y penetración de la radiación (exposición) como de las características del material tratado, el estado metabólico o el contenido de agua y oxígeno del tejido (dosis absorbida). Del mismo modo, los efectos a una determinada dosis pueden variar según el tiempo de exposición requerido para alcanzar dicha dosis (tasa de dosis). En este sentido, es sabido que los efectos letales de una determinada dosis pueden verse disminuidos cuando se aplica repartida en el tiempo con periodos de recuperación (tratamientos recurrentes).

Por lo general, los tratamientos con radiaciones ionizantes generan altos niveles de daño cromosómico, originando roturas simples y dobles de la cadena de ADN, y efectos fisiológicos deletéreos que conllevan a una alta letalidad celular y alta esterilidad (Prina, 1993).

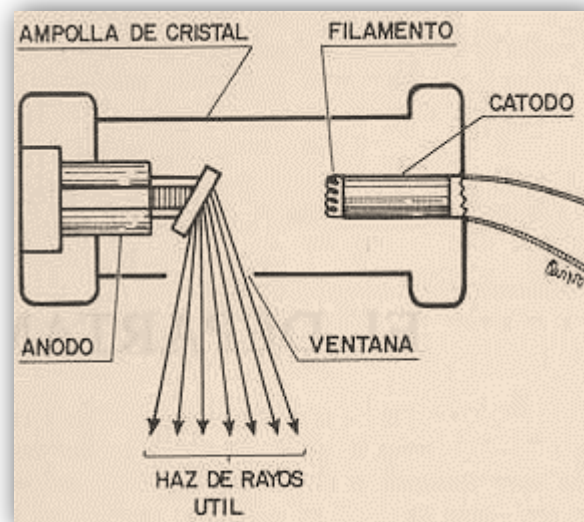


Figura 4.1. Modelo de un tubo de rayos x. Ampolla de vidrio al vacío en el cual un filamento de tungsteno (cátodo) emite electrones de alta energía hacia un bloque de metal (ánodo) generando rayos x como producto de la colisión. (Tomado de <http://radiologiauaa.wordpress.com/2012/02/02/generacion-de-los-rayos-x/>)

La determinación de la cantidad de exposición a la radiación o dosis se denomina "dosimetría".

Para poder medir y comparar las energías absorbidas por un tejido en diferentes condiciones, previamente es necesario definir ciertos conceptos (exposición, dosis absorbida, tasa de dosis absorbida), así como las unidades correspondientes.

En primer lugar, la exposición es una medida de la ionización producida por una radiación. El Roentgen (R) es la unidad tradicional para medir la exposición a la radiación, basada en la capacidad de ionizar el aire y generar $2,58 \cdot 10^{-4}$ Coulomb/Kg ó 0,00869 J/ kg de aire en condiciones estándares de temperatura y de presión.

Sin embargo, el Roentgen deposita diferentes cantidades de energía según el material que recibe la exposición, por lo que resulta más preciso definir a la dosis absorbida (D), como la energía depositada por unidad de masa, independientemente de qué material se trate.

A diferencia del Roentgen, el rad (Dosis de Radiación Absorbida) no está restringido al aire y se puede aplicar a toda clase de radiaciones. Un Roentgen (R) deposita en el aire una dosis de 0,87 rad ó de 0,96 rad en tejidos. El equivalente del rad en el Sistema Métrico Internacional es el gray (Gy) = 1 J/kg (1 Gy = 100 rad). Esta unidad de medida actualmente es la más empleada para indicar la cantidad de energía depositada en un cuerpo.

Por último, para conocer la tasa de dosis absorbida (D/t), se divide la dosis recibida (D) entre el intervalo de tiempo (t) correspondiente. O, en su defecto, la dosis total recibida será igual a la tasa de dosis multiplicada por el tiempo de exposición.

4.1.1.2. Agentes químicos

Entre los mutágenos químicos podemos mencionar varios agentes alquilantes (alquil alcanosulfonatos, dialquil sulfatos y compuestos nitrosos) y a la azida sódica.

En comparación con los agentes físicos, los químicos suelen tener mayor especificidad e inducir mutaciones con una tasa de 5×10^{-4} a 5×10^{-2} por gen, sin excesivos casos de muerte en el individuo.

El sulfonato de etil metano (EMS) (Figura 4.2), uno de los agentes más utilizados, es productor de mutaciones de punto de tipo transicional, cambiando G/C a A/T. Esto se produce porque el grupo etilo ataca a las guaninas del ADN, dando lugar a la base anormal O-6-etilguanina, que, durante la replicación, produce el error de la ADN polimerasa e introduce timina como base complementaria en vez de citosina, su complementaria en el silvestre.

Los factores biológicos que influyen sobre la tasa y el espectro de mutaciones son la fase en que se encuentre la célula al ser tratada, la composición de bases y el tamaño del gen, y la eficiencia de los distintos sistemas de reparación celular que posean.

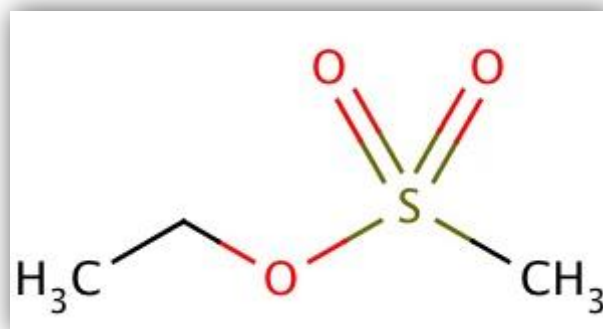


Figura 4.2. Fórmula química de sulfonato de etil metano (EMS)

4.1.1.3. Agentes biológicos

Por último, cabe mencionar que existen factores de naturaleza biológica que producen inestabilidad en el ADN, como los genes relacionados con los sistemas de reparación del ADN o la activación de transposones, que generan variabilidad fenotípica en la descendencia (Prina, 1993).

4.1.2. Aspectos generales

Las mutaciones inducidas pueden manifestarse como cambios fenotípicos de diversa magnitud. Por lo general, cuanto mayor es la magnitud del cambio, menor es la vitalidad promedio de los mutantes. Es por ello que uno de los parámetros base para ajustar en un protocolo de mutagénesis es determinar la dosis de semiletalidad, DL_{50} . De esta manera, se trata de determinar una dosis de compromiso que genere el mayor "daño" posible y una mínima letalidad, es decir la mayor eficiencia.

En relación a los cambios fenotípicos resultantes cabe recordar que por medio de esta técnica se generan *quimeras* o mosaicos genéticos. Es decir, hay presencia de células somáticas de distinta constitución genética en un tejido u organismo. Este fenómeno se evidencia, principalmente, en la primera generación de las plantas mutagenizadas (M1) obtenidas a partir de la aplicación de tratamientos sobre un tejido pluricelular (M0). De este modo, la célula mutada inicialmente se multiplica por mitosis, independientemente del resto del tejido, y origina una línea celular, clon o mutante, que, en el caso de las mutaciones clorofílicas, puede ser observado como estrías longitudinales en monocotiledóneas o como manchas irregulares (mosaicos) en dicotiledóneas.

Para el aislamiento de mutantes estables en forma eficiente, es necesario agrandar tales clones celulares de manera que los sectores mutantes puedan ser detectados y seleccionados. En el tratamiento de semillas en plantas de reproducción sexual esto se logra pasando a la siguiente generación (M2).

Si el clon de células mutadas presentara desventajas competitivas frente al resto de las células del tejido podría suceder la *selección diplóntica* y se perdería la línea celular. De igual modo, si la mutación se produjera en una célula que no integra la línea germinal, o si la mutación generara altos niveles de esterilidad de las gametas por daños en la meiosis, se producirá la *selección haplóntica*, impidiendo la recuperación de la mutación en la M2.

Por el contrario, en el caso de especies de reproducción asexual, se pueden realizar podas sucesivas o recurrir a la micropropagación vegetativa, como por ejemplo, en frutales y gramíneas apomícticas.

En la Figura 4.3 se esquematiza la aplicación de un tratamiento mutagénico sobre semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) y los diferentes efectos fenotípicos que pueden registrarse: desde aberraciones cromosómicas en mitosis y meiosis, hasta afectación de la germinación, supervivencia y esterilidad, pasando por cambios fisiológicos en el crecimiento y presencia de estrías.

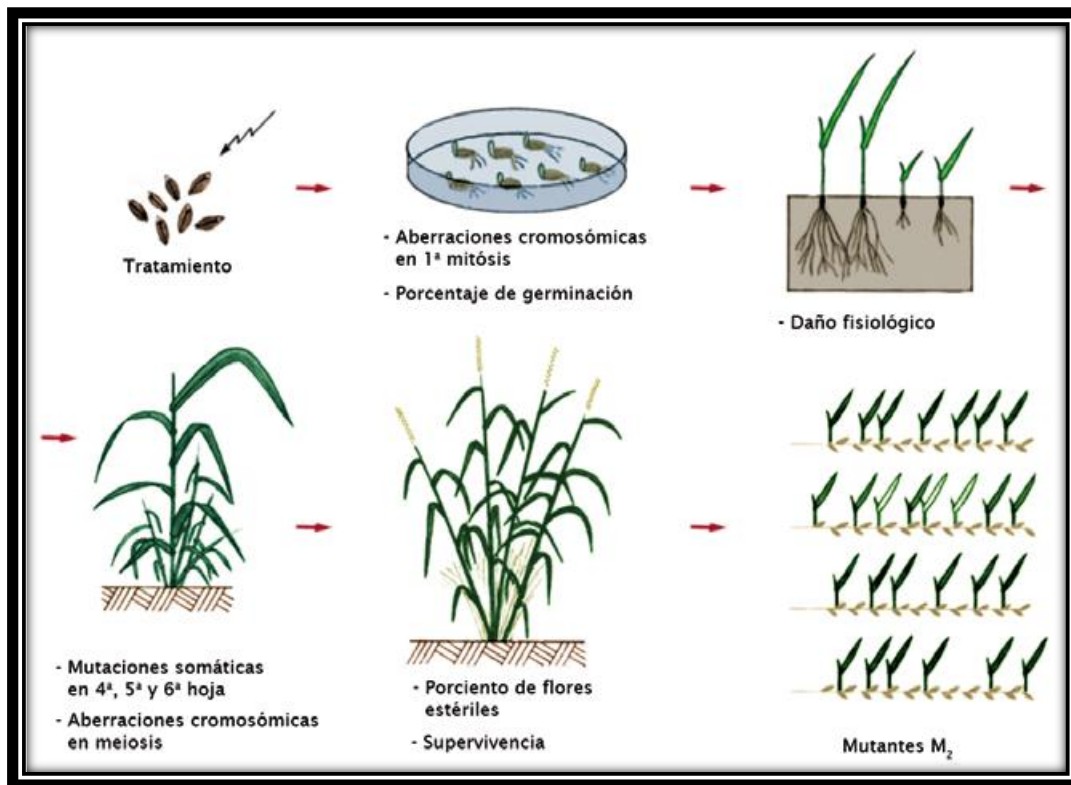


Figura 4.3. Esquema de las principales etapas en las que se registran los efectos de los tratamientos mutagénicos. (Tomado de Prina *et al.*, 2010)

4.1.3. Antecedentes

Existe una amplia experiencia a nivel internacional en la inducción de variabilidad genética mediante mutagénesis. Al año 2000, más del 70% de las variedades registradas (mutantes *per se*, o generadas por hibridaciones o retrocruzas) en el banco de datos de variedades mutantes de la IAEA/FAO, correspondían a cereales y leguminosas (Ahloowalia *et al.*, 2004; Mohan Jain, 2005). En la actualidad se encuentran registradas 3222 variedades logradas mediante mutaciones inducidas.

Entre los estudios en gramíneas forrajeras, Engvild (2005) evaluó sobre *Brachypodium distachyon*, planta gramínea forrajera modelo, protocolos de mutagénesis química con EMS y azida sódica desarrollados anteriormente en *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa*.

Del mismo modo, varios grupos de trabajo han desarrollado investigaciones sobre mutagénesis en forrajeras tropicales (megatérmicas). A saber, Krishna y colaboradores (1984) trabajaron con rayos gamma sobre *Chloris gayana*; Hussin y colaboradores (2000) también utilizaron rayos gamma sobre *Brachiaria decumbens*; mientras que Pongtongkam y colaboradores (2005, 2006) seleccionaron individuos de *Brachiaria ruziziensis* y *Panicum maximum* tolerantes a la salinidad desarrollados mediante rayos gamma y cultivo *in vitro*; Li y colaboradores (2010), trabajaron con rayos gamma sobre esquejes y callos de *Stenotaphrum secundatum*; y Lopez Colomba (2011) también indujo tolerancia al estrés abiótico mediante rayos x y EMS en *Cenchrus ciliaris*.

En *Panicum maximum* var. *trichoglume*, Shivashankar y colaboradores (1988) trabajando con rayos gamma seleccionaron individuos cuya iniciación de la panoja fue inhibida, por lo que aumentaron el número de macollos y el rendimiento de follaje verde; mientras que Fladung y colaboradores (1991, 1994) aplicaron EMS sobre otro cultivar y generaron variantes putativas en cuanto a caracteres morfológicos caracterizándolas según parámetros de morfología floral, fotosíntesis y fotorespiración.

4.2. Materiales y Métodos.

4.2.1. Mutagénesis química (EMS).

4.2.1.1. Determinación de la DL₅₀

Para realizar el ajuste de un protocolo de mutagénesis química con sulfonato de etil metano (EMS) (SIGMA cat. #0880) sobre semillas del cultivar comercial Gatton de *Panicum maximum* Jacq. se efectuaron diferentes ensayos con el fin de arribar a la dosis de semiletalidad, DL₅₀, y a la dosis de mayor eficiencia.

- *Materiales*

Las semillas utilizadas en todos los ensayos provinieron de una misma muestra almacenada en la heladera a 4 °C.

Previo a la aplicación de los tratamientos, las semillas fueron lavadas y secadas para remover las sustancias adheridas durante el peleteado comercial y, de esta manera, evitar interferencias en los resultados (Ver 2.2.1). En el mismo proceso, las mismas fueron desprovistas manualmente de sus envolturas.

Luego se realizó su desinfección superficial (Ver 3.2.1.1)

- *Diseño experimental*

En primer lugar, se aproximó de forma gráfica a la determinación de la DL₅₀ (concentración a la que se reduce en un 50% el poder germinativo) realizando un experimento multifactorial con dos factores: dosis de EMS y tiempo de exposición al agente.

Para el primer factor se formularon soluciones acuosas de EMS con las siguientes concentraciones: 0; 1; 2; 3; 4; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 y 20‰ EMS.

Como segundo factor se establecieron dos tiempos de exposición de las semillas al agente químico: 18 h, ó 2 h realizando un remojo previo de 16 h en H₂O_d. El tratamiento previo en H₂O_d se realizó con la finalidad de equiparar el tiempo de imbibición de las semillas. Estos tratamientos se denominaron: sin tratamiento previo en H₂O y con tratamiento previo en H₂O.

Se utilizaron muestras de 300 semillas para cada tratamiento. El ensayo siguió un diseño completamente aleatorizado (DCA) y se repitió tres veces.

Cada tratamiento se preparó dispensando, mediante pipetas (P₂₀₋₂₀₀), los volúmenes de EMS que correspondiere (Tabla 1) en Erlenmeyers de 50 ml conteniendo 10 ml de H₂O_d (volumen total) y disolviéndolos suavemente mediante agitación manual.

Tabla 4.1. EMS. Diluciones de trabajo.

Volumen Total (10 ml)	
[‰ EMS]	EMS (µl)
1	10
2	20
3	30
4	40
5	50
7,5	75
10	100
12,5	125
15	150
17,5	175
20	200

Luego, se incorporaron las muestras de semillas a cada Erlenmayer y los mismos fueron dispuestos en agitación constante a 120 rpm, en un agitador orbital (SONTEC), en oscuridad y a temperatura ambiente

(25±2 °C). Pasadas las 16 h, los tratamientos que se encontraban en agitación en agua (con tratamiento previo) fueron filtrados y llevados a agitación por las 2 h restantes con las concentraciones de EMS establecidas.

Transcurrido el tiempo de inmersión, las semillas fueron lavadas 5 veces con agua bidestilada utilizando una malla metálica de trama fina y secadas con papel de filtro. Todo el procedimiento se realizó bajo estrictas normas de seguridad utilizando guantes y trabajando bajo campana.

Posteriormente, las muestras fueron subdivididas y sembradas en macetas de barro de 6 cm de diámetro (30 semillas por maceta; 10 macetas por tratamiento), conteniendo un sustrato de tierra:vermiculita (3:1). Las macetas fueron mantenidas bajo condiciones ambientales semicontroladas, en el invernáculo, con un fotoperiodo de 16 horas de luz, a una temperatura promedio de 25±5 °C.

Al mes de la siembra se contabilizó el número de semillas germinadas y se lo expresó como porcentaje para cada tratamiento. Los resultados fueron evaluados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y luego se llevó a cabo la comparación de medias de los tratamientos mediante el test de Tukey a un nivel de significancia del 5%. Para la variable porcentaje de germinación, cuyos datos no se distribuyeron de forma normal, previo al análisis se realizó la transformación según:

$$\sin^{-1} \sqrt{\frac{p}{100}}$$

Ecuación 4.1

siendo p: porcentaje de germinación (%)

En segundo término, se ajustó una curva de regresión del porcentaje de germinación en función de la dosis empleada y se calculó matemáticamente la DL₅₀.

4.2.1.2. Evaluación de la M1 y M2.

En segunda instancia, con el objetivo de determinar que tratamiento produce la mayor presencia (frecuencia) de mutaciones clorofílicas en la M1 y M2 y mayor fertilidad de las plantas M1, se realizó otro ensayo repitiendo los tres tratamientos cercanos a la DL_{50} estimada a partir de los ensayos anteriores.

Para esto se sembraron 50 macetas (30 semillas por maceta) por tratamiento bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Se calculó el porcentaje de germinación y la supervivencia (número de plántulas que llegaron a madurez), al igual que se registró el número de plántulas con estrías foliares por tratamiento.

Luego, de cada planta M1 adulta se cosechó hasta 2 panojas (semillas M2) de forma individual, y a una muestra de 25-50 panojas se les evaluó el peso, número de espiguillas y número de espiguillas llenas y vacías como indicador de la fertilidad.

Por último, con todas las semillas M2 de cada tratamiento se formó un *bulk* a partir del cual, aproximadamente 1000 semillas fueron sembradas, dentro de los 6 a 12 meses desde la cosecha. Se registró nuevamente la presencia de mutaciones clorofílicas (albina, viridis, xantha, otras) según Gustafson (1940) en las plántulas obtenidas. Los datos fueron expresados en frecuencia.

La eficiencia del tratamiento mutagénico fue estimada como la proporción de mutaciones clorofílicas (M) medida sobre el total de plantas M2 en relación a la frecuencia de efectos indeseables, como letalidad (L) o nivel de daño de las plantas M1 (Eficiencia = M/L).

4.2.2. Mutagénesis física (Rayos x)

4.2.2.1. Determinación de la DL₅₀

- *Materiales*

Ver 4.2.1.

- *Diseño experimental*

Para la determinación de la DL₅₀ se diseñó un experimento multifactorial con dos factores: nivel de radiación y remojo previo en agua (si/no) durante 16 h.

El primer factor incluyó 4 tratamientos más un tratamiento control en dosis crecientes de radiación (0, 48, 96, 240 y 480 Gy) (1 kR \cong 10 Gy). Para alcanzar los niveles de radiación propuestos (dosis) se calcularon los tiempos de exposición de las semillas para las condiciones de uso del equipo.

Los ensayos se realizaron con un equipo Philips MG 160 Constant Potential X-Ray System con el Minus H.T. Generator Type 160 kV / 4 kW³. El dispositivo está calibrado para que en las condiciones de uso habitual, 120 kV y 15 mA, se obtengan diferentes tasas de radiación según la distancia del material a irradiar (blanco) a la fuente. Como se desprende de la tabla 4.2, a mayor distancia al blanco se necesita mayor tiempo de exposición para generar igual dosis. La elección de la distancia depende del

³ Los dispositivos de regulación del equipo son: el *marcador de kilovoltaje pico* (kVp), que regula la corriente de alto voltaje, la cual a su vez regula la velocidad de los electrones que viajan desde el filamento de tungsteno hasta el blanco del tubo; el *marcador de miliamperaje* (mA), que determina la cantidad de rayos x que se producen durante las exposiciones al controlar la temperatura del filamento de tungsteno, y el *determinador de tiempo*, que regula el tiempo en el cual el alto voltaje pasará a través del tubo de rayos x.

tamaño de la muestra o diámetro de la placa ubicada en forma perpendicular a los rayos incidentes dentro del cono de irradiancia:

Tabla 4.2. Tasas de radiación según la distancia desde la fuente al blanco.

Distancia (cm)	R/s
29,0	67,8
40,9	31,6
59,0	13,6
77,0	7,6
95,5	4,4
113,2	2,4
130,3	1,6

Condiciones de uso del equipo 120 kV y 15 mA.

En los ensayos realizados el blanco se ubicó a una distancia de 29 cm correspondiente con una superficie perpendicular de 18 cm de diámetro.

El tiempo de irradiación en cada tratamiento fue calculado de acuerdo a la dosis a aplicar considerando una tasa de 67,8 R/s.

Tabla 4.3. Tiempo de exposición a los rayos x según la dosis absorbida a 29 cm de la fuente.

Gy	kR	R	tiempo exposición
48	5	5000	01' 14"
96	10	10000	02' 27"
240	25	25000	06' 09"
480	50	50000	12' 17"
960	100	100000	24' 35"

Se dispusieron 300 semillas por placa de Petri. Y luego de ser irradiadas se conservaron en sobres en la heladera hasta su siembra.

Posteriormente, las muestras fueron subdivididas y sembradas en macetas de barro de 6 cm de diámetro (30 semillas por maceta, 10 macetas por tratamiento), conteniendo un sustrato de tierra:vermiculita (3:1). Las macetas fueron llevadas al invernáculo y mantenidas bajo condiciones ambientales semicontroladas, con un fotoperiodo de 16 horas de luz, a 25 ± 5 °C.

Al mes de la siembra se contabilizó el número de semillas germinadas en la M1 y se lo expresó en porcentaje. El ensayo siguió un diseño completamente aleatorizado (DCA) y se repitió tres veces. Se realizó el mismo análisis estadístico que para los ensayos con EMS. (Ver 4.2.1).

4.2.2.2. Evaluación de la supervivencia en la M1

A partir de los resultados de daño obtenidos en la sección 4.2.3 se repitió el ensayo siguiendo la misma metodología pero utilizando un menor rango de dosis absorbida: 0, 40, 60, 80, 100 y 120 Gy, y semillas prehidratadas (remojo de 16 h). En el mismo se registró la reducción en la supervivencia (o letalidad) de las plántulas con respecto al tratamiento control.

4.2.2.3. Evaluación morfológica de las plántulas M1 *in vitro* y observación de mutaciones clorofílicas en la M1 y M2

Se repitió el ensayo aplicando las tres dosis más cercanas a la que produjo la reducción del 50% de la supervivencia (DL₅₀). Luego se realizó una desinfección y se sembraron 400 semillas en placas de Petri (25 semillas por placa) conteniendo un medio semisólido, compuesto por MS con 30 g/l de sacarosa y 7% de agar.

A las plántulas se les midió la altura del tallo y el largo de la raíz a los 7 días de germinadas. Se graficaron las variables con sus desvíos estándar y se estimó la reducción en el crecimiento con respecto al control.

Del mismo modo, una parte de las semillas tratadas fueron sembradas en 50 macetas por tratamiento (30 semillas por maceta) donde se registró la presencia de mutaciones clorofílicas en las plantas de la M1. De igual forma se evaluó la M2 para lo cual se sembraron 1000 semillas

aprox. proveniente de un *bulk* de panojas M1 cosechadas de cada tratamiento. Los datos fueron expresados en frecuencia.

Para finalizar se calculó la eficiencia de los tratamientos.

4.3. Resultados

4.3.1. Mutagénesis química con EMS

Como primer criterio para determinar una dosis de trabajo con EMS se analizó el efecto de la dosis y la duración del tratamiento sobre la germinación de semillas de *P. maximum* cv. Gatton. El análisis de variancia de la variable para los tratamientos demostró interacción entre los factores ($p < 0,05$). Sin embargo, cuando los ensayos fueron analizados en forma independiente, los tratamientos donde las semillas fueron expuestas al EMS durante 18 h evidenciaron una disminución en el poder germinativo en relación directa al aumento de la concentración de EMS ($p < 0,05$), mientras que las semillas que fueron sometidas a un remojo previo en agua (16 h en agua y 2 h en EMS) no vieron afectado su poder germinativo, dado que los tratamientos no presentaron diferencias significativas con respecto al control ($p = 0,7591$) (Figura 4.4 y 4.5). Teniendo en cuenta tales efectos se decidió continuar con los análisis utilizando semillas sin remojo previo.



Figura 4.4: Ensayo de mutagénesis química sobre semillas de *P. maximum* cv. Gatton. Efecto de tratamientos con dosis creciente de EMS (0; 1; 2; 3; 4; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 y 20‰) durante 18 h (sin remojo previo en agua) a 35 días de la siembra.

Para introducir una aproximación a la dosis óptima de trabajo, a partir de los datos de germinación se ajustó una curva de regresión lineal que permitió estimar la DL_{50} . Así, se determinó que con una concentración de 5,6‰ se obtiene un 50% de germinación con respecto al control ($PG(\%)=25,55-2,03 \times EMS[\text{‰}]$) ($R^2=0,68$). Del análisis se excluyeron los 3 últimos tratamientos donde la germinación fue nula. De igual modo, gráficamente se determinó que entre un 3-5‰ de concentración de EMS se reduce en un 50% la germinación con respecto al tratamiento control.

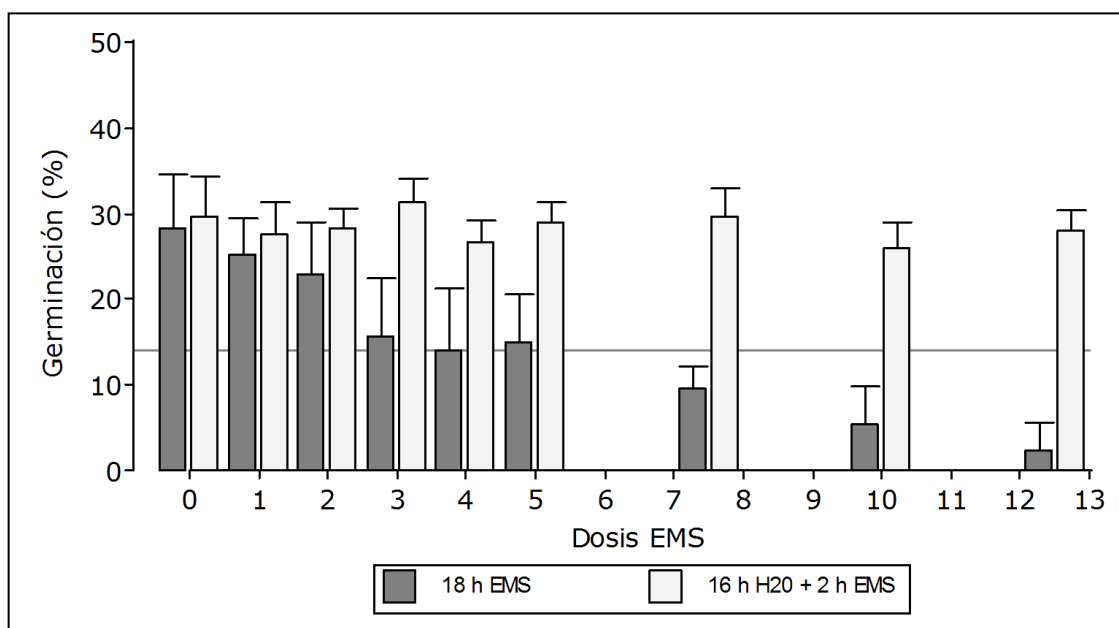


Figura 4.5. Germinación de semillas de *P. maximum* cv. Gatton tratadas con EMS (0; 1; 2; 3; 4; 5; 7,5; 10 y 12,5‰), con y sin remojo previo en agua. *Lineal de corte: 50% germinación. Media \pm desvío estándar.*

Asimismo, como las medias de tales tratamientos poseían valores de germinación cercanos y no diferían según Tukey al 5% de significancia (Figura 4.5), se decidió realizar un nuevo ensayo ampliando el número de semillas tratadas para cada dosis y, de este modo, poder evaluar las plantas obtenidas en cuanto a su supervivencia y la fertilidad en la M1 y la presencia de variaciones clorofílicas en la M1 y M2.

De esta manera, la proporción de plántulas que llegaron a estado adulto y produjeron panoja con respecto al control (100%) registró un 54,4; 48,1 y 40,2% para los tratamientos 3, 4 y 5‰ EMS, respectivamente. Este valor involucró tanto los efectos detrimentales del mutágeno sobre la germinación como la letalidad generada al estado de plántula (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Porcentaje de daño en la germinación, plántula y total con respecto al control para los tratamientos con 3, 4 y 5‰ EMS. Eficiencia del mutágeno para cada tratamiento (=frecuencia de mutaciones en M2/daño total en la M1)

EMS (‰)	Reducción en la germinación (%)	Letalidad en plántula (%)	Daño total (%)	Eficiencia
3	44,9	0,7	45,6	0,083
4	49,3	2,6	51,9	0,081
5	54,2	5,6	59,8	0,077

n=1500 semillas sembradas

En la M1 se contabilizó el número de casos que presentaron variaciones clorofílicas (estrías) sobre el total de plantas analizadas. No se refirió al número de semillas sembradas porque de esta manera se independizó del bajo porcentaje de germinación y de la letalidad en postemergencia. De los registros se desprende que a mayor concentración de EMS se observó mayor número de plantas con presencia de estrías (Tabla 4.5). Entre ellas, las observadas con mayor frecuencia fueron las que poseían estrías de coloración blanco-amarillenta, y en menor proporción estrías verde claro y antociánicas. Cuando se analizó la M2, el porcentaje de casos observados fue mayor para todos los tratamientos (Tabla 4.6; Figuras 4.6 a y b). En la M1 ningún tratamiento produjo una mutante sólida y estable, ni tampoco se observaron plántulas con variaciones clorofílicas en el tratamiento control.

Tabla 4.5. N° y % de variantes clorofílicas en la M1 y M2 para los tratamientos con 3, 4 y 5‰ EMS (18 h) sin remojo previo en agua.

	E M S [‰]			Control
	3	4	5	
M1	4(1,7) ^a	5(2,4)	7(4)	0
	(234) ^b	(207)	(173)	(430)
M2	34(3,8) ^a	37(4,2)	36(4,6)	0
	(895) ^b	(883)	(787)	(907)
	(305) ^c	(287)	(273)	(300)

^a Frecuencia (%)

^b Número de plantas analizadas.

^c Número de panojas que conformaron el *bulk*

Tabla 4.6. Espectro de variantes clorofílicas contabilizadas en la M2.

E M S [‰]	M2			
	albina	viridis	xantha	striata
3	22	11	0	1
4	30	6	1	0
5	28	5	3	0



Figura 4.6. Variaciones clorofílicas **a.** estría *albina* en el borde de la 1^a, 2^a y 3^a hoja de la M1 tratada con 3‰ EMS (18 h) sin remojo previo. **b.** Plántula albina en la M2 del tratamiento 5‰ EMS (18 h).

Antes de analizar la progenie de la M1, se realizó un análisis de la producción de semillas de las panojas, como estimador de la fertilidad de las mismas. De los datos evaluados se pudo observar que el tratamiento con 5‰ EMS produjo, principalmente, un menor número de espiguillas llenas por panoja (semisterilidad) lo que explicaría la tendencia a poseer un menor peso de la panoja. Del mismo modo, los mayores coeficientes de variación son explicados por la presencia de datos extremos, ya que en la muestra se observaron panojas donde no se produjeron semillas (esterilidad). Por otro lado, el tratamiento con 4‰ EMS también evidenció menor peso de la panoja pero esto se explicaría por problemas en el llenado (Tabla 4.7). El tratamiento con 3‰ EMS presentó mejores valores en todos los parámetros.

Tabla 4.7. Efecto de la dosis de EMS en la producción de semillas de las M1.

Tratamiento [‰ EMS]	n°espiguillas/panoja	Peso panoja (g)*	n° espiguillas vacías	n° espiguillas llenas
3	231,1 ± 128,64 CV= 55,66	0,109 ± 0,056 CV= 51,681	123,9 ± 85,83 CV= 69,27	107,2 ± 54,01 CV= 50,38
4	230,5 ± 128,9 CV= 55,92	0,085 ± 0,045 CV= 53,097	125,4 ± 87,4 CV= 69,7	105,1 ± 52,71 CV= 50,15
5	213,8 ± 124,41 CV= 58,19	0,067 ± 0,05 CV= 73,967	125,1 ± 81,9 CV= 65,47	88,7 ± 48,51 CV= 54,69

*Media ± desv.est. de 25 panojas/tratamiento. *Media ± desv.est. de 50 panojas/tratamiento*

Por último, a partir de la frecuencia de mutaciones clorofílicas (M) observadas sobre el total de las plantas M2 (mutaciones germinales) y la frecuencia de daño (L) cuantificado en la M1 (merma en la germinación + letalidad de plántulas) se calculó una eficiencia (Eficiencia = M/L) de 0,083; 0,081 y 0,077 para los tratamientos de inmersión de semillas en una solución de 3, 4 y 5‰ EMS durante 18 horas, respectivamente (Tabla 4.4).

De esta manera, se concluyó que para la obtención de variabilidad por mutagénesis química bajo estas condiciones de trabajo es más eficiente utilizar una concentración de 3‰ EMS.

4.3.2. Mutagénesis física con rayos X

Como primer criterio para determinar una dosis de trabajo con rayos x sobre semillas de *P. maximum* cv. Gatton se evaluó la germinación a diferentes dosis y pretratamientos. En los primeros ensayos se demostró que no había efecto de la dosis sobre la germinación ($p=0,3370$), ni diferencias utilizando la semilla seca o la semilla prehidratada en agua durante 16 h ($p=0,1332$). Sin embargo, aunque no significativa, se observó una tendencia a la mejora de los niveles de germinación en las menores dosis utilizando semillas prehidratadas, al igual que una reducción en la mayor dosis ($p<0,0764$) (Figura 4.7). Debido a esta mayor radiosensibilidad se decidió continuar los análisis con este pretratamiento.

Al analizar visualmente las plántulas emergidas en la M1 se observaron los efectos de las dosis a partir de los 48 Gy, principalmente, como variaciones morfológicas y, en menor medida, por la presencia de estrías en las hojas. En las dosis mayores a 240 Gy el nivel de daño morfológico observable fue muy notorio afectando el desarrollo de los macollos y de la planta adulta. Entre ellos: hojas jaspeadas o bífidas, de menor longitud o ancho de la lámina, hojas filiformes, enrulamientos, con bordes irregulares y necróticos (Figura 4.8). Debido a esta causa, se decidió repetir el ensayo utilizando un rango de dosis más bajas aplicadas a semillas prehumedecidas.

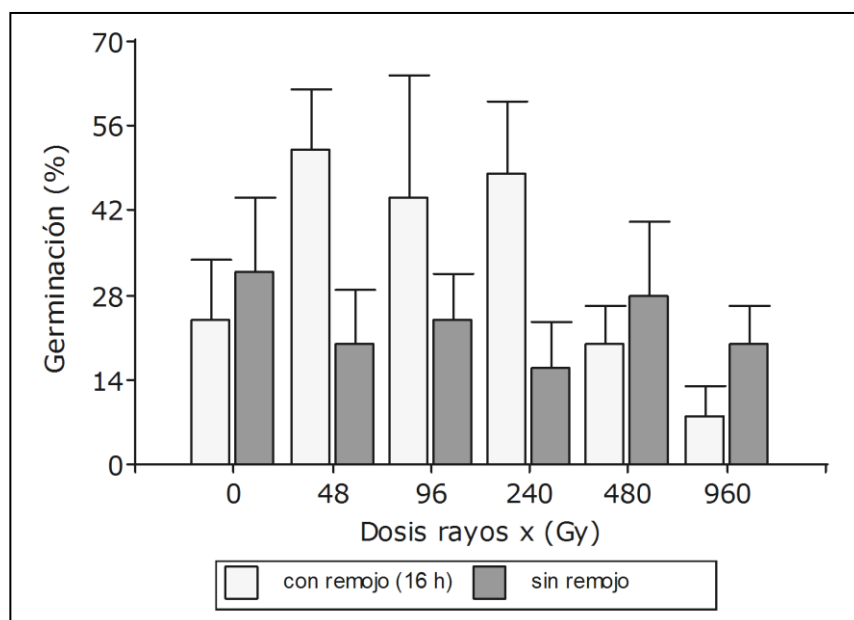


Figura 4.7. Efecto de la dosis de rayos x sobre la germinación de semillas de *P. maximum* cv. Gatton. Las muestras fueron tratadas con 0, 48, 96, 240, 480 y 960 Gy, con y sin remojo previo en H₂O durante 16 h. Barras representan el error estándar de tres repeticiones.

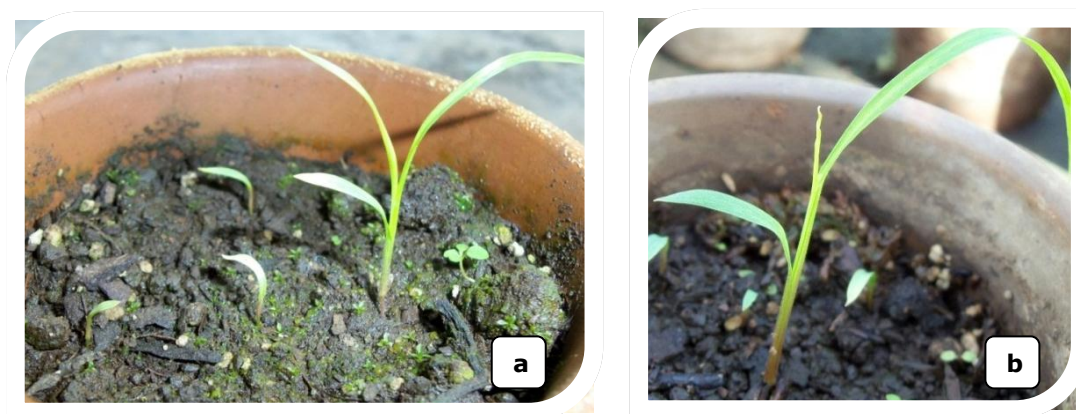


Figura 4.8. Daño en la 1ª hoja (a) y enrollamiento de 3ª hoja (b) de plántulas M1 tratadas con 240 Gy con remojo previo en H₂O.

El análisis de la variancia del nuevo ensayo evidenció una disminución en el porcentaje de plantas que llegaron a la madurez (supervivencia) con respecto al control en relación directa al aumento de la dosis ($p < 0,05$) (Figura 4.9); mientras que las semillas tratadas no vieron afectado su poder germinativo ($p = 0,7591$).

Si bien la mayor dosis no llegó a producir un 50% de letalidad (DL_{50}) (dosis recomendada de uso) se decidió realizar un análisis morfológico de nuevas plántulas obtenidas a partir de las semillas tratadas con las 3 dosis más altas (80, 100 y 120 Gy) y sembradas *in vitro*. Los resultados demostraron que a mayor dosis de rayos x se afectó el crecimiento, principalmente observado en la altura de las plántulas. A 120 Gy se redujo un 47,6% el largo de la raíz y un 55% la altura del tallo con respecto al control (Figura 4.10).

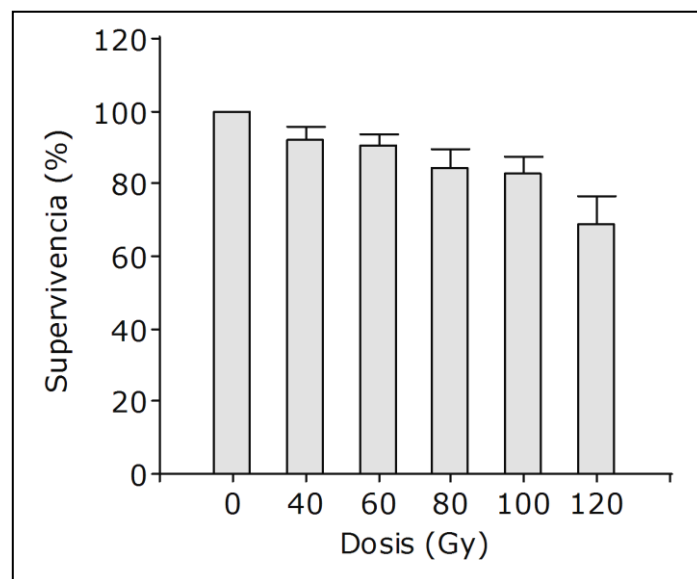


Figura 4.9. Efecto de la dosis de rayos x sobre la supervivencia de plántulas obtenidas a partir de semillas prehumedecidas de *P. maximum* cv. Gatton. Barras representan el error estándar de tres repeticiones.

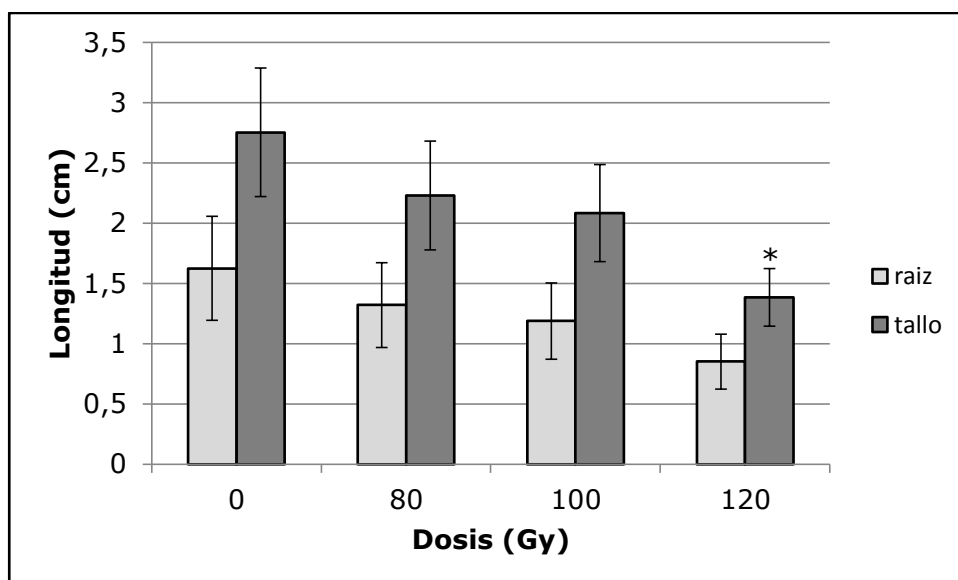


Figura 4.10. Longitud de la raíz y altura del tallo de plántulas M1 obtenidas a partir de semillas tratadas con 80, 100 y 120 Gy a los 7 días de la siembra en medio MS. *Media ± desvío estándar. n = 60, 55, 47, 49, respectivamente. *diferencias significativas al control según Tukey al 5%.*

Cuando se realizó el análisis de las variantes clorofílicas obtenidas en la M1 sobre los mismos tratamientos se observó mayor efecto a mayor dosis aplicada. Sin embargo, cuando se analizaron las frecuencias obtenidas en la M2 se registraron valores muy por debajo de los alcanzados en la generación anterior (Tabla 4.8 y 4.9. Figura 4.11). La fertilidad de las panojas provenientes de las plantas M1 no fue analizada.

Tabla 4.8. N° de variantes M1 y M2 para los tratamientos con 80, 100, 120 Gy con remojo previo en agua.

	Rayos x (Gy)			Control
	80	100	120	
M1	12(5,6) ^a (213) ^b	13(6,3) (208)	12(6,9) (173)	0 (220)
M2	9(1) (895) ^b (267) ^c	11(1,3) (883) (254)	26(2,9) (882) (207)	0 (907) (300)

^a frecuencia

^b número de plantas analizadas.

^c número de panojas que conformaron el *bulk*

Tabla 4.9. Espectro de variantes clorofílicas contabilizadas en la M2

Rayos x (Gy)	M2			
	albina	viridis	xantha	striata
80	7	2	0	0
100	6	4	1	0
120	15	7	3	1

**Figura 4.11.** Estrías en hojas (a) y plántulas albinas (b) presentes en la M2 tratadas con 120 y 80 Gy con remojo previo en H₂O (16 h).

Por último, con los datos obtenidos sobre la reducción del crecimiento con respecto al control y la frecuencia de mutaciones clorofílicas obtenidas en la M2 se calculó el coeficiente de eficiencia para cada tratamiento. De este modo, se encontró que a una dosis de 120 Gy se reduce el tamaño de las plántulas en un 49,7% correspondiente con el tratamiento de mayor eficiencia (0,0584) (Tabla 4.10)

Tabla 4.10. Reducción en la altura del tallo con respecto al control en plántulas M1 tratadas con 80, 100 y 120 Gy. Frecuencia de variaciones clorofílicas en la M2 y eficiencia del mutágeno para cada tratamiento.

Rayos x (Gy)	Reducción en la altura del tallo (%)	Mutaciones M2 (%)	Eficiencia
80	19	1	0,0526
100	24,3	1,3	0,0535
120	49,7	2,9	0,0584

En resumen, si se analizan las mutaciones obtenidas por ambos métodos podemos afirmar que los tratamientos con EMS poseen mayor eficiencia que los tratamientos con rayos x (0,0830 vs. 0,0584). Estos últimos, si bien producen una mayor proporción de mutaciones clorofílicas en la M1, registran una frecuencia considerablemente menor en la M2. Asimismo, en este estudio se observó que ambos agentes generaron un espectro similar de variaciones clorofílicas. Cabe mencionar que, en este trabajo, si bien se observaron variaciones morfológicas generadas por ambos agentes y, en mayor medida, por los rayos x, éstas no fueron registradas y analizadas con fines agronómicos o de mejoramiento.

4.4. Discusión

En 1973, Burton y colaboradores, evaluando la factibilidad del mejoramiento clásico de *Panicum maximum* sugirieron que ante la falta de variabilidad para algún carácter se podía recurrir a otras técnicas de mejoramiento como la mutagénesis.

Con este fin, en esta tesis doctoral se ajustó un protocolo de mutagénesis a través de agentes químicos (EMS) y físicos (rayos x) sobre semillas del cultivar comercial Gatton de *P. maximum* bajo diferentes condiciones.

Para comenzar, debemos referirnos a las variables utilizadas como criterio para establecer la dosis óptima o crítica de trabajo. En el estudio se recurrió, inicialmente, a la determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀), dosis que genera una letalidad del 50% de los individuos, ya sea afectando directamente la germinación de las semillas (EMS) o durante el establecimiento de las plántulas hasta llegar al estado adulto (rayos x).

En este sentido, si bien Cherney y colaboradores (1991) y Maluszynski y colaboradores (2009) sugieren la determinación de la DL₅₀ en base a la germinación y/o emergencia, Prina (1993) discrepa, ya que observó que la aplicación de rayos x no afectó la germinación de *Hordeum vulgare*, al igual que los químicos solo la retrasaron, concluyendo que la reducción en la variable no expresaría fehacientemente el daño generado por el agente.

En línea con estos últimos resultados, en los ensayos de rayos x realizados se observó que los porcentajes de germinación de las semillas se comportaron de forma independiente a la dosis aplicada dentro de los límites empleados (Figura 4.5). Incluso en los tratamientos donde se

aplicaron mayores dosis, y que vieron afectada la supervivencia y el desarrollo de las plántulas, la germinación mostró valores cercanos a lo normal.

En coincidencia, Steuckardt (1960), trabajando con rayos x sobre una línea de *Panicum miliaceum* L. tampoco registró una baja en la germinación sino un leve retraso, y observó que muchas plantas no desarrollaron y otras mostraron anomalías en el crecimiento, efectos similares a los registrados en esta tesis.

Este resultado sería explicable ya que en el embrión de la semilla se encuentran primordios foliares preformados que no verían afectado su desarrollo por la radiación puesto que la primera fase de la germinación sólo implica una hidratación y elongación del coleoptilo. Daños en el embrión debido a dosis muy altas de radiación no se harían evidentes hasta que las plántulas se manifestaran incapaces de formar las hojas verdaderas.

Del mismo modo, Ambavane y colaboradores (2015), luego de aplicar rayos gamma a semillas secas de *Eleusine coracana* L. observaron que, en el test de laboratorio, la germinación tampoco presentó un patrón definido con respecto a la dosis; sin embargo, a campo, la misma se redujo en forma proporcional al aumento de la exposición. En referencia a esto último, Steuckardt (1960) registró que las tasas de supervivencia y fertilidad a campo se redujeron aún más que lo observado en el invernáculo, lo que indicaría que no siempre los valores obtenidos en condiciones controladas serían del todo extrapolables.

En cuanto a los mutágenos químicos, las semillas tratadas con concentraciones crecientes de EMS durante 18 h sí manifestaron una reducción en la germinación (Figura 4.7), de modo que, a partir de tales

valores se pudo estimar gráfica y estadísticamente la dosis que redujo un 50% la germinación con respecto al control (5 y 5,6‰ EMS, respectivamente). Del mismo modo, Perez Colomba (2011) trabajando en *Cenchrus ciliaris* determinó mediante una relación lineal una DL_{50} de 5,5 mM ($\approx 0,5‰$) EMS en semillas tratadas durante 23 hs sin remojo previo en agua. Si bien en ambos casos se ajustó una curva de regresión lineal de la germinación en función de la concentración de EMS, según Prina (1993) esto sería erróneo ya que observó que los efectos del EMS sobre el crecimiento de *Hordeum vulgare* se describen en forma exponencial. De todos modos, a los fines de este estudio el valor inicialmente calculado fue de carácter netamente orientativo.

En esta línea, el autor sugiere y agrega que, si bien mediante esta metodología se aproxima a la dosis óptima de trabajo, se deberían evaluar otras variables, como la reducción en la altura de las plántulas a los 7-14 días, o el largo de la primer hoja o vaina, ya que se trata de zonas de activo crecimiento donde el daño fisiológico es más notable. Además, tales variables correlacionan bien con la supervivencia (inversa de la letalidad) de las plántulas, la frecuencia de mutaciones en la M1 y la fertilidad de la planta adulta, acelerando los tiempos de selección (Brunner, 1995).

En los ensayos para esta tesis se analizaron tales variables observando que la supervivencia de las plántulas disminuyó con respecto al control a medida que aumentó la dosis, principalmente para la aplicación de rayos x sobre semillas prehumedecidas (Figura 4.9). Del mismo modo, se observó que a mayores dosis de rayos se redujo el crecimiento del tallo y la raíz (Figura 4.10), mientras que a mayores concentraciones de EMS aumentó la esterilidad de las panojas (Tabla 4.7). Es probable que estas

variables se vieran afectadas en forma similar en semillas tratadas con cada agente, sin embargo en esta investigación las mismas no fueron medidas en ambos sistemas por igual.

Otro factor de importancia a evaluar en el ajuste de un protocolo de mutagénesis es el efecto del pretratamiento (hidratación) de las semillas, especialmente, para los tratamientos con mutágenos químicos.

En primer lugar, este cumpliría la función de llevar a la semilla al plateau de la curva de imbibición, momento en el cual se debería aplicar el químico para su mejor captación o difusión al interior de la semilla. Así, la duración del remojo previo en agua de las semillas dependería de la biología de la germinación de cada especie en particular. En la cebada y otros cereales, por ejemplo, se aplica 8-10 horas de remojo previo a temperatura ambiente (20-24 °C) (Prina, 1993; Maluszynski *et al.*, 2009). Fladung (1991), en sus estudios de mutagénesis en *P. maximum* realizó un remojo de 12 h en agua previo a los tratamientos con EMS. Sin embargo, en los ensayos de esta tesis se utilizó un remojo previo de 16 h en agua (+ 2 h EMS) con el fin de compensar el tiempo de imbibición de las semillas de los tratamientos previo a la siembra. Probablemente, la mayor duración del pretratamiento o la corta duración del tratamiento con el mutágeno minimizó su efecto sobre la germinación (Figura 4.7), a diferencia de lo observado en los tratamientos sin prehidratación; o bien, el resultado se correspondió con el comportamiento propio de la variable, en concordancia con lo observado por Prina (1993) comentado anteriormente.

En segundo lugar, la hidratación de las semillas también serviría para estimular la síntesis de ADN en el tejido meristemático del embrión. De este modo, el pretratamiento le otorgaría mayor sensibilidad y posibilitaría

que mediante tratamientos relativamente suaves se pudiera alcanzar una frecuencia de mutación máxima con el mínimo daño fisiológico (Prina, 1993). Por el contrario, Brunner (1995) considera que esto es contraproducente ya que, al activarse el metabolismo celular, las células iniciales pierden su sincronía y se ubican en diferentes fases del ciclo de división mitótica, por lo que la metodología pierde repetibilidad. En esta investigación se priorizó tal característica observando que la concentración de 3‰ EMS sobre semillas sin pretratamiento generó una mayor frecuencia de mutaciones con menores niveles de daño (mayor eficiencia) (Tabla 4.4). Y se dejó de lado el ensayo que utilizó semillas prehidratadas.

En el caso de la mutagénesis física, por lo general, los tratamientos de rayos x se aplican en semillas que deberían poseer entre un 12 - 14% de humedad para controlar el daño. Esto es así porque a mayores contenidos de humedad la molécula de agua reacciona con la radiación generando radicales libres altamente reactivos que pueden producir cambios químicos posteriores aditivos al efecto de la radiación.

Por otro lado, la imbibición de los tejidos modifica la cantidad de radiación absorbida *per se*, por lo tanto tiene la ventaja de afectar en forma similar utilizando dosis más bajas. De igual modo, la prehidratación de las semillas genera un considerable debilitamiento de las cubiertas que imponen algún tipo de resistencia, lo que también aumentaría su radiosensibilidad. Por último, suele recurrirse a la prehidratación en especies que poseen altos contenidos de aceites en la semilla, característica que también las torna poco radiosensibles (Martínez, comunicación personal). En esta investigación se observó una mayor variación en la germinación de los tratamientos de rayos x sobre semillas prehumedecidas,

registrándose una tendencia a la mejora (probable quiebre de la dormición) a bajas dosis (Figura 4.7).

A su vez, cabe recordar que, al ajustar un protocolo de mutagénesis, la concentración del agente mutagénico a emplear debe ser considerada junto con la duración del tratamiento. En cebada y en trigo, por ejemplo, las frecuencias máximas se obtienen cuando se aplica una concentración de 0,2-25‰ EMS durante 8-20 horas (Maluszynski *et al.*, 2009). En este estudio, el tratamiento con remojo previo en agua (16 h) e inmersión en EMS durante solo 2 h no fue efectivo sobre la germinación y desconocemos si hubiera generado mayor frecuencia de mutaciones germinales que el tratamiento sobre semilla seca con 3‰ EMS durante 18 h. Las únicas referencias que se encuentran sobre mutagenesis de *P. maximum* utilizando etilmetanosulfonato (EMS) pertenecen a los estudios de Fladung y colaboradores (1991) quienes utilizaron tratamientos de 14 h, incluso a una concentración más baja (1‰ EMS). Es de esperar que bajo tal tratamiento la germinación tampoco se vea afectada.

Las dosis de rayos x o gamma que se han utilizado para los cereales en general se encuentran en el rango de los 100 a los 600 Gy. Sin embargo, en esta tesis se registró que el cultivar en estudio bajo las condiciones de tratamiento tuvo una alta sensibilidad a la radiación en comparación con otras especies gramíneas y cereales.

Como antecedentes dentro del género, Steuckardt (1960), trabajando con rayos x sobre *Panicum miliaceum* L., determinó que la dosis óptima osciló entre 12 y 30 kR (120-300 Gy), valores levemente por encima de los resultados descritos en esta tesis; mientras que Shivashankar y colaboradores (1988), aplicando rayos gamma a semillas de *Panicum*

maximum var. *trichoglume* ajustaron una dosis de 40 kR. A su vez, Steuckardt (1960) observó una reducción en la altura de las plántulas y en la fertilidad aproximadamente proporcional a la dosis, efectos observados en esta tesis. Y del mismo modo, Ambavane y colaboradores (2015), en sus estudios de *Eleusine coracana* L. con rayos gamma también observaron una reducción en el crecimiento del tallo y la raíz de las plántulas a los 7 días de la germinación, y en base a esta variable determinaron la DL₅₀ (\approx 500 Gy).

En este sentido, Brunner (1995), indicó que la mayor eficiencia en un tratamiento mutagénico por rayos se obtendría a la dosis que reduce en un 25% la altura de las plántulas recién germinadas; mientras que Maluszynski y colaboradores (2009) sugirieron que una reducción del 30% en la emergencia o crecimiento de las plántulas sería criterio suficiente para utilizar en un programa de mejoramiento. En esta tesis se observó que con 100 Gy se redujo un 24,3% la altura del tallo; sin embargo, con 120 Gy se logró mayor eficiencia (tabla 4.10). Esta mayor radiosensibilidad podría ser otorgada por el pretratamiento en agua de las semillas.

En cambio, algunos autores que investigaron con gramíneas forrajeras arribaron a valores superiores. Es el caso de Krishna y colaboradores (1984), quienes trabajando con *Chloris gayana* determinaron que a 50 kR (\cong 500 Gy) se obtiene la mayor frecuencia de mutaciones y a 60 kR la mayor eficiencia; mientras que, Perez Colomba (2011), en sus estudios en *Cenchrus ciliaris*, determinó una dosis de trabajo cercana a los 40 kR (\cong 400 Gy).

En cuanto a los efectos observados en la M2, en esta tesis se registró un espectro de variantes clorofílicas similar al registrado por Fladung y colaboradores (1991), quienes utilizando EMS aislaron variantes putativas

teniendo en cuenta la morfología y la pigmentación de las plantas como criterios de selección. En efecto, de 119 semillas progenie de una variante variegada obtuvieron 65 plantas albinas, 34 variegadas y 20 viridis.

Los resultados observados con los tratamientos de rayos x, a diferencias de los de EMS, indican un efecto más drástico, no tanto en la generación de variantes clorofílicas sino más bien en la morfología de las hojas. De este modo se observaron plantas más bajas, con hojas más finas y pequeñas, de color verde más oscuro, de aspecto visualmente "jaspeado", de margen ondeado o arrugado, principalmente. Estas características indicarían una variación en el número o distancia entre los distintos tipos de venas que componen la organización de la lámina foliar (dato no estudiado). Aun así, los tratamientos con rayos x produjeron mayor frecuencia de variantes clorofílicas con respecto a los tratamientos con EMS en la M1. En este sentido, Fladung (1993) concluye que en *P. maximum* el establecimiento del sistema vascular está bajo control genético complejo ya que todas las variantes descritas por él interfirieron con la forma, organización y distribución del nervio central, lateral y de las pequeñas venas.

Cabe señalar que Krishna y colaboradores (1984) analizaron la frecuencia de mutaciones que ellos denominan "viables" en la M1 y M2, es decir las variaciones que engloban caracteres morfológicos, arribando a una dosis cercana a la dosis de mayor eficiencia, y demostraron la alta correlación que hay entre la frecuencia de aparición de ambos tipos de mutaciones: morfológicas y clorofílicas, a diferentes dosis de rayos. Es por ello que, en este trabajo, si bien las variaciones morfológicas fueron

observadas, principalmente en los tratamientos de rayos, no se consideraron para determinar la dosis óptima de trabajo.

Otro efecto observado en este trabajo fue la presencia de panojas que no produjeron el cuajado de la semilla (tabla 4.7) y que, probablemente, tampoco hayan sido fecundadas a raíz de problemas morfológicos ocasionados por aberraciones cromosómicas (dato no analizado). En este sentido, Shivashankar y colaboradores (1988), aplicaron rayos gamma a semillas de *P. maximum* var. *trichoglume* y obtuvieron un individuo con la iniciación de la panícula inhibida. En coincidencia, Fladung y colaboradores (1991) utilizando EMS también observaron una mutante de *P. maximum* cuyas flores no poseían carpelo pero sí uno o dos estambres adicionales, lo que le generaba esterilidad. La citogenética, herramienta desarrollada en el capítulo II serviría para dilucidar tales efectos, mediante estudios de la mitosis.

Cabe recordar que la frecuencia de las mutaciones observadas en una especie o incluso en otro cultivar de la misma especie pueden diferir notablemente de otra variedad o especie. Los resultados arribados en este trabajo corresponden al cultivar Gatton de *P. maximum*, por lo que si bien son orientativos, no serían extrapolables completamente a las poblaciones derivadas procedentes del NOA, ni a otros cultivares comerciales, como el Green Panic.

Este trabajo persiguió el objetivo de determinar la dosis óptima a emplear que tuviera mayor eficiencia en la creación de mutantes por lo que no se utilizó un alto número de semillas. Sin embargo, en el mejoramiento posterior de la especie mediante esta técnica se requerirá mayores volúmenes de semillas, no solo por los requerimientos de la técnica per se,

sino por el bajo poder germinativo del cultivar, por lo que los valores de semillas a tratar deberán ser corregidos por este factor (Ver capítulo II). Del mismo modo, las semillas tratadas podrán utilizarse bajo diferentes sistemas de siembra y selección para, por ejemplo, estrés abiótico, incluyendo la selección en tierra, en sistemas hidropónicos (Ver Capítulo V) o *in vitro* (Ver Capítulo III). Asimismo, la detección de variantes podría ser confirmada mediante la técnica de marcadores moleculares SSR (Ver Capítulo VI).

Para finalizar, cabe recordar que en la base de datos de variedades mutantes (MVD) de la IAEA/FAO, que recoge información sobre variedades de plantas mutantes (cultivares) publicadas oficial o comercialmente en todo el mundo, aún no se registran cultivares de *P. maximum*, exceptuando el cultivar Noh PI 1 obtenido por duplicación cromosómica con colchicina (IAEA). Este dato es promisorio para la continuación de nuestros estudios y la aplicación de esta herramienta en los programas de mejoramiento.

4.5. Conclusión

Por medio de los ensayos de mutagénesis química con EMS se pudo arribar a una dosis óptima de trabajo. Si bien en un primer momento se calculó la dosis letal 50 (DL₅₀) para la variable germinación, se demostró que a una dosis menor (inmersión en una solución al 3‰ EMS durante 18 h) se lograba mayor eficiencia. Los ensayos con menores tiempos de exposición al agente no afectaron la germinación.

En cuanto a los ensayos de mutagénesis física con rayos x también se pudo arribar a una dosis óptima de trabajo. El uso de la semilla prehumedecida aumentó su sensibilidad permitiendo manejar dosis de radiación más bajas. Se determinó que la exposición a 120 Gy presentó mayor eficiencia de acuerdo a la reducción en el crecimiento de las plántulas.

Cabe recordar que el diferente tipo y nivel de daño (mutaciones de punto vs. deleciones/rearreglos cromosómicos) generado por ambos agentes no los hace necesariamente excluyentes, sino que podrían ser complementarios. La elección de uso de un método u otro por el mejorador dependerá de las bases genéticas del carácter de interés que requiera incrementar su variabilidad.

4.6. Bibliografía

- Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M. & Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135, 187-204.
- Ambavane, A. R., Sawardekar, S. V., Sawantdesai, S. A., & Gokhale, N. B. (2015). Studies on mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and its effect on quantitative traits in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn) *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 8, 120-125.
- Brunner, H. (1995). Radiation induced mutations for plant selection. *Appl. Radiat. Isot* 46(6/7): 589-594.
- Burton, G. W., Millot, J. C., & Monson, W. G. (1973). Breeding procedures for *Panicum maximum* Jacq. suggested by plant variability and mode of reproduction. *Crop Science* 13(6), 717-720.
- Cherney, J. H., Cherney, D. J. R., Akin, D. E., & Axtell, J. D. (1991). Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Advances in Agronomy* 46, 157-198.
- De Vries, H. (1901-1903). *Die Mutationstheorie, I und II*. Leipzig: Veit & Co.
- Engvild, K. C. (2005). Mutagenesis of the model grass *Brachypodium distachyon* with sodium azide. Risø-R-Report 1510(EN), Risø National Laboratory, Roskilde, Denmark. 8 pp.
- Favret, E. A. (1960a). Spontaneous and induced mutations of barley for the reaction to mildew. *Hereditas*, 46, 20-28.
- (1960b). Somatic mutations of four genes for albinism in barley induced by X-rays and ethyl methanesulfonate. *Hereditas*, 46, 622-634.

- Fladung, M., Bossinger, G., Roeb, G. W. & Salamini, F. (1991). Correlated alterations in leaf and flower morphology and rate of leaf photosynthesis in a midribless (mbl) mutant of *Panicum maximum* Jacq. *Planta*, 184, 356-361.
- Fladung, M. (1994). Genetic variants of *Panicum maximum* (Jacq.) in C4 photosynthetic traits. *J. Plant Physiol.*, 143, 165-172.
- Gustafsson, A. (1940). The mutation system of the chlorophyll apparatus. *Lundas univ. arsskr.*, 36, 1-40.
- Hussin G, Harun, A. R., & Shamsudin, S. (2000). Study on mutagenesis of Signal grass (*Brachiaria decumbens*) by gamma irradiation. INIS/IAEA. 5 pp. Recuperado de http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/32/017/32017978.pdf
- IAEA/FAO. (1977). Manual on Mutation Breeding. 2nd ed. Technical Report Series, No. 119. Vienna, IAEA. 288 p.
- IAEA/FAO. Welcome to the Mutant Variety Database (MVD). Recuperado de <http://mvgs.iaea.org/AboutMutantVarities.aspx>
- Krishna, G., Shivashankar, G. & Nath, J. (1984). Mutagenic response of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth.) to gamma rays. II Studies on second (M2) generation parameters. *Euphytica* 33:517-524
- Li, R., Bruneau A. H., & Qu, R. (2010). Morphological mutants of St. Augustinegrass induced by gamma ray irradiation. *Plant Breeding* 129, 412-416.
- Lopez Colomba, E. (2011). Inducción de variabilidad genética para tolerancia a estreses abióticos mediante técnicas de cultivo *in vitro* en *Cenchrus ciliaris* L. Tesis de Maestría en Biotecnología de Plantas. Universidad Internacional de Andalucía. Huelva, España. 113 pp.

-
- Maluszynski, M., Szarejko, I., Bhatia, C. R., Nichterlein, K., & Lagoda, P. J. L. (2009). Methodologies for generating variability Part 4: Mutation techniques. En S., Ceccarelli, E. P., Guimarães, E., Weltzien (Eds.) *Plant breeding and farmer participation*. (Cap.8. pp. 159-194) Roma, Italia: FAO.
- Mohan Jain, S. (2005). Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82, 113-123.
- Pongtongkam, P., Nilratnisakorn, S., Peyachoknakul, S., Thongpan, A., Aranananth, J., KowitwanichK., & Tudsri, S. (2005). Inducing salt tolerance in purple guinea grass (*Panicum maximum* TD58) via gamma irradiation and tissue culture. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 39, 681-688.
- Pongtongkam, P., Peyachoknagul, S., Manawiboon, D., Aranananth, J., Thongpan, A. & Tudsri, S. (2006). Production of salt tolerant ruzi grass (*Brachiaria ruziziensis*) by tissue culture. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 40, 449 – 455.
- Prina A. (1993). La mutagénesis inducida en el mejoramiento vegetal. *Bol. Genét. Inst. Fitotéc. Castelar.*, 17, 9-22.
- Prina A. (1994). Consideraciones sobre la aplicación eficiente de la mutagénesis inducida en fitomejoramiento. *Mendeliana*, 9(1), 5-49.
- Prina, A., Landau, A., Pacheco, M. G., & Hopp, E. H. (2010). Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginsky. *Bioteconología y mejoramiento vegetal II*. (II-4). (pp. 217-228). Buenos Aires: INTA.

- Saione H., Sacco F., Prina A.R., Franzone P., Antonelli E.F. y D.G. Díaz (1994). Resistencia Genética y mutagénesis en plantas cultivadas. *Mendeliana*, 11(1), 78-81.
- Salleses, L., Pagano, E. M., Rios, R. D. y Prina, A. (2007). Obtención y caracterización de mutantes inducidas de cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.). En XXXVI Congreso Argentino de Genética. Pergamino, Bs As. 23-26/09
- Salleses, L., Biagioli, C., Pagano, E. M., Prina, A. y Ríos, R. D. (2008). Desarrollo de herramientas no convencionales para incrementar la variabilidad genética en cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.). II Jornadas de ciencia y tecnología. Universidad de Morón, Morón, Bs As, 25-30/08.
- Shivashankar, G., Mahishi, D. M., & Kulkarni, R. S (1988). A non-flowering green panic grass (*Panicum maximum* var. *trichoglume*) obtained through gamma irradiation. *Mutation Breeding Newsletter* 32, 9-10.
- Steuckardt, R. (1960). Investigations on the action of X rays on millet (*P. miliaceum* L.) after single and multiple irradiation. I. The mutability after a single irradiation and the relationships between the time of starting selection and its effectiveness. *Zeitschrift für Pflanzenzuchtung* 43, 85-105.

CAPÍTULO V:
ESTRÉS ABIÓTICO - SALINIDAD

V. Estrés abiótico - Salinidad

5.1. Introducción

Uno de los principales problemas que afecta negativamente la producción de biomasa y el rendimiento de los cultivos es el estrés abiótico. Existen diversos factores ambientales que pueden desencadenarlo, como condiciones de salinidad (Ashraf & Harris, 2004; Munns & Tester, 2008), sequía (Farooq *et al.*, 2009), bajas y altas temperaturas (Valluru & Van den Ende, 2008), entre otros.

En la Argentina se registran más de 13 millones de hectáreas caracterizadas por presentar suelos con presencia de sales en el perfil. Así, a nivel internacional el país se ubica tercero, luego de Rusia y Australia, en superficie de suelos afectados por la salinidad. Esta condición se observa particularmente en las zonas áridas y semiáridas, pero no de manera exclusiva ya que existen también en ambientes húmedos (suelos hidrohalmórficos). Entre las regiones más afectadas se encuentran el Chaco semiárido, la depresión del Salado y el noroeste de Buenos Aires (Taleisnik y Lopez Launestein, 2011).

La salinidad del suelo fue definida por Maas y Nieman (1978) simplemente como la presencia de una excesiva concentración de sales solubles en el suelo, que limitan el crecimiento de las plantas.

Todos los suelos fértiles contienen pequeñas cantidades de sales solubles. La concentración de sales de un suelo depende principalmente de la roca madre y de los procesos pedogenéticos que lo originaron. Factores ambientales como ciclos recurrentes de inundación y sequía pueden generar el lavado y posterior ascenso de sales desde las napas. Por otro lado, un

suelo puede salinizarse por causas de origen antrópico, debido a la incorporación de sales con el agua de riego.

Las sales solubles que se encuentran en los suelos en cantidades superiores al 0,1% están formadas principalmente por los cationes Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} asociados con los aniones Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- y HCO_3^- .

El Laboratorio de Salinidad del Suelo del USDA distingue a los suelos afectados como salinos, sódicos y salino-sódicos, en base a tres parámetros: conductividad eléctrica del extracto de saturación (CE_{ext}), porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y pH (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Clasificación de suelos afectados por sales (USDA, 1954).

Tipo de suelo	pH	C.E. (dS/m)	PSI (%)
Normal	6 - 7	<2	<15
Salino	<8,2	>4	<15
Sódico	>8,2	<4	>15
Salino - Sódico	>8,2	>4	>15

CE: Conductividad eléctrica,

PSI: Porcentaje de sodio intercambiable.

En general, el análisis de la CE^4 de los suelos y las aguas de riego permite estimar en forma rápida y casi cuantitativa la concentración de sales que contienen y, de este modo, determinar si se afecta la germinación normal de las semillas, la absorción de agua y/o el crecimiento de las plantas.

De este modo, un suelo es salino si su conductividad eléctrica es igual ó superior a 4 dS/m (Tabla 5.2). Una conductividad de 4 dS/m equivale a una concentración de 40 mM NaCl en la solución del suelo que genera un

⁴ resistencia que ofrece el paso de la corriente eléctrica a través de una solución entre dos electrodos (Conti, M., 2005).

potencial osmótico de 0,2 MPa (Munns & Tester, 2008). Del mismo modo, los investigadores clasificaron a los cultivos según su sensibilidad a la salinidad (Maas & Hoffmann, 1977).

Tabla 5.2. Efectos de la salinidad de los suelos medida a través de su conductividad eléctrica (CE).

Tipo de suelo	Salinidad	C.E. (dS/m)	Efectos
Normales	Muy ligera	0-2	Casi nulos
	Ligera	2-4	Puede afectar a cultivos sensibles
Salinos	Media	4-8	La mayoría de los cultivos son afectados
	Fuerte	8-16	Solo pueden prosperar cultivos tolerantes
	Muy fuerte	> 16	Solo se desarrollan cultivos muy tolerantes

Por otro lado, se define al potencial hídrico (Ψ_h) como la capacidad para realizar un trabajo por unidad de masa y mover esa masa de agua sin solutos desde su estado hasta el de agua libre (Carpena *et al.*, 2005). Al potencial del agua en estado de referencia, es decir agua pura, libre y expuesta a la presión atmosférica, se le asigna un valor de cero (Terrón, 1995). Los factores (componentes) que determinan el potencial del agua son: los solutos disueltos (potencial osmótico, Ψ_o), la adsorción del agua por parte de las partículas del suelo (potencial matricial, Ψ_m), la elevación del agua del suelo en el campo gravitatorio (potencial de gravedad, Ψ_g) y la presión aplicada (potencial de presión, Ψ_p) (Taiz, 2006).

$$\Psi_h = \Psi_o + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m$$

Ecuación 5.1

En general, la respuesta de las plantas a la salinidad es, en un principio, similar a la generada por un déficit hídrico (sequía), ya que las

sales modifican el potencial hídrico del suelo en su componente osmótico, lo que reduce la capacidad de las plantas para absorber agua y provoca una disminución en las tasas de crecimiento (fase 1) (Munns, 2002). Esta respuesta, por lo general, es rápidamente equilibrada o compensada.

Luego, con el incremento de la salinidad por sobre un nivel umbral, dependiente del genotipo, se desencadenarán mecanismos metabólicos de respuesta ante el componente iónico, que harán frente a la toxicidad del medio, o de lo contrario se afectará nuevamente el crecimiento (fase 2) (Figura 5.1).

En este sentido, muchas especies, durante el proceso evolutivo, desarrollaron diferentes mecanismos de carácter adaptativo que les otorgaron esta tolerancia (plantas halófitas). Por un lado, podemos distinguir a las plantas que poseen estrategias orientadas a mantener un gradiente de potencial agua favorable por medio del aumento de volumen (suculencia) o mediante la acumulación de solutos compatibles orgánicos (ajuste osmótico). Por otro lado, están las que poseen estrategias orientadas a mantener bajas las concentraciones citosólicas de Na^+ y disminuir su toxicidad, ya sea mediante el secuestro en la vacuola, la exclusión iónica a nivel radicular, la compartimentalización en los tejidos y órganos, o la secreción de iones por glándulas y vesículas foliares (González *et al.*, 2002).

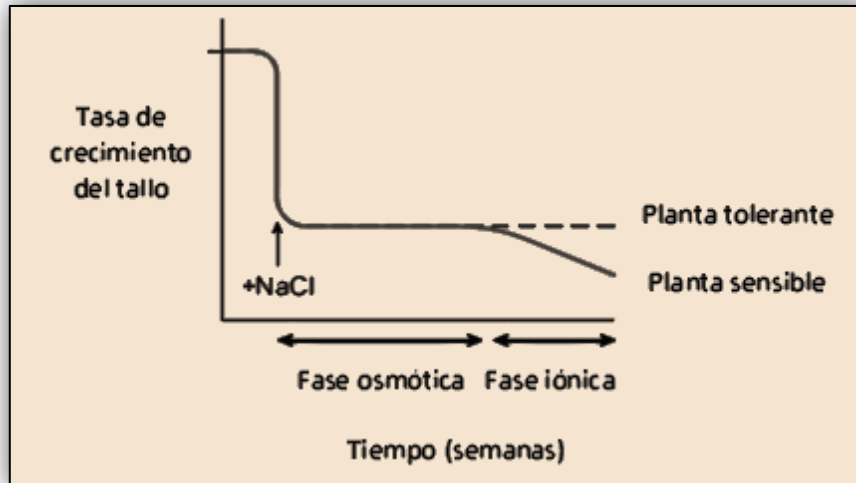


Figura 5.1. Respuesta esquemática del efecto bifásico de la salinidad sobre el crecimiento. Durante la primera fase, el crecimiento de ambos genotipos se reduce abruptamente debido al efecto osmótico de la solución salina alrededor de las raíces. Durante la segunda fase, las hojas del genotipo menos tolerante mueren y se reduce la capacidad fotosintética de la planta disminuyendo el crecimiento (Munns, 2005)

En resumen, la tolerancia a la salinidad es un carácter poligénico, heredable, que involucra respuestas al estrés iónico y osmótico a nivel celular.

Las pasturas cultivadas sobre suelos salinos experimentan condiciones de estrés que afectan los procesos bioquímicos y morfofisiológicos alterando el desarrollo y la producción de biomasa, pero sus efectos varían según la duración e intensidad del estrés y la etapa del ciclo ontogénico durante el cual transcurre. En general, las plantas son más sensibles durante la germinación y la emergencia, etapas clave en la implantación de las pasturas (Taiz & Zeiger, 2004).

Con respecto a la germinación de las semillas cabe recordar que este es un proceso comprendido por tres fases que se superponen parcialmente: primero la absorción de agua por imbibición de la semilla y la activación del metabolismo respiratorio; luego el inicio de la actividad enzimática y la

movilización de las sustancias de reserva, y por último el crecimiento y la división celular que provoca la emergencia de la radícula (Bewley & Black, 1994; Bradford, 1995).

Al comienzo de la imbibición, el ingreso de agua a la semilla (fase I) está determinado por la diferencia de potencial hídrico del interior de la semilla y el medio exterior circundante. Luego, durante la fase II, prácticamente cesa el flujo de agua no siendo necesario lograr altos contenidos hídricos para desencadenar los cambios metabólicos y enzimáticos que ocurren. Por el contrario, para finalizar la germinación con la emergencia de la radícula (fase III) es necesario exceder un valor crítico o umbral de Ψ_h , que permita al embrión generar las fuerzas de presión necesarias para superar las restricciones impuestas por las cubiertas seminales; es decir, que su crecimiento se incremente lo suficiente como para vencer las fuerzas generadas por la cubierta (Bewley, 1997; Koomneef *et al.*, 2002). Si el potencial hídrico del medio es muy bajo, no se alcanza tal punto y la fase II se extiende indefinidamente (Bradford, 1995) (Figura 5.2). Genotipos con un valor crítico más bajo verán menos afectada su germinación.

Cabe aclarar que además del perjuicio que ocasiona la disminución del potencial osmótico del medio sobre la imbibición de la semilla, a determinadas concentraciones de Na^+ se produce un daño por toxicidad en el embrión.

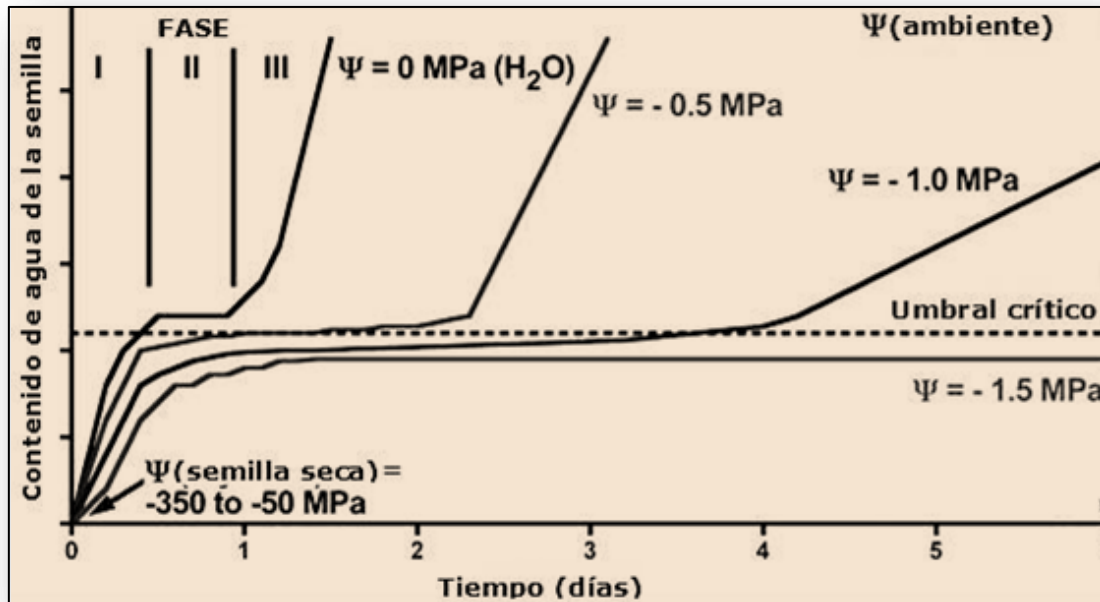


Figura 5.2. Evolución del contenido de agua en semillas durante la imbibición en soluciones con diferentes potenciales hídricos. La línea de puntos indica el nivel umbral de contenido de agua que deben alcanzar para que ocurra la fase III o de protrusión radicular. Tomado de The Seed Biology Place. <http://www.seedbiology.de/water.asp>

Con todo, muchas veces la disminución en la germinación debido a la salinidad de los suelos es agrónomicamente compensada por un aumento en la densidad de siembra logrando una buena implantación de la pastura al primer año. Sin embargo este factor puede afectar su persistencia en años subsiguientes. Es por ello que, también es necesario estudiar los efectos de la salinidad sobre el establecimiento de las plántulas, la fisiología de la planta adulta, los componentes del rendimiento de la planta forrajera y la productividad de la pastura.

Independientemente de la etapa ontogénica a evaluar, todo sistema de selección implicará exponer a los individuos a concentraciones crecientes de salinidad, para luego estimar su tolerancia en función de indicadores o marcadores bioquímicos, fisiológicos o productivos.

Si bien el estudio y/o la selección de nuevos materiales a campo sobre suelos salinos es lo más recomendable, este sistema, en las primeras etapas del mejoramiento, posee la desventaja de requerir muchas repeticiones y no ser reproducible ya que los suelos suelen ser de composición heterogénea (suelos overos o manchoneados). Para estos estudios el sistema más utilizado es el hidropónico que, a grandes rasgos, consta en cultivar sobre un soporte inerte fertirrigado con una solución nutritiva y en un ambiente controlado.

Los ambientes marginales del NOA y NEA presentan suelos salinos por lo que es necesario caracterizar a las forrajeras megatérmicas existentes, generar variabilidad y seleccionar cultivares tolerantes que se adapten a las limitantes de la región, ampliando las opciones de siembra.

Si bien existen antecedentes de ensayos comparativos de megatérmicas a campo (Radrizzani *et al.*, 2003, 2004; Cornacchione, 2008), en esta tesis se evaluará específicamente el comportamiento germinativo y el desarrollo de plantas de *Panicum maximum* cv. Gatton bajo condiciones artificiales de estrés hídrico-salino. De esta forma se determinará la concentración de NaCl o el potencial osmótico crítico que servirá como presión de selección en las diferentes etapas de los programas de mejoramiento.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Efecto del estrés iónico y osmótico sobre la germinación de *P. maximum* cv. Gatton.

- *Material vegetal*

Las semillas de Gatton Panic fueron lavadas para remover las sustancias adheridas durante el peleteado comercial y desinfectadas superficialmente (Ver 3.2.1.1). El último enjuague contuvo el fungicida Captan (N-Triclorometilo) al 0,5%. Luego se secaron con papel de filtro.

- *Diseño experimental*

Se desarrolló un experimento bifactorial (agente y potencial osmótico), utilizando un diseño completamente aleatorizado donde muestras de semillas fueron sembradas en placas de Petri (30 semillas por placa con 5 repeticiones) conteniendo 2 discos de papel toalla estériles embebidos a saturación con 4 ml de soluciones de manitol (182,172 PM) y NaCl (58,4 PM), cuyos potenciales osmóticos de -0,2; -0,4; -0,6; -0,8; -1 y -1,2 Mpa se formularon siguiendo la ecuación empírica de Van` t Hoff (Salisbury & Ross, 1994):

$$\Psi_o = -CiRT$$

Ecuación 5.2

Dónde:

Ψ_o = potencial osmótico,

C = concentración de la solución, expresada como molalidad (moles de soluto por kg de agua),

i = constante para la ionización del soluto, ($i_{NaCl}=1,8$)

R = constante de los gases (0,00831 kg MPa mol °K),

T = temperatura absoluta (°K) = grados °C + 273.

Se utilizó agua destilada como control (0 MPa) al igual que para la preparación de las soluciones. Se eligió emplear NaCl ya que es una de las sales más abundantes y solubles en los suelos agrícolas (Munns & Tester, 2008) (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Agente y concentración de los tratamientos.

Ψ_o (MPa)	Manitol		NaCl	
	[M]	[g/l]	[M]	[g/l]
-0,2	0,08	14,79	0,05	2,13
-0,4	0,16	29,59	0,10	5,37
-0,6	0,24	44,38	0,15	8,60
-0,8	0,33	59,17	0,20	11,84
-1	0,41	73,96	0,25	15,08
-1,2	0,49	88,76	0,30	18,32

Las placas fueron repicadas cada dos días para mantener el potencial osmótico y mantenidas en la sala de cultivo a 25 ± 2 °C y un fotoperiodo de 8 h luz ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$).

Se contabilizó diariamente el número de semillas germinadas durante 28 días y se calculó el porcentaje final de germinación, el tiempo medio de germinación (MTG) (García *et al.*, 1982)

$$MTG = \frac{\sum D \cdot n}{\sum n_t}$$

Ecuación 5.3

Dónde:

D: número de días registrados desde el comienzo de la germinación,

n: número de semillas germinadas en el día D,

n_t : número total de semillas sembradas.

y el índice de velocidad de emergencia (ERI) (Shmueli & Goldberg, 1971).

$$ERI = \sum_{n=n_0}^{n=c-1} X_n(c-n) / N$$

Ecuación 5.4

Dónde:

X_n : número de semillas germinadas contadas el día n ,

c : número de días desde la siembra hasta que terminó la emergencia,

n : día en el cual se realizó el conteo, expresado en días después de la siembra,

n_0 : día que comienza la emergencia, expresada como número de días después de la siembra,

N : número total de semillas.

Con la finalidad de detectar diferencias entre los tratamientos, se llevó a cabo el análisis de la varianza y el test de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia del 5%. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat *versión 2013* (Di Rienzo *et al.*, 2013)

Por último, como herramienta de selección se ajustó una curva por regresión lineal y calculó el potencial osmótico que genera una germinación del 0% y 50% relativo al control (Ψ_0 y Ψ_{50}) para cada agente osmótico.

5.2.2. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento *in vitro* de plántulas de *P. maximum* cv. Gatton

Para evaluar el efecto de la salinidad en el crecimiento de "Gatton Panic" se comparó la longitud del tallo y la raíz, al igual que el número de hojas expandidas de una muestra de plántulas germinadas *in vitro* sometidas a incrementos graduales de la concentración de NaCl del medio de cultivo frente a un tratamiento control.

Para ello, se utilizó la metodología empleada por Lopez Colomba (2011) modificada. Inicialmente se dispusieron semillas desinfectadas superficialmente para su incubación en un medio de cultivo MS, semisólido (6 g/l Agar), con 3% de sacarosa y estéril (control). A los 7 días de germinadas las semillas se conformaron dos muestras representativas de 15 plántulas, una para cada tratamiento: con NaCl y control. Las plántulas del tratamiento de salinidad fueron repicadas cada 7 días incrementando la concentración del medio en 50 mM NaCl en cada repique hasta alcanzar la concentración de 200 mM NaCl (los repiques no se realizaron con mayor frecuencia para no dañar las raíces). La muestra control se repicó siempre al mismo medio de cultivo. Una semana después de alcanzar la concentración final (día 35) se procedió a la medición de las variables mencionadas anteriormente y se calculó la diferencia de crecimiento sobre cada plántula de ambas muestras. Los datos fueron estudiados mediante análisis de varianza y las medias comparadas mediante Tukey al 5% de significancia.

5.2.3. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de plántulas de *P. maximum* cv. Gatton en condiciones de hidroponia.

Con el objetivo de determinar a partir de qué concentración de NaCl se evidencia en forma notoria el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de Gatton Panic (principalmente la entrada en la fase iónica del estrés salino) se realizó un estudio evaluando diferentes variables morfofisiológicas sobre plántulas creciendo a diferentes concentraciones de NaCl en un sistema hidropónico.

Se sembraron semillas en vasos plásticos de 250 cm³ conteniendo perlita como soporte para su germinación. Para ello se dispusieron 15 vasos

por bandeja de cultivo hidropónico de 0,50 x 0,25 m (2 bandejas por tratamiento) las cuales se cargaron con 2,5 l de solución nutritiva F (Tabla 5.4) y dispusieron en el invernáculo bajo temperatura controlada (25 ± 5 °C). Los vasos presentaron abundantes perforaciones en la base para lograr una buena irrigación y no dificultar el crecimiento radicular. El sustrato fue lavado previamente con agua destilada para evitar la presencia de sales. El medio F fue formulado con una composición química intermedia entre los medios de Hoagland 1/2 y el de Ruakura, diseñado para especies forrajeras (Smith *et al.*, 1983) (Ver Anexo). Como las especies C4 requieren del aporte de Na^+ para su crecimiento (Brownwell & Crossland, 1972), se incorporó a la solución 1 mM NaCl desde el inicio (tratamiento control).

Tabla 5.4. Composición de la solución nutritiva F.

Macronutrientes	Fórmula	Molaridad [mM]
Nitrato de amonio	NO_3NH_4	3,07
Nitrato de calcio · 4 H ₂ O	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,69
Nitrato de potasio	KNO_3	2,47
Cloruro de calcio · 2 H ₂ O	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,20
Sulfato de magnesio · 7 H ₂ O	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,014
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	0,73
Micronutrientes		[μM]
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,55
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,40
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,35
Ácido bórico	H_3BO_3	16,17
Sulfato ferroso · 7 H ₂ O	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	16,46
EDTA sódico · 2 H ₂ O	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	9

Luego de 21 días se realizó un raleo dejando 4 plántulas (3 hojas visibles) en cada vaso.

El ensayo siguió un diseño completamente aleatorizado donde se evaluaron 5 tratamientos con diferentes concentraciones salinas (T0-T4): 1, 25, 50, 100 y 200 mM NaCl. El arribo a las concentraciones finales de cada tratamiento se realizó en forma gradual para evitar un shock osmótico en las plántulas (periodo de adaptación). Cada 2-3 días se realizó el recambio de las soluciones con base F, más el agregado de NaCl en forma incremental, según tabla 5.5. Todos los tratamientos alcanzaron su concentración final el mismo día (día 28 desde la siembra = día 0).

Tabla 5.5. Periodo de adaptación. Incremento gradual de la concentración salina de la solución de riego para cada tratamiento.

Día	T0	T1	T2	T3	T4
21 (= -7)	SN F	SN F	SN F	SN F	25
24 (= -4)	=	=	=	25	50
26 (= -2)	=	=	25	50	100
28 (= 0)	SN F	25	50	100	200

T0-T4: tratamientos con una concentración final de la solución de riego de 1, 25, 50, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente.

Luego de este periodo se realizó el recambio de las soluciones en su totalidad una o dos veces a la semana. Las pérdidas ocurridas por evaporación durante la semana fueron compensadas agregando agua destilada a cada bandeja hasta su nivel inicial y así evitar la concentración de solutos.

Para el estudio del crecimiento en condiciones salinas se analizaron distintas variables que requirieron diferentes sistemas de muestreo.

Por un lado, se identificó una muestra al azar de 10 plántulas de cada tratamiento (1 plántula por maceta, 5 macetas por repetición), a las que se les midió el largo y ancho de la lámina de las 2 hojas más jóvenes. Cuando una hoja completaba su expansión (lígula visible) se midió la siguiente en orden de aparición. Las mediciones se realizaron cada 2-3 días desde iniciado el estrés (periodo de adaptación) y luego se espaciaron cada 7-15 días hasta finalizado el ensayo (estado reproductivo del tratamiento control).

Por medio de estos valores se calculó la tasa de expansión foliar en el tiempo y el área foliar producida (sin contar las pérdidas por senescencia) a la finalización del ensayo. La primera se estimó como la diferencia de longitud foliar producida entre dos mediciones sucesivas en relación al tiempo transcurrido. La segunda se estimó como la sumatoria de las áreas de todas las hojas expandidas (acumulada). El área foliar verde se calculó en forma indirecta. Para ello se multiplicó largo x ancho x 0,5. Este coeficiente fue hallado mediante regresión lineal a partir del área foliar calculada en un ensayo previo mediante el método de pesadas⁵.

Las variables se expresaron en forma absoluta y relativa al control para cada tratamiento. También se contabilizó el número de hojas completamente senescidas en el tiempo.

Por otro lado, se realizó un muestreo periódico (cada 7-10 días) destructivo de 8 plantas por tratamiento (2 macetas elegidas al azar con 4 plantas por maceta), a las que se descalzó y lavó cuidadosamente las

⁵ Una muestra conformada por 10 hojas de la posición 5 y 6 fueron escindidas de las plantas, inmediatamente fotocopiadas y recortadas junto con rectángulos de 5 cm². Todas las figuras fueron pesadas en una balanza de precisión y por relación simple se calculó el área de las hojas.

raíces. Luego se midió la altura de la planta (desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja más larga) y el largo de las raíces, al igual que se registró el número de hojas verdes, macollos y nudos visibles/palpables. Por último se determinó el peso fresco y seco de la parte aérea y radicular y la relación raíz: parte aérea. Para ello las plantas se dispusieron en sobres de papel dentro de la estufa a 60 °C hasta alcanzar peso constante.

A la finalización del ensayo se cosecharon todas las plantas y se obtuvo el contenido de materia seca (%). Se estableció que el ensayo llegó a término con la emergencia de la panoja sobre la hoja bandera en el 50% de las plantas del tratamiento control (a los 60 días aprox.).

Los datos fueron graficados y estudiados mediante el análisis de varianza y las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante el test de Tukey al 5% de significancia. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat *versión 2013* (Di Rienzo *et al.*, 2013)

5.3. Resultados

En el estudio del efecto del potencial osmótico sobre la germinación de *P. maximum* cv. Gatton, en primer lugar, no se evidenció germinación para ningún agente osmótico a -1 y -1,2 MPa por lo que tales tratamientos fueron excluidos del análisis. De igual modo, en los tratamientos con NaCl con potenciales menores a -0,4 Mpa la germinación fue nula. Por el contrario, con manitol la germinación se evidenció aún a -0,6 y -0,8 Mpa (Figura 5.3).

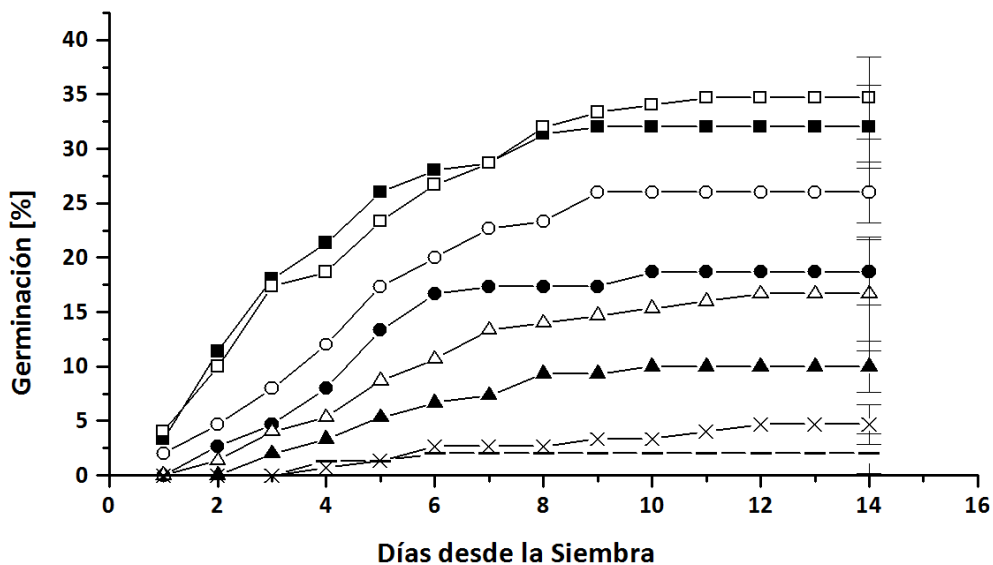


Figura 5.3. Efecto del potencial y agente osmótico sobre la germinación de *P. maximum* cv. Gatton. Germinación acumulada (%) a los 14 días desde la siembra para los tratamientos evaluados: 0 (■); -0,2 (●); -0,4 (▲); -0,6 (×) y -0,8 (-) MPa (Símbolos llenos: NaCl; vacíos: manitol). *Media (14 días) ± desv.est.*

En el ANOVA de la variable germinación no se encontró interacción entre los factores ($p=0,1872$) por lo que se analizaron los efectos principales. A menor potencial osmótico se observó menor porcentaje de germinación ($p<0,05$), alcanzando un 33,3% de germinación el tratamiento control. Los tratamientos con NaCl presentaron menor germinación promedio (12,13%) con respecto a los tratamientos con manitol (16,80%)

($p < 0,05$). Del mismo modo, a menor potencial osmótico se redujo la germinación en ambos agentes (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Germinación acumulada (%) a los 14 días desde la siembra según el agente y potencial osmótico (0; -0,2; -0,4; -0,6 y -0,8 MPa.) (-) semillas que no germinaron durante el experimento. Media (14 días) \pm desv.est.

Concentración (Mpa)	Agente osmótico			
	Manitol		NaCl	
0	34,67A	$\pm 3,80$	32,00A	$\pm 3,80$
-0,2	26,00B	$\pm 2,79$	18,67B	$\pm 2,98$
-0,4	16,67C	$\pm 5,27$	10,00C	$\pm 2,36$
-0,6	4,67D	$\pm 1,83$	-	-
-0,8	2,00D	$\pm 1,83$	-	-
-1	-	-	-	-
-1,2	-	-	-	-

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) en la columna.

En segundo término, si se analizan los agentes osmóticos en forma independiente, los resultados demuestran que los tratamientos con manitol no influyeron en el tiempo medio de germinación ($p=0,2168$), sin embargo disminuyó el índice de velocidad de emergencia (ERI) a medida que disminuyó el potencial osmótico ($p < 0,05$). Por el contrario, en los tratamientos con NaCl el aumento de potencial osmótico afectó tanto el tiempo medio de germinación ($p < 0,05$) como a la velocidad de germinación ($p < 0,05$) (Tabla 5.7).

Por otro lado, cuando se comparan los valores de ERI y MTG para los tres primeros potenciales no se observan diferencias entre ambos agentes ($p=0,6226$), sólo entre potenciales ($p < 0,05$).

Para finalizar, la germinación mostró un comportamiento lineal con la disminución del potencial osmótico para cada agente ($Y_{\text{man}}=43,33x+34,13$; $R^2=0,93$ y $Y_{\text{NaCl}}=55x+31,22$; $R^2=0,90$) siendo $\Psi_{50}=-0,39$ y $\Psi_0=-0,79$ para manitol y $\Psi_{50}=-0,28$ y $\Psi_0=-0,57$ para NaCl (Figura 5.4).

Tabla 5.7. a. Tiempo medio de germinación (MTG) e **b.** Índice de velocidad de emergencia (ERI) según el agente (NaCl y manitol) y potencial osmótico (0; -0,2; -0,4; -0,6 y -0,8 MPa.) (-) semillas que no germinaron durante el experimento. Media \pm desv.est.

a.

Potencial (Mpa)	Agente osmótico			
	Manitol		NaCl	
0	4,38A	$\pm 1,2$	3,72A	$\pm 0,61$
-0,2	4,72A	$\pm 0,78$	4,77AB	$\pm 0,91$
-0,4	5,76A	$\pm 1,19$	5,83B	$\pm 1,01$
-0,6	7,00A	$\pm 2,55$	-	-
-0,8	3,80A	$\pm 3,9$	-	-

b.

Potencial (Mpa)	Agente osmótico			
	Manitol		NaCl	
0	9,62A	$\pm 1,20$	10,28A	$\pm 0,61$
-0,2	9,28AB	$\pm 0,78$	9,23AB	$\pm 0,91$
-0,4	8,24AB	$\pm 1,19$	8,17B	$\pm 1,01$
-0,6	7,00AB	$\pm 2,55$	-	-
-0,8	4,60B	$\pm 4,56$	-	-

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) en la columna.

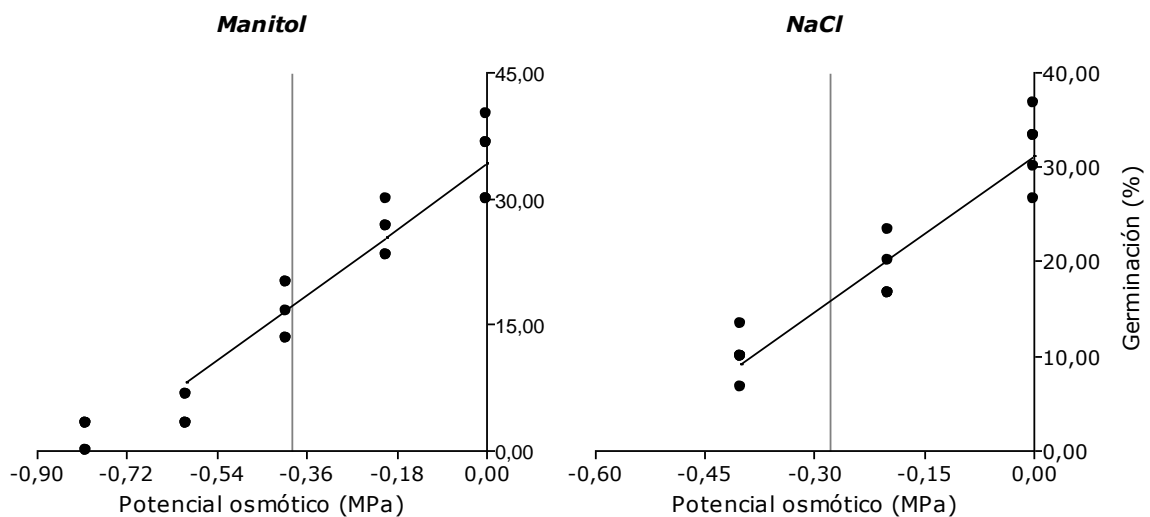


Figura 5.4. Regresión lineal entre el % de germinación acumulada a los 14 días desde la siembra y el potencial osmótico (0; -0,2; -0,4; -0,6 y -0,8 MPa) según el agente. **a.** Manitol. **b.** NaCl. Línea de corte (Ψ_{50})

Luego, se procedió a la evaluación del crecimiento de plántulas *in vitro* en condiciones de salinidad. En un primer momento, para la aplicación y comparación del tratamiento salino frente al control se conformaron dos submuestras representativas de las plántulas germinadas *in vitro* a los 7 días desde la germinación. Inicialmente, las mismas no mostraron diferencias en cuanto a la longitud del tallo ($p=0,2166$) y la raíz ($p=0,4620$), ni a su número de hojas expandidas. Las plántulas presentaban 2 hojas y medían 2,78 cm de altura y 1,64 cm de raíz, en promedio.

A los 35 días, una semana después de repicar las plántulas al medio con la mayor concentración de NaCl (200 mM), se evidenció que las plántulas incubadas en condiciones de salinidad presentaron un crecimiento diferencial del sistema radical con respecto al control (19,54 vs. 14,44 cm) ($P<0,05$), resultando las del primer tratamiento de mayor extensión (Figura 5.5).

Por otro lado, si bien se observó la tendencia no se detectó un efecto detrimental significativo del tratamiento con NaCl sobre el crecimiento en longitud del tallo, siendo de 1,88 cm en promedio ($p=0,0956$). Sin embargo, sí se detectó un efecto negativo sobre el crecimiento de las plántulas en el medio salino al contar con un menor número de hojas expandidas (5,13) con respecto al control (6) ($P<0,05$), indicando un retraso en la aparición y expansión de hojas.

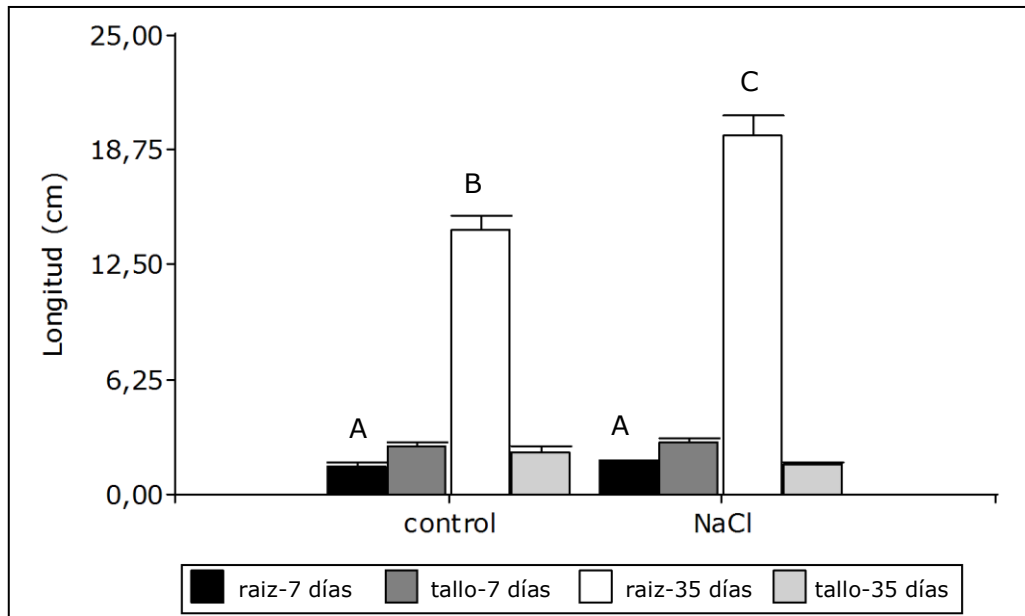


Figura 5.5. Efecto de la salinidad en el crecimiento *in vitro* de plántulas de *P. maximum* cv. Gatton. Longitud del tallo y la raíz de plántulas creciendo en condiciones de salinidad y control medidas a los 7 y 35 días desde la germinación. Media \pm error.est. $n=15$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre columnas.

Por último se estudió el efecto de la salinidad durante un ciclo de crecimiento de las plántulas de Gatton Panic bajo un sistema hidropónico (Figura 5.6). Principalmente, se realizó el seguimiento de la producción de área foliar y materia seca en el tiempo para diferentes concentraciones salinas.

El área foliar verde fue estimada de forma indirecta a partir de la medición del largo y ancho de las dos hojas en expansión por planta (largo x ancho x 0,5). La medición se realizó a intervalos de tiempo regulares calculando también la tasa de expansión foliar al final de cada periodo de medición.

Durante la semana de adaptación de las plántulas sometidas a incrementos graduales de NaCl se observó una relación lineal entre la tasa de expansión de área foliar y el tiempo ($r^2=0,81$), registrándose valores similares entre los tratamientos.



Figura 5.6. Plántulas de *P. maximum* cv. Gatton creciendo en un sistema hidropónico, previo al inicio de los tratamientos salinos (21 días desde la germinación). Perlita + solución nutritiva F.

A los 6 días de que los tratamientos alcanzaran su concentración final el incremento de la tasa se redujo un 25% en el tratamiento de 100 mM y un 52% en el de 200 mM NaCl con respecto al control ($p < 0,05$). Por el contrario, el tratamiento control, al igual que el de 25 y 50 mM NaCl aumentaron aún más sus tasas hasta alcanzar su máximo entre los 6 y 14 días. Esta reducción inicial en la tasa de expansión de área foliar, la llegada a un *plateau* y su posterior caída indicaría la entrada en la fase iónica (II) de estrés salino de las plántulas en los tratamientos con concentraciones más altas (Figura 5.7).

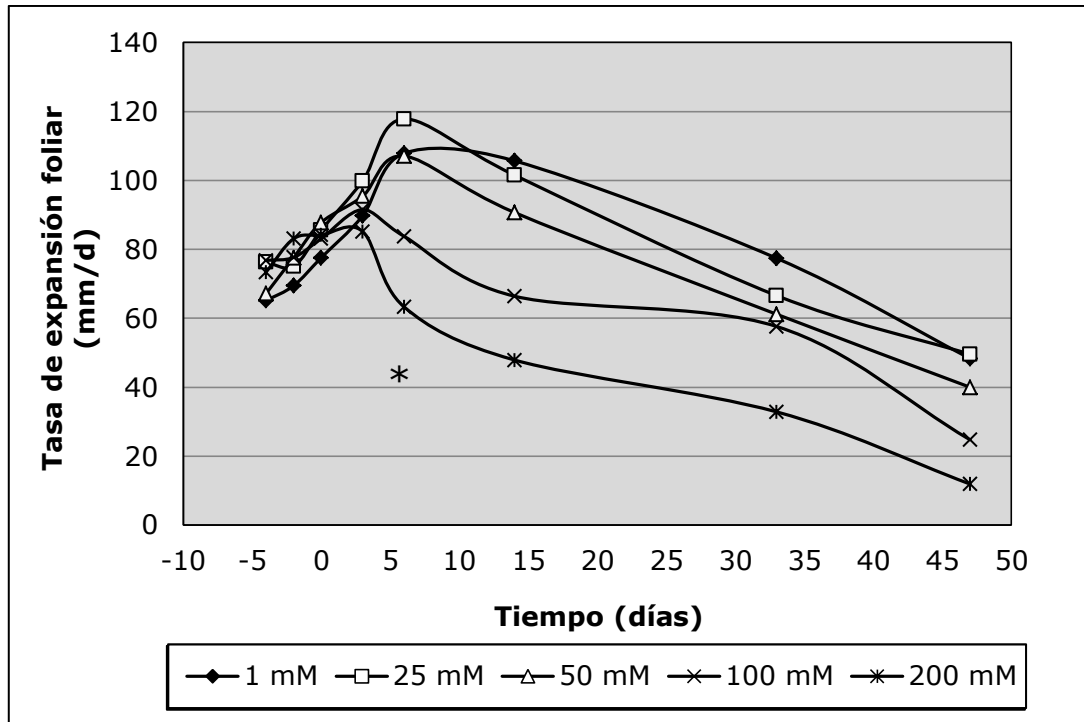


Figura 5.7. Efecto de la concentración de NaCl (1, 25, 50, 100 y 200 mM) sobre la tasa de expansión foliar de *P. maximum* cv. Gatton a través del tiempo. $n=10$. *comienzo de las diferencias significativas al control según Tukey al 5%.

La reducción en las tasas de expansión foliar afectó a la producción de área foliar acumulada observando al 6º día una tendencia negativa, principalmente, para los tratamientos con concentraciones de NaCl más elevadas, que luego se afirmó a los 14 días ($p<0,05$) (datos no mostrados). Cuando los mismos valores se expresaron en relación al tratamiento control se observó una leve reducción en los tratamientos de 25 y 50 mM NaCl a partir del día en que arribaron a su concentración final (día 0). Por el contrario, en los tratamientos de 100 y 200 mM NaCl se registró una fuerte caída en la curva, incluso desde días previos (Figura 5.8). En el tratamiento de 100 mM NaCl se observó una inflexión en la pendiente de la curva de área foliar relativa: de 0 a 3 días existió una leve reducción ($-0,01388 \text{ d}^{-1}$, $p<0,001$) que luego se acrecentó de 3 a 6 días ($-0,06056 \text{ d}^{-1}$); mientras

que en el tratamiento de 200 mM NaCl la reducción de 0 a 6 días fue constante y pronunciada ($-0,06344 \text{ d}^{-1}$, $p < 0,001$).

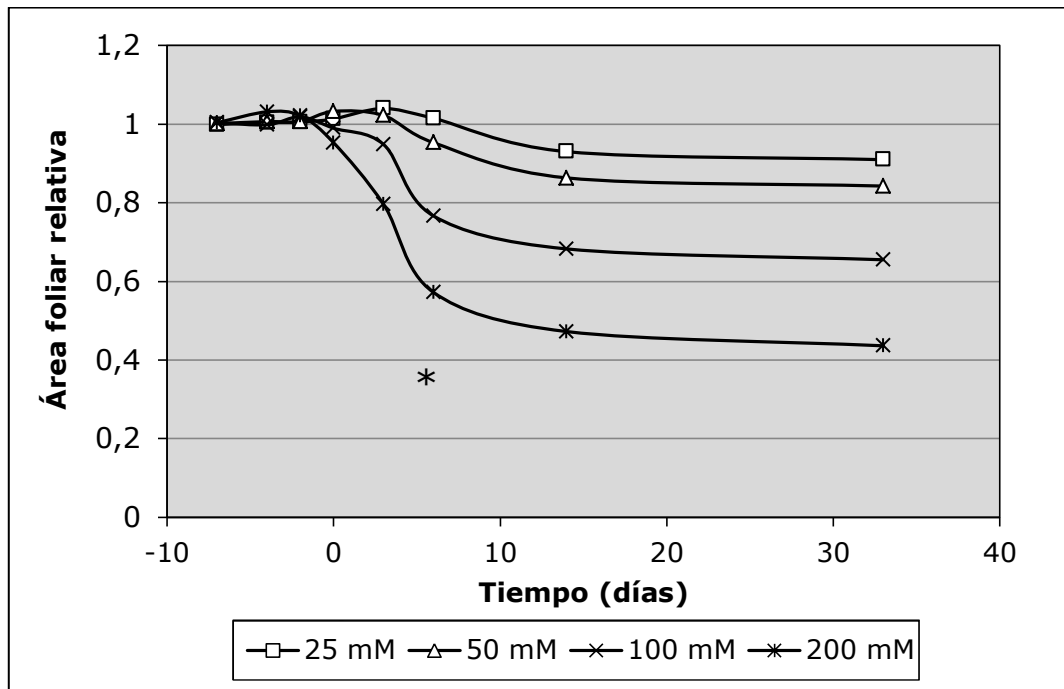


Figura 5.8. Efecto de la concentración de NaCl (25, 50, 100 y 200 mM) sobre el área foliar acumulada en el tiempo en relación al control de *P. maximum* cv. Gatton. $n=10$. *comienzo de las diferencias significativas al control según Tukey al 5%.

A la finalización del ensayo (día 54), el tratamiento control produjo un área foliar acumulada promedio de $407,62 \text{ cm}^2/\text{planta}$ durante el periodo evaluado, mientras que se registró una reducción al 86,9%; 69,51% y 47,21% para los tratamientos de 50, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente (Figura 5.9).

El efecto de la salinidad sobre el rendimiento de un cultivo puede ser estimado mediante la fórmula de Maas & Hoffman (1977):

$$Y = 100 - b(CE - a)$$

Ecuación 5.5

donde **Y** es el rendimiento relativo al control, **a** es la CE umbral a partir de la cual comienza a afectarse el rendimiento, y **b** es la reducción

en porcentaje (%) del rendimiento por cada unidad de CE por sobre el umbral. En este caso, mediante una adaptación de la fórmula, se estableció como medida de rendimiento al área foliar producida a la finalización del ensayo (sin tener en cuenta las pérdidas por senescencia), y determinó que, $Y(\%) = 100\% - 0,31\%/mM (x \text{ mM NaCl} - 25 \text{ mM NaCl})$ ($p < 0,001$, $R^2 = 0,72$).

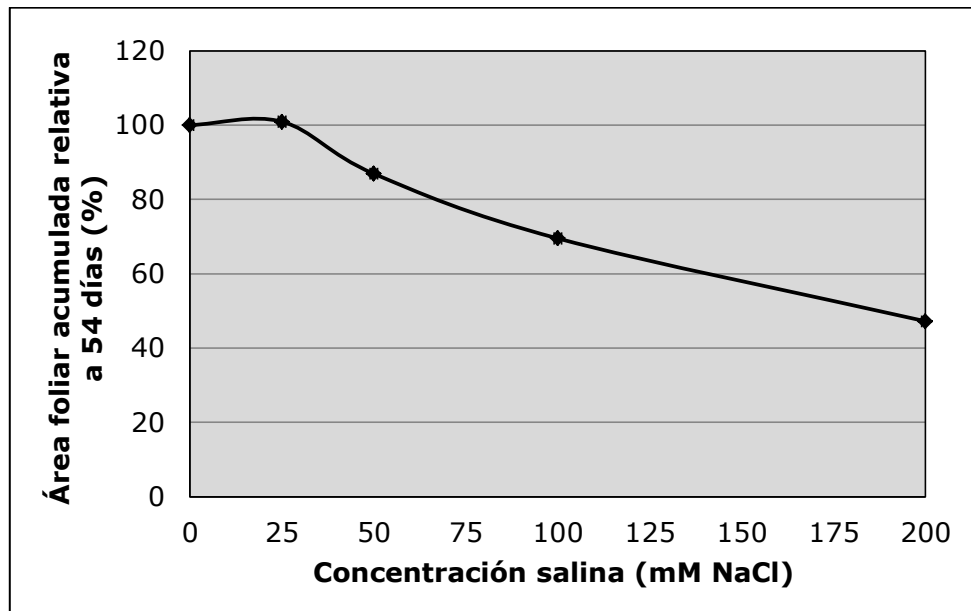


Figura 5.9. Efecto de la concentración de NaCl (1, 25, 50, 100 y 200 mM) sobre el área foliar acumulada al día 54 en relación al control de *P. maximum* cv. Gatton. $n=10$.

Este efecto de la salinidad también fue observado cuando se contabilizó el número total de hojas expandidas en el tiempo para cada tratamiento, donde a pesar de desarrollarse bajo las mismas condiciones de luz y temperatura (= Σ tiempo térmico), el aumento en la concentración salina produjo un menor número de hojas por planta ($p < 0,05$) y, por lo tanto, menor tasa de aparición de hojas. Las plantas del tratamiento control contaban con 8,4 hojas verdes en promedio al día 47, mientras que se contabilizaron 6,7 y 3,4 hojas en los tratamientos con 100 y 200 mM NaCl, respectivamente (Figura 5.10).

Tabla 5.8. Senescencia (%) de hojas completas de *P. maximum* cv. Gatton en el tiempo. $n=10$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre columnas.

Senescencia (%)					
días	1	25	50	100	200
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	1,11 A	3,47 A	6,94 A	8,47 A	17,68 B
14	11,06 A	12,84 A	13,33 A	13,56 A	22,50 B
31	27,69 A	31,87 A	32,23 A	34,55 A	43,09 B
47	47,87 A	50,76 A	47,6 A	50,76 A	70,91 B

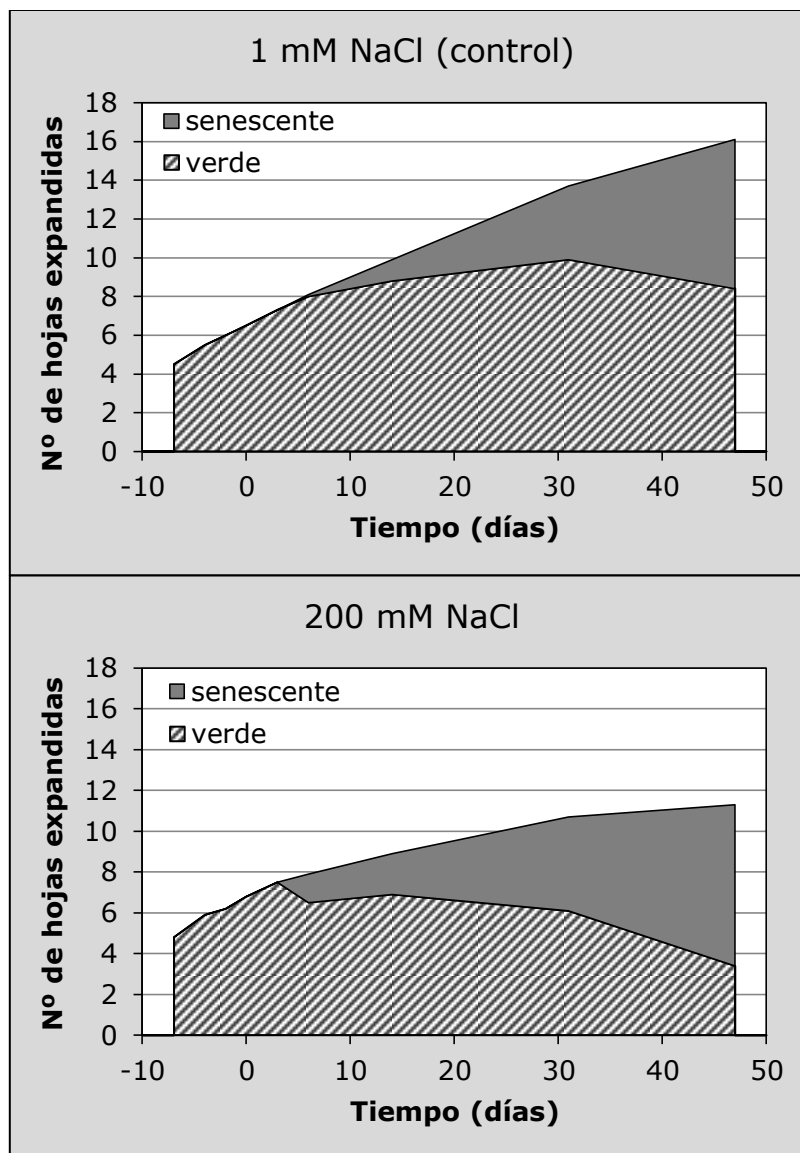


Figura 5.10. Efecto de la concentración de NaCl (1 y 200 mM) sobre el nº de hojas verdes y senescentes de *P. maximum* cv. Gatton en el tiempo. $n=10$.

Esta merma en el número de hojas en los tratamientos de mayores concentraciones no sólo fue consecuencia de la menor tasa de expansión y aparición de hojas debido a la salinidad sino también por un incremento de la senescencia de hojas completas (%), principalmente con 200 mM NaCl (Tabla 5.8). En este sentido, durante el periodo de adaptación, en los tratamientos de 100 y 200 mM NaCl se observó tempranamente el enrollamiento (o enrulamiento) de las hojas más jóvenes, síntoma asociado con el déficit hídrico a bajas concentraciones; y, luego de adquirir la concentración final, se registró clorosis y necrosis desde los ápices de las hojas más viejas, síntoma de toxicidad por Na⁺, acompañando a la reducción de la tasa de expansión foliar. Los síntomas de toxicidad avanzaron y fueron más notorios en el tiempo, no siendo así para los tratamientos de concentraciones más bajas, que solo experimentaron síntomas de sequía, principalmente en las horas de mayor temperatura. Las muestras de materia seca fueron conservadas para próximamente realizar mediciones de contenido de Na⁺ y poder correlacionar la acumulación de Na⁺ con la sintomatología observada.

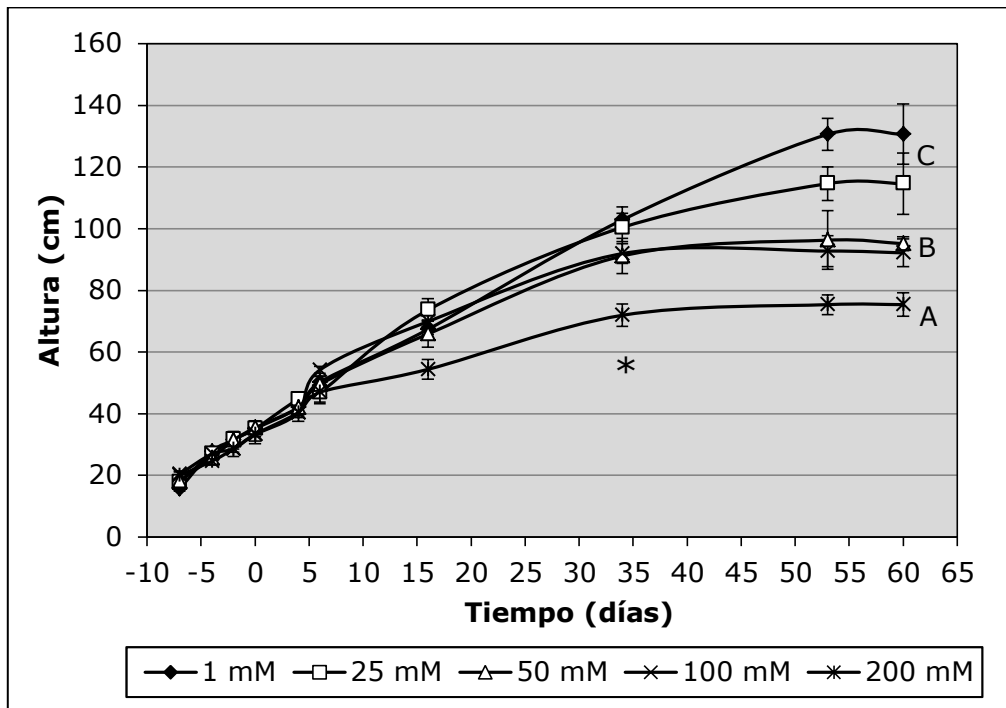
Asimismo, ligado al menor número de hojas, se observó la misma tendencia registrándose un menor número de nudos palpables/visibles por planta en los tratamientos de mayores concentraciones a la finalización del ensayo ($p < 0,001$). Así, se contabilizaron 6,5; 5,1 y 3,1 nudos para 50, 100 y 200 mM NaCl, respectivamente vs. 7,55 nudos para 1 y 25 mM NaCl en promedio. Las primeras diferencias entre los tratamientos en cuanto al número de hojas y nudos se registraron a partir de los 14 días de iniciado el ensayo, aprox. (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Efecto de la concentración de NaCl (1, 25, 50, 100 y 200 mM) sobre el nº de nudos de *P. maximum* cv. Gatton en el tiempo. $n=10$. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre columnas.

nº nudos					
días	1	25	50	100	200
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0 A	0,1 A	0,1 A	0 A	0 A
14	2 BC	2,4 BC	2,1 C	1,6 B	0,8 A
31	5,4 D	5,4 D	4,7 C	3,8 B	2,5 A
47	7,9 D	7,2 CD	6,5 C	5,1 B	3,1 A

Como consecuencia del efecto mencionado anteriormente, la altura total de la planta también fue afectada en forma inversamente proporcional a la concentración de NaCl. Si bien en el comienzo del ensayo los bajos niveles de NaCl produjeron efectos promotores sobre el crecimiento, al término del mismo los tratamientos con mayores concentraciones de NaCl (50, 100 y 200 mM) redujeron su altura a un 72,85%; 70,57% y 57,72% del control, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 5.11a). Del mismo modo, a los 54 días de iniciado los tratamientos el 50% de las plantas del tratamiento control alcanzaron el estado reproductivo (R5) mediante la elongación de la panoja sobre la hoja bandera marcando la finalización del ensayo (Figura 5.11b). Por el contrario, los demás tratamientos se retrasaron. Distinto es el caso del tratamiento con 200 mM NaCl donde varios individuos senescieron completamente.

a.



b.

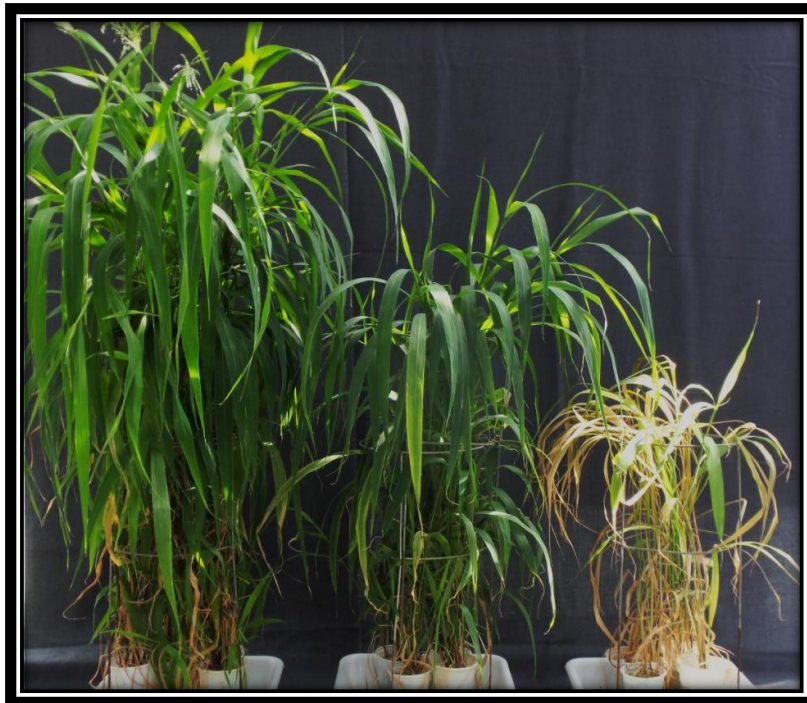


Figura 5.11. Efecto de la concentración de NaCl sobre la altura de las plantas de *P. maximum* cv. Gatton. **a.** Gráfico de la altura (cm) en función del tiempo. n=8. **b.** Plantas a los 54 días de iniciado el tratamiento con 1(control), 100 y 200 mM NaCl. *comienzo de las diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

Al comienzo del periodo de adaptación como a su finalización las plántulas de los tratamientos presentaron valores similares de biomasa aérea, tanto en peso fresco como seco. Sin embargo, a partir de los 16 días de iniciado el tratamiento se observaron diferencias en el peso de la materia seca, principalmente, a mayores concentraciones de NaCl ($p < 0,05$) (Figura 5.12). En los tratamientos de 25 y 50 mM NaCl se observó cierta compensación en la reducción de la altura y el número de nudos por el incremento del número de macollos, por lo que no se registró una reducción significativa de la biomasa (Tabla 5.10). La tendencia observada se corresponde con el efecto registrado de la salinidad sobre la producción de área foliar (Figura 5.9).

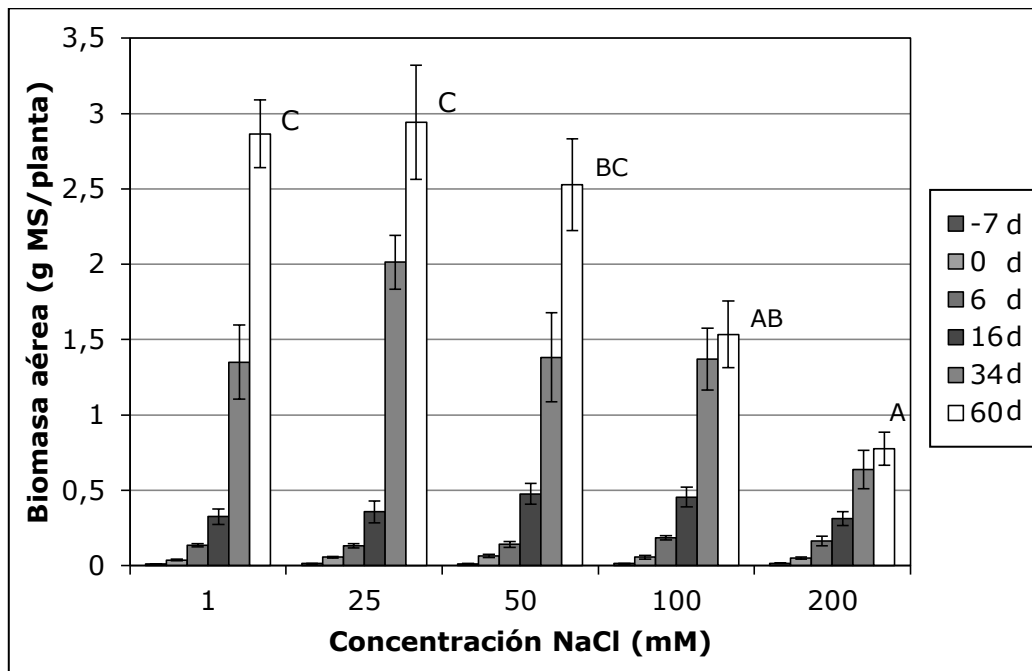


Figura 5.12. Biomasa aérea (g MS/planta) de *P. maximum* cv. Gattón creciendo en diferentes condiciones de salinidad en hidroponía. Series: días antes y después de arribar a la concentración de cada tratamiento. *Media* \pm *error.est.* $n=8$. *Medias con una letra común no son significativamente diferentes* ($p > 0,05$)

Tabla 5.10. Efecto de la concentración de NaCl (1, 25, 50, 100 y 200 mM) sobre el nº de macollos de *P. maximum* cv. Gatton en el tiempo. $n=10$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre columnas.

nº macollos					
días	1	25	50	100	200
0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
14	0,5 A	1,1 A	1 A	0,5 A	0,3 A
31	2,8 AB	3,5 B	3,8 B	2,7 AB	1,6 A
47	2,8 AB	3,5 B	3,8 B	2,8 AB	1,6 A

Cuando se analizó el contenido de agua (%) de la biomasa aérea se observó que la misma disminuye en el tiempo para todos los tratamientos. Sin embargo, al inicio del tratamiento (día 0) ya el tratamiento de 200 mM NaCl presentó menores valores frente al resto ($p < 0,001$); mientras que al 6º día también se diferenció el tratamiento de 100 mM NaCl. Al día 16º todos los tratamientos, de menor a mayor concentración, presentaron una reducción de 1-2% aprox. en forma consecutiva ($p < 0,001$) (Figura 5.13).

Del mismo modo se realizó el seguimiento del crecimiento radical. Tanto al inicio como al final del periodo de adaptación se observó que las plántulas presentaron valores similares de longitud radical entre los tratamientos, siendo de 8,52 cm ($p = 0,5383$) y de 10,41 cm ($p = 0,4728$) de longitud en promedio, respectivamente.

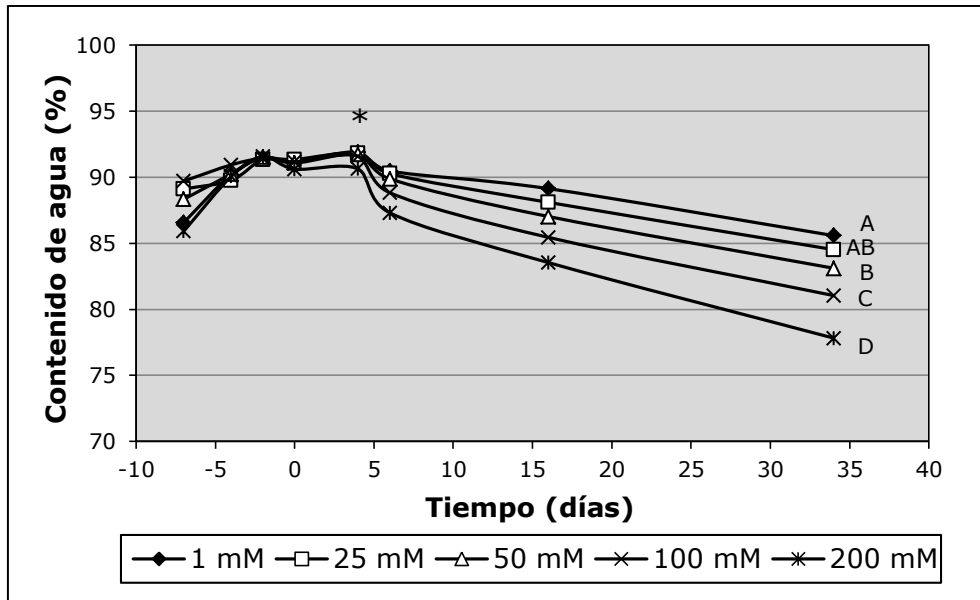
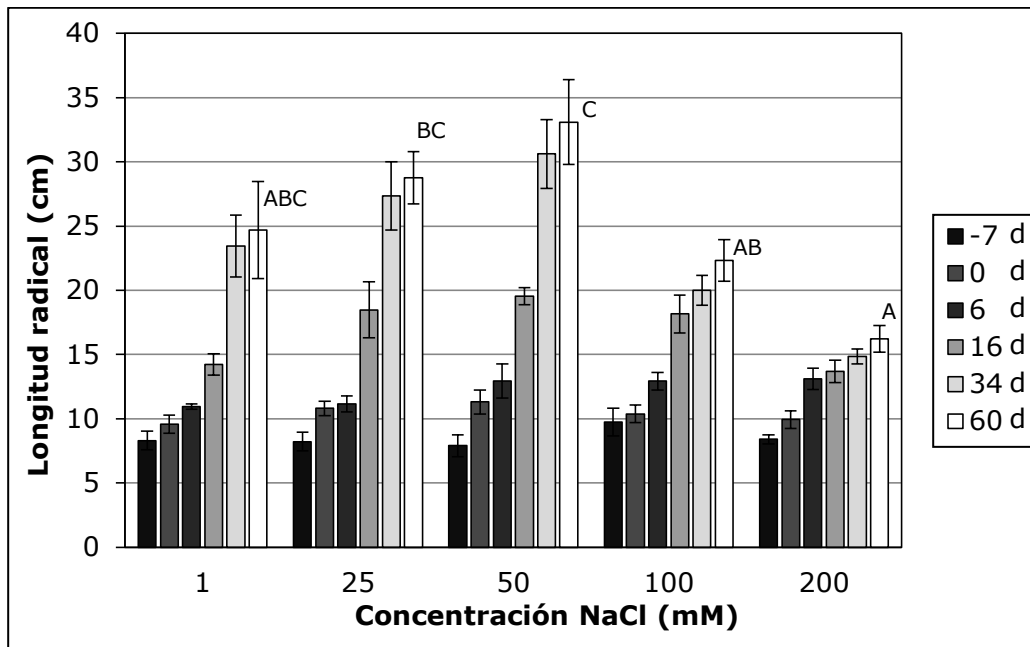


Figura 5.13. Contenido de agua (%) de las plantas de *P. maximum* cv. Gattón creciendo en diferentes condiciones de salinidad (1, 25, 50, 100 y 200 mM NaCl) en hidroponía. $n=8$. *comienzo de las diferencias significativas entre las medias ($p < 0,001$). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,001$)

Luego de arribar a la concentración final se registró un efecto promotor sobre el crecimiento radicular en el tiempo, principalmente, en los tratamientos con bajos niveles salinos, mientras que a mayores concentraciones el mismo se vió afectado. Las diferencias en longitud fueron máximas al término del ensayo ($p < 0,05$) (Figura 5.14). Los vasos presentaron abundantes perforaciones en la base para que las raíces se desarrollen libremente a través de ellos por lo que suponemos que no hubo competencia ni efecto del tamaño de la maceta.

a.



b.



Figura 5.14. Efecto de la concentración de NaCl (1, 25, 50, 100 y 200 mM) sobre el crecimiento radicular de *P. maximum* cv. Gattón **a.** Gráfico de barras de la longitud radical en el tiempo. Series: días antes y después de arribar a la concentración de cada tratamiento. $n=8$. *Media ± error. est. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)* **b.** Fotografía a los 34 días de iniciado el tratamiento. *Barra = 0,17 m.*

En el mismo sentido, al analizar el peso seco del sistema radical se observó una tendencia similar pero las diferencias entre las medias de los tratamientos tuvieron mayor significancia ($p < 0,001$), especialmente para los tratamientos de concentraciones más elevadas. El tratamiento control presentó valores similares a los tratamientos de 25 y 50 mM NaCl (Figura 5.15), reportados de longitud levemente mayor, lo que indicaría una compensación probablemente debida a una diferente arquitectura radical, número de raicillas o densidad (datos no medidos).

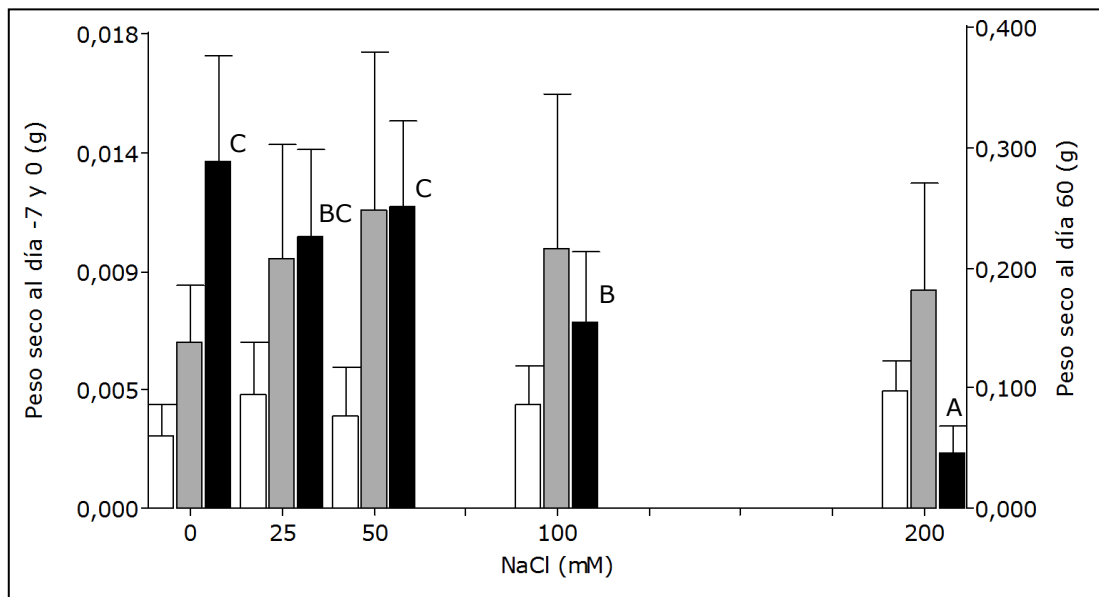


Figura 5.15. Efecto de la concentración de NaCl (1, 25, 50, 100 y 200 mM) sobre el peso seco del sistema radicular de *P. maximum* cv. Gatton en el tiempo. Antes (día -7, blanco) y después (día 0, gris) de alcanzar la concentración de cada tratamiento y a la finalización del ensayo (día 60, negro). $n=8$. Media \pm desv. est. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,001$)

Por último se observó que el peso seco total de la planta está altamente correlacionado ($p < 0,001$) con el peso fresco de la raíz (0,56) y la parte aérea (0,58), y a su vez, con el largo de la raíz (0,60), la altura de la planta (0,68) y el número de nudos (0,61). Por otro lado, se observó una correlación negativa con la relación raíz: parte aérea (-0,50), y entre esta última con la altura de la planta (-0,67) (Tabla 5.11).

Tabla 5.11. Correlación de Pearson entre las variables cuantificadas a la finalización del ensayo (Peso seco total, peso fresco de la raíz y la parte aérea, relación raíz : tallo, largo de la raíz, altura de la planta y número de nudos) ($p < 0,001$).

	Peso seco total	Peso fresco tallo	Peso fresco raíz	Seco raíz: tallo	Altura	Largo raíz	Nº nudos
Peso seco total	1	0	0	0	0	0	0
Peso fresco tallo	0,58	1	0	0	0	0	0
Peso fresco raíz	0,56	0,89	1	0	0	0	0
Seco raíz: tallo	-0,50	-0,48	-0,48	1	0	0	0
Altura	0,68	0,87	0,86	-0,67	1	0	0
Largo raíz	0,60	0,80	0,77	-0,53	0,83	1	0
Nº nudos	0,61	0,44	0,31	-0,29	0,45	0,33	1

5.4. Discusión

En primer lugar, en esta tesis se analizó la respuesta a la germinación de semillas de *P. maximum* cv. Gatton en condiciones artificiales de estrés hídrico-salino.

Por un lado se observó que al incubar las semillas en condiciones de laboratorio sobre superficies humedecidas con soluciones isosmóticas de manitol y NaCl a concentraciones crecientes (menor potencial osmótico) se redujó la germinación (Figura 5.3; Tabla 5.5). Como es sabido, uno de los principales factores que acciona en el proceso de la germinación de las semillas es el potencial agua del sustrato donde se las siembra. Así, cuando una semilla viable, sin dormición, es expuesta a condiciones ambientales óptimas en presencia de una solución con potencial agua cercano al estado de agua libre se produce, naturalmente, la imbibición de la semilla que desencadena la germinación. De modo inverso, al reducirse el potencial agua, el flujo de entrada a la semilla y el proceso se restringe (Bewley & Black, 1994; Bradford, 1995).

Por otro lado, se observó un efecto diferencial en la reducción de la germinación en función del potencial osmótico según el agente utilizado en la solución. Así, mediante regresión lineal se ajustó una curva de la germinación en función del potencial y determinó que el límite crítico de tolerancia al estrés donde se inhibe completamente la germinación es de $\Psi_0 = -0,79$ Mpa para manitol y $\Psi_0 = -0,57$ Mpa para NaCl (≈ 150 mM). Esta mayor sensibilidad frente al tratamiento salino indica que el NaCl provoca un efecto negativo adicional debido al componente iónico que podría generar toxicidad en el embrión.

Ruiz y Terenti (2012) también estudiaron el efecto de diferentes agentes osmóticos sobre la germinación de cuatro forrajeras tropicales (*Antephora pubescens*, *Cenchrus ciliaris*, *Agropyron elongatum* y *Panicum coloratum*) observando la toxicidad de las sales respecto del manitol. Al igual que en este trabajo, tales especies mostraron mayores porcentajes de germinación sobre las soluciones de manitol que utilizando cualquiera de las sales ensayadas (KCl, NaCl, Na₂SO₄, K₂SO₄), especialmente a comparación con las sales sulfatadas y a bajos potenciales (-1 y -1,5 MPa).

En este trabajo es destacable el comportamiento de *Panicum coloratum*, especie relacionada filogenéticamente a *P. maximum* y cultivada en la Argentina. La misma presentó germinación aún a potenciales de -1 y -1,5 Mpa, lo que va en línea con su reconocida mayor tolerancia a la sequía, sin embargo, casi no evidenció diferencias entre los agentes osmóticos utilizados. Así, los autores sugirieron que, en general, las semillas estarían afectadas principalmente por el estrés osmótico más que por la toxicidad de iones específicos. Por el contrario, los mismos destacaron que en *Cenchrus ciliaris* sí se observó un efecto diferencial de tolerancia al estrés hídrico (solución de manitol) a muy bajos potenciales con respecto a las soluciones salinas. En el presente ensayo en *P. maximum*, no sólo el manitol inhibió la germinación a un valor superior (-0,79 Mpa) a los citados para tales especies, sino que el NaCl generó toxicidad inhibiéndola a -0,57 Mpa (Figura 5.3 y Tabla 5.5).

Otra especie del mismo género, *P. turgidum*, si bien presentó mayores niveles de germinación en el tratamiento control (60%) que lo observado en *P. maximum* (33%), experimentó una respuesta similar en la reducción de los valores a medida que aumentó la concentración de Na⁺

(El-Keblawy *et al.*, 2011). De este modo, la germinación se redujo significativamente a más del 50% a 100 mM con respecto al control y, prácticamente, se inhibió a los 200 mM NaCl. No obstante, luego de 14 días, los investigadores transfirieron las semillas que no germinaron a agua destilada recuperando la germinación (en un 30%) en todos los tratamientos, incluso las provenientes de 300 y 400 mM NaCl. Esto indicaría que en esta especie no se manifiesta un efecto de toxicidad por NaCl durante la germinación. Al Khaateb (2006) también observó una reducción y un retraso sustancial de la germinación ante incrementos de NaCl superiores a los 50 mM en la misma especie.

Por otro lado, Martínez y colaboradores (1992) estudiaron la germinación de semillas de *P. maximum* regadas con diluciones de agua de mar y observaron que cuando se incubaban en una dilución al 25% (≈ 13 dS/m ó 130 mM NaCl) se retrasaba la germinación pero sin afectar su valor final (%); mientras que a mayores concentraciones se inhibía completamente. Este efecto sobre la menor velocidad y el mayor tiempo medio de germinación se condice con lo observado en este trabajo, tanto para el tratamiento de manitol como de NaCl (Tabla 5.6a y b), pero no así con su efecto sobre el porcentaje total alcanzado. Más aún, los autores también registraron que cuando las semillas se repicaron a un sustrato humedecido con agua destilada las mismas recuperaban su capacidad de germinación, indicando que la composición y concentración salina no generó toxicidad en el embrión (estrés osmótico-no salino) o la misma fue revertida. En esta tesis no se estudió si el efecto atribuido al componente iónico de la solución de NaCl podía ser revertido.

Según Fanti y de Andrade Pérez (2004), el retraso en el tiempo y velocidad de germinación de las semillas inducido por las condiciones naturales de déficit hídrico actúan de forma positiva en el establecimiento de las plantas (dormancia inducida), ya que aumenta la probabilidad de las mismas para encontrar condiciones más favorables para su desarrollo y, de este modo, sincroniza los eventos germinativos con las condiciones ambientales. Esta teoría explica parte de los resultados citados, sin embargo, cabe aclarar que las semillas utilizadas por Martínez y colaboradores (1992) fueron cosechadas de poblaciones creciendo en el sistema de dunas del Golfo de México, al igual que las utilizadas por Al-Khateb (2006) provinieron de la costa del Golfo de Arabia, por lo que la tolerancia observada al componente iónico podría deberse a un efecto materno.

En general, las sales afectan la síntesis "de novo" y la actividad de las enzimas responsables de la hidrólisis y translocación de productos del tejido de reserva hacia el embrión, afectando por lo tanto el proceso de germinación. Específicamente, altas concentraciones de Na^+ y Cl^- en el citoplasma provoca trastornos en el equilibrio iónico de K^+ y Ca^{2+} lo que reduce la integridad de la membrana plasmática. El Na^+ compite con el K^+ que es necesario para la síntesis de proteínas, almidón y la activación de muchas enzimas en el proceso de germinación, por lo que tal desbalance resulta en una baja producción energética, perturbaciones en la asimilación de nitrógeno, cambios en el patrón de aminoácidos y en el metabolismo de las proteínas (Fanti y de Andrade Perez, 2004).

Basigalluppi y colaboradores (2008) realizaron un análisis similar sobre la germinación de semillas provenientes de poblaciones de

Thinopyrum ponticum (C3) creciendo bajo diferentes condiciones de salinidad y observaron diferentes grados de tolerancia. Los autores determinaron que los potenciales hídricos críticos que permitían evaluar la tolerancia al estrés y discriminar entre poblaciones eran cercanos a -1 MPa, mientras que potenciales hídricos mayores a -0,27 y -0,6 MPa no eran aptos para tal fin.

En este sentido, en esta tesis también se obtuvo, mediante la curva de ajuste, el potencial que reduce en un 50% la germinación (Ψ_{50}), parámetro más conservador y que sería de mayor utilidad para la selección y obtención de plantas tolerantes dentro de los programas de mejoramiento, siendo de $\Psi_{50}=-0,39$ Mpa para el manitol y $\Psi_{50}=-0,28$ Mpa para el NaCl (Figura 5.4). Fanti y de Andrade Pérez (2004), evaluando el efecto del potencial osmótico (con PEG y manitol) sobre la germinación de *Chorisia speciosa*, también determinaron el mismo parámetro de estudio. Sin embargo, a diferencia de esta investigación, los autores dedujeron el valor a partir de un ajuste de regresión no lineal, ya que sus datos se distribuyeron en forma sigmoidea.

En resumen, las semillas de *Panicum maximum* cv. Gatton presentaron un nivel crítico elevado de tolerancia al NaCl durante la germinación, por lo que el cultivar puede ser clasificado como una especie glicófita con alta sensibilidad a la salinidad.

En segundo lugar, en vías de ajustar un método rápido de selección de plantas tolerantes a la salinidad se analizó el crecimiento de plántulas de *P. maximum* cv. Gatton germinadas *in vitro* expuestas a incrementos semanales de NaCl en un medio nutritivo semisólido.

A la finalización del ensayo se obtuvieron dos observaciones importantes. Por un lado, las plántulas en condiciones de salinidad produjeron raíces más largas con respecto al tratamiento control (Figura 5.5). Este efecto podría ser explicado por la estimulación del crecimiento radical (mecanismo de evasión) provocado por la disminución del potencial agua (en su componente osmótico) del medio de crecimiento, principalmente en las primeras semanas a bajas concentraciones de NaCl. De este modo, se registró una mayor capacidad de exploración radical en forma similar a la registrada en plantas creciendo en sustratos pobres o bajo condiciones de sequía.

En general, en condiciones de salinidad los sistemas radicales se ven comprometidos en su desarrollo siendo menos profundos, con menos ramificaciones y menor peso, por lo que son menos eficientes en la absorción de agua y nutrientes. Sin embargo, este mecanismo depende de la concentración salina, del tiempo de exposición y del grado de tolerancia a la misma que presente el genotipo. Si las condiciones de salinidad son severas y se mantienen por un periodo prolongado es de esperar que la reducción en el área foliar y la fotosíntesis afecten la translocación de nutrientes hacia la raíz produciendo muerte de raíces. En este sentido, Neumann (1995) hipotetiza que la menor extensión en los tejidos de la raíz se deberían a una regulación adaptativa de la capacidad de expansión de la pared celular, y no a un efecto directo de toxicidad por Na⁺. De este modo, células más chicas y en menor número permitirían aumentar la relación superficie: volumen, absorber mayor cantidad de solutos y mantener la turgencia y el potencial osmótico.

En este trabajo es posible que la concentración salina no haya generado toxicidad a nivel celular o no se haya podido apreciar los efectos indirectos en el corto tiempo de evaluación fijado (7 días a 200 mM NaCl). Asimismo, el empleo de un medio de cultivo rico en nutrientes y fuentes carbonadas pudo haber enmascarado de alguna manera los efectos adversos del Na⁺ sobre el crecimiento radical.

Lopez Colomba (2011), sin embargo, utilizó con éxito el mismo medio de selección *in vitro* para obtener mutantes de *Cenchrus ciliaris* tolerantes a la salinidad, no obstante, los repiques fueron realizados cada 20 días al igual que su posterior periodo de evaluación. Pongtongkam y colaboradores (2005), también seleccionaron *in vitro* individuos de *P. maximum* tolerantes a la salinidad bajo diferentes concentraciones de NaCl (90; 170; 260 y 340 mM) desarrollados mediante mutagénesis con rayos γ y cultivo de tejidos. El mismo grupo también seleccionó individuos tolerantes de *Brachiaria* bajo las mismas condiciones observando que la salinidad redujo el número de vástagos en forma notoria en las plantas sin irradiar (control), incluso en la concentración más baja utilizada.

En referencia a esto último, a diferencia de lo esperado, en esta tesis no se observó una reducción en la altura del tallo de las plántulas creciendo en condiciones de salinidad con respecto al control, sin embargo, las mismas produjeron menor cantidad de hojas (5,13 vs. 6) a la finalización del ensayo.

Cabe recordar que la disminución del crecimiento del área foliar ante un aumento de la salinidad del suelo sucede en dos fases. La primera, asociada al efecto osmótico de la sal alrededor de las raíces, genera una respuesta rápida mediada por el ABA que produce el cierre estomático y el

corte del flujo transpiratorio. De este modo, en principio, las células de las hojas tienden a perder agua con la consiguiente pérdida de turgencia en forma transitoria. Y luego, en el corto plazo, recuperan su volumen gracias a un mecanismo de ajuste osmótico propio de cada especie. A pesar de ello, la tasa de elongación celular se resiente. Tal reducción de la elongación y división celular sostenida en el tiempo hace más lenta la aparición de hojas reduciendo el área foliar, el número de macollos y, por consiguiente, la biomasa aérea y el tamaño final de la planta. Por el contrario, en esta fase el sistema radical suele ser menos sensible y es afectado en menor grado (Munns & Tester, 2008).

En la segunda fase, la absorción y acumulación de Na^+ en los tejidos alcanza una concentración tal que genera toxicidad en las hojas más viejas (completamente expandidas) causando la senescencia. Si el estrés es moderado, aumenta la senescencia de las hojas más viejas pero la producción de hojas más jóvenes aún continúa. Sin embargo, si la salinidad es elevada la tasa de senescencia será mayor a la de aparición de hojas, se afectará el área foliar y la fotosíntesis general de la planta y se reducirá el flujo de carbono necesario para el desarrollo de las hojas más jóvenes, por lo que se resiente nuevamente el crecimiento hasta que la planta muere.

La compensación o falta de diferencia en la altura promedio de las plantas observadas en el ensayo podría ser explicada, tanto por los efectos propios del microclima *in vitro* (calidad de la luz, por ejemplo) como por las restricciones al crecimiento de los controles determinadas por el volumen del frasco. De cualquier modo, en el corto tiempo de evaluación no se pudo apreciar la generación de senescencia debido a la toxicidad por acumulación

de Na⁺ (fase II). Por consiguiente, ajustando las concentraciones y tiempos estipulados el sistema de selección podría brindar más información.

Por último se estudió el crecimiento de las plántulas de Gatton Panic en condiciones salinas bajo un sistema hidropónico.

En primer término, debemos referirnos a la solución nutritiva utilizada. En este sentido, se cita en la bibliografía el amplio uso del medio de Hoagland & Arnon en estudios de fisiología vegetal (de Luca *et al.*, 2001; Cordoba *et al.*, 2001). Sin embargo, en base a los datos aportados por Smith y colaboradores (1983) y a problemas experimentados en ensayos previos (deficiencias clorofílicas) utilizando otros medios, en esta investigación se decidió formular una nueva solución nutritiva. La solución denominada "Sn F" tiene una composición de macro y micronutrientes similar a la de Hoagland & Arnon 1/2 pero con mayores niveles de hierro y una proporción de NH₄-N:NO₃-N de 1:2,9, principal diferencia y aporte del medio "Ruakura", diseñado para el cultivo hidropónico de forrajeras (Smith *et al.*, 1983).

De esta manera se obtuvo una buena respuesta en la germinación y crecimiento de las plántulas de *P. maximum* cv. Gatton en el invernáculo, alcanzando el tratamiento control el estado reproductivo (panojamiento) a los 75 días desde la siembra.

En segundo término, nos debemos referir a las variables morfológicas cuantificadas. De este modo, en concordancia con lo explicado anteriormente y con lo observado en el ensayo *in vitro*, primero se observó una reducción en la tasa de expansión (Figura 5.7) y aparición de hojas (menor número de hojas a igual fecha de muestreo) al aumentar la

concentración salina, lo que determinó una menor área foliar (Figura 5.8 y 5.9) y altura (Figura 5.11) de las plantas.

A resultados similares arribaron Ramírez Reynoso y colaboradores (2010) quienes también estudiaron variables morfogénicas en *P. maximum* cv. Mombaza pero bajo regímenes de humedad y sequía, registrando que las plantas creciendo en condiciones de déficit hídrico tuvieron menor tasa de aparición y elongación de hojas y tallo, aunque menor senescencia y, por lo tanto, menor recambio de tejidos. Mientras que, en el periodo húmedo, la tasa de crecimiento neto de las plantas y la producción de materia seca fue mayor.

En este sentido, De Costa y colaboradores (2012), estudiando los efectos de la salinidad en *Oryza sativa* mediante el análisis de la reducción en el tiempo del área foliar verde en relación al control, observaron que la tasa fue constante y directamente proporcional a la concentración salina. De este modo, los autores pudieron determinar que a los 100 mM NaCl se produjo un aumento diferencial de la misma que determinó una inflexión en la curva, indicando la entrada en la fase II del estrés salino. Luego, concentraciones superiores determinaron tasas de similar magnitud incluso comenzando la caída antes de arribar a la concentración final del tratamiento. En esta tesis, también se pudo observar la misma tendencia y determinar que a una concentración de 100 mM NaCl se produjo la inflexión en la curva de área foliar relativa a los 3 días de comenzado el tratamiento (Figura 5.8).

Asimismo, en *P. maximum*, a diferencia del estudio citado por Ramírez Reynoso y colaboradores (2010), el componente iónico de las soluciones de riego generó toxicidad en las hojas adultas, principalmente en

los tratamientos de mayores concentraciones, evidenciado tempranamente por la observación de ápices foliares necrozados. Si bien a los 100 mM NaCl la senescencia de hojas completas se vió proporcionalmente aumentada esta no fue en forma significativa (Tabla 5.7), por lo tanto, los efectos adversos sobre el área foliar, altura y biomasa de las plantas solo podrían ser explicados por la menor tasa de expansión y aparición de hojas. Por el contrario, a 200 mM NaCl el efecto osmótico prácticamente no fue apreciable ya que la reducción del área foliar fue brusca ya desde el periodo de adaptación, y la toxicidad por sodio (fase II) incrementó la senescencia y la mortalidad de plantas (Figura 5.10 y Tabla 5.7).

La salinidad del suelo afecta el crecimiento en forma diferencial según la concentración y el genotipo. Así, Marcum y Murdoch (1994) estudiando la respuesta de 4 gramíneas megatérmicas creciendo bajo condiciones salinas observaron que el crecimiento del tallo de *Stenotaphrum secundatum* fue estimulado entre los 100 y 200 mM NaCl. Mientras que, *Eremochloa ophiuroides* y *Zoysia japonica* redujeron su crecimiento al 50% del control a 130 y 77 mM NaCl, respectivamente; y senescieron completamente a 230 y 170 mM NaCl. Los autores explican que estas dos especies, al no poseer mecanismos de exclusión de Na⁺ (por ejemplo, glándulas foliares), acumulan altos niveles de Na⁺ en las hojas que determinan una mayor toxicidad aún a bajas concentraciones de NaCl, por lo que se las caracteriza como altamente sensibles a la salinidad.

Del mismo modo, Toll Vera y colaboradores (2009), analizaron la influencia de la salinidad del suelo en la composición mineral de las hojas de 5 gramíneas megatérmicas agrupadas de acuerdo a su tolerancia: *Panicum maximum*, *Brachiaria brizantha* y *Urochloa mosanbisensis* (sensibles),

Cenchrus ciliaris (semi-tolerante) y *Chloris gayana* (tolerante). Así, en las forrajeras sensibles, los investigadores registraron un marcado aumento en el contenido de Na^+ (+183%) de las hojas y el consecuente desbalance de K^+ . Por el contrario, en especies tolerantes, se observó un menor incremento de Na^+ cercano al 35% en promedio respecto del contenido de una planta creciendo en un suelo no salino, lo que indicó la presencia de mecanismos de exclusión del Na^+ tanto a nivel radicular como debido a la presencia de glándulas extrusoras. En concordancia con este trabajo es probable que el *P. maximum* cv. Gatton presente una alta acumulación de Na^+ ante el estrés salino siendo baja o nula la compartimentalización vacuolar y/o la exclusión de Na^+ , como observaron Marcum y Murdoch (1994) en *E. ophiuroides*. Por otro lado, Wilson y colaboradores (1980) estudiando la respuesta del Green Panic a periodos de sequía concluyeron que el 25% del ajuste osmótico medido en los tejidos foliares se debió a la retención y distribución diferencial (simplasto-apoplasto) del agua de los tejidos, mientras que hipotetizaron que el 75% restante se debería a la acumulación de solutos compatibles. Gatton Panic poseería similares mecanismos de adaptación pero a niveles más reducidos.

A una observación particular arribaron Blanco y Seguí (1992) quienes destacaron que existió una correlación positiva entre el contenido de Na^+ en las hojas y el rendimiento en materia seca en cultivares de *P. maximum*, y que esta correlación fue más fuerte en los periodos de crecimiento secos que en los húmedos. De este modo, sugirieron, a diferencia de los autores citados anteriormente, que la absorción de Na^+ sería independiente a la concentración de Na^+ del suelo y que el mismo, además de beneficiar la fotosíntesis de las especies C4, ayudaría a mantener el equilibrio hídrico de

los tejidos. En el ensayo de hidroponía se observó un efecto positivo en las tasas de expansión foliar y producción de biomasa pero a una baja concentración de NaCl (25 mM), lo que podría ser explicado por esta hipótesis, sin embargo, no se evaluó el ingreso de Na⁺ a la planta ni el contenido acumulado en las hojas.

Por el contrario, De Costa y colaboradores (2012) registraron que, por arriba de una concentración umbral de 40 mM NaCl, las hojas de *Oryza sativa* acumulan Na⁺ pero en forma proporcional al incremento de NaCl del tratamiento. Y que esta acumulación de Na⁺ reduce el peso seco relativo de la parte aérea y el peso seco total de las plantas.

Del mismo modo, Pessaraki y colaboradores (2009), estudiando el efecto de la salinidad sobre el crecimiento en hidroponía de otras 4 gramíneas megatérmicas (*Cynodon dactylon* L., *Paspalum vaginatum* S., *Distichlis spicata* L. var. *stricta*) con diferente grado de tolerancia, observaron que, para las dos primeras especies, una mayor concentración de NaCl redujo la longitud y el peso de la raíz y la parte aérea. Sin embargo, a la concentración más baja se observó una mayor longitud y peso del sistema radical con respecto al control. Si bien los investigadores utilizaron tratamientos con mayores concentraciones de NaCl (0, 120, 240 y 360 mM) que los ensayados en *P. maximum* ya que las especies son halófitas en este trabajo se observó una respuesta similar sobre la longitud y peso de la raíz (Figura 5.14 y 5.15). Por el contrario, *D. spicata* evidenció un mayor crecimiento de sus componentes en todas las concentraciones, siendo una especie halófita altamente tolerante.

Este fenómeno de incremento del crecimiento en respuesta a una baja salinidad se ha observado en otras especies del género. Por ejemplo,

en *Panicum turgidum*, Al-Khateeb (2006) observó que a niveles bajos de salinidad (25-50 mM NaCl) se estimuló el crecimiento de tallos y raíces con respecto al control, mientras que a concentraciones mayores (100 mM) se observaron disminuciones importantes de la biomasa. Esta tendencia concuerda con lo observado en este trabajo sobre *P. maximum*. Mientras que Koyro y colaboradores (2013), también estudiando el crecimiento de plantas de *P. turgidum* en condiciones de salinidad, no observaron diferencias con el tratamiento control aún a 125 mM NaCl (25% de agua de mar), por lo que clasificaron a la especie como halófito.

Por otro lado, cuando las concentraciones de NaCl excedieron los 25 mM NaCl se incrementó significativamente la concentración de Na^+ en tallos y raíces de *P. turgidum*, patrón de respuesta no cuantificada pero esperable también en *P. maximum*, en correspondencia con la tendencia observada en el ajuste de la ecuación de pérdida de rendimiento modificada (Ecuación 5.5). Este ajuste fue desarrollado de modo puramente orientativo ya que la correcta determinación de la pérdida de rendimiento se debería estimar sobre el rendimiento de la pastura (y no de la planta individual) y a partir de la biomasa aérea (Kg MS/ha) producida en cada rebrote (o acumulada) luego de los cortes estipulados según el manejo establecido (Priano y Pilatti, 1989). Al-Khateeb (2006) también agrega que el efecto negativo observado sobre el crecimiento sería explicado por la reducción del contenido intracelular de K^+ y por el consecuente desbalance K^+/Na^+ .

Koyro y colaboradores (2013) analizando los efectos negativos de la salinidad observaron una reducción de la eficiencia del uso del agua de *P. turgidum* a medida que aumentó la concentración de sal y determinaron que esto se debió, más a la reducción de la capacidad de carboxilación

(menor actividad de la Rubisco y contenidos de clorofila) de las plantas, que al efecto del NaCl sobre los parámetros estomáticos. De este modo, el aumento de la lixiviación de la membrana, la fotoinhibición, la producción de H₂O₂, y la peroxidación lipídica reveló claramente la generación de estrés oxidativo ante elevadas concentraciones salinas. En *P. maximum* no se evaluaron los parámetros bioquímicos que podían ratificar esta hipótesis.

Otro factor observado en este trabajo fue la disminución en el contenido hídrico (o aumento del porcentaje de materia seca) de las plantas de *P. maximum* a medida que avanzó el estado fenológico (Figura 5.13). En general, el contenido de la materia seca en los forrajes es muy variable dependiendo el estado fisiológico del mismo. En estadios de crecimiento activo el contenido de agua es elevado, pero cuando las plantas comienzan a envejecer, sin realizar cortes o pastoreos, este disminuye y, por ende, aumenta el porcentaje de fibra neutra, tornándose la pastura menos digestible para los animales. Más allá de este fenómeno, en el ensayo se observó un aumento del porcentaje de materia seca de las plantas (1-2% entre tratamientos) en forma proporcional a la concentración de NaCl. Este fenómeno podría explicarse por la menor absorción de agua debido al efecto osmótico de la solución, que determina una reducción de la conductancia estomática y del gradiente hídrico (datos no evaluados).

En línea con lo observado sobre *P. maximum*, Gulzar y colaboradores (2005) observaron que el contenido de agua (g/planta) o la succulencia, expresada como g de agua/g materia seca, de *Sporobolus ioclados* disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl. Sin embargo, los investigadores atribuyeron este efecto a una baja acumulación de Na⁺ en el tallo y, también hipotetizaron que al reducir el contenido de agua de

los tejidos las plantas mantuvieron su balance osmótico. De igual modo observaron que también disminuyó la turgencia y la conductancia estomática.

Sumado a ello, en *P. maximum*, el menor número de hojas verdes y área foliar (Figura 5.9 y 5.10) a igual tiempo de evaluación también pudo haber aumentado el aporte de la biomasa de tallos a la materia seca total. Las diferencias en el contenido hídrico encontradas aún a bajas concentraciones, exceptuando al tratamiento de 25 mM NaCl, indicarían un bajo nivel de ajuste osmótico de los tejidos (dato no evaluado) y alta acumulación de Na⁺, causa principal de su alta sensibilidad.

En cuanto a la reproducción cabe mencionar que, ante un estrés salino los cereales experimentan una reducción del número de macollos y, por lo tanto, del número de espigas (Munns & Tester, 2008). Y, del mismo modo, el número de flores por espiga y el tiempo de floración y maduración se ven afectados (Munns, 2002). El ensayo de hidroponia de *P. maximum* fue finalizado cuando el tratamiento control llegó a antesis, por lo que no fue evaluado este estadio fenológico ni las componentes reproductivas (número de espiguillas de la panoja, fertilidad, número y peso de las semillas, etc.). Sin embargo, se observó un menor número de macollos en el tratamiento de 200 mM NaCl, mientras que todos los tratamientos vieron retrasada su floración.

Para finalizar, en coincidencia con lo postulado por Ruiz y Terenti (2012), con esta investigación se corroboró que en *P. maximum* la germinación y el establecimiento son las fases de crecimiento más sensibles a la salinidad.

En este sentido, las forrajeras perennes en general tienen un lento crecimiento inicial y pocas reservas en la semilla, lo que hace que el establecimiento de las plántulas sea, ya de por sí, una etapa crucial para la implantación de la pastura. A pesar de ello, Radrizzani y Perotti (2004), realizando un ensayo comparativo de pasturas implantadas en un bajo salino del sudeste de Santiago del Estero con drenaje pobre (CE de 5,5 dS/m en superficie y 10,5 dS/m a los 0,50 m de profundidad), observaron que el Gatton Panic presentó buena implantación al 1º año pero baja productividad y persistencia (densidad de matas) durante el 2º y 3º año de evaluación, manifestando su limitación para producir forraje en suelos con limitaciones de drenaje y salinidad. Estos resultados van en línea con los observados en los ensayos de germinación en placa y crecimiento en hidroponía y coinciden con la concentración establecida como presión de selección (≈ 100 mM NaCl).

Del mismo modo, Cornachione (2008) evaluando pasturas megatérmicas en ambientes restrictivos también registró las mismas limitaciones de este cultivar y destacó la mayor productividad de *Cenchrus ciliaris* en ambientes de baja retención hídrica (sudoeste Chacho Serrano) o de *Chloris gayana* en bajos salinos de Santiago del Estero.

En resumen, se determinó que a partir de una concentración de 100 mM NaCl se redujo en un 30,5% el área foliar acumulada (y más del 25% la tasa de expansión foliar) (Figura 5.9), un 29,5% la altura (Figura 5.11) y un 46,4% la biomasa seca (Figura 5.12) a la finalización del ensayo, por lo que se propone la utilización de tal concentración en los sistemas de selección. Córdoba y colaboradores (2001), también decidieron utilizar el nivel de salinidad que redujo en un 25% la elongación foliar con

respecto al control (200 mM NaCl) como valor límite para sus estudios sobre los efectos de la salinidad en el crecimiento radicular de *Chloris gayana*. Asimismo, la concentración de 100 mM NaCl (CE \approx 10 dS/m) determinada en este trabajo como nivel máximo de tolerancia fue cercana a los valores de tolerancia reportados por el Instituto de Agricultura y Biología Nuclear (NIAB) de Pakistán para el cultivar N-S-1 de *P. maximum*, en el cual una CE de 9 dS/m en la zona radical redujo en un 50% la producción de materia verde (Heuperman *et al.*, 2002). En próximos estudios se prevee incluir otros ecotipos a los ensayos y, de este modo, poder estudiar la heredabilidad de los caracteres para cada nivel de salinidad.

5.5. Conclusión

La disminución del potencial osmótico afectó negativamente a la germinación del cultivar Gatton de *Panicum maximum*, disminuyendo el porcentaje, la velocidad y el tiempo medio de germinación. Asimismo, en condiciones de salinidad, la germinación se vió afectada en mayor grado indicando un efecto aditivo a causa del componente iónico. Una concentración de 76 mM NaCl (7,6 dS/m) aprox., que genere un potencial osmótico cercano a los -0,28 Mpa, reduce la germinación en un 50%. Tal concentración sería útil en la selección de individuos tolerantes al estrés hídrico-salino para esta etapa fenológica.

Por otro lado, se determinó que a partir de una concentración de 100 mM NaCl (-0,36 MPa) en la solución de riego de plántulas de Gatton Panic creciendo en un sistema hidropónico se produce estrés salino observando el cambio de fase (I a II) al tercer día de iniciado el tratamiento. Asimismo, los efectos sobre la tasa de expansión foliar se tradujeron en una reducción de un 30,5% en el área foliar acumulada, un 29,5% en la altura y un 46,4% en la biomasa seca acumulada a la finalización del ensayo. La observación del cambio de fase y la considerable reducción en el crecimiento a tal concentración la convierte en un buen parámetro para seleccionar nuevos genotipos tolerantes en un sistema hidropónico.

A partir del análisis del crecimiento de plántulas de Gatton Panic *in vitro* se concluye que, si bien se observó un efecto de la salinidad sobre el área foliar en concordancia con lo observado en el sistema hidropónico, este sistema de selección requiere algunos ajustes, principalmente, mayores

tiempos de evaluación que permitan observar y diferenciar los individuos según los síntomas de estrés iónico (senescencia).

De este modo, la técnicas *in vitro* e *in vivo* servirán para la selección, tanto de los individuos provenientes de semillas (mutagenizadas) como de los somaclones provenientes de cultivo *in vitro*, en sus diferentes etapas fenológicas.

5.6. Bibliografía

- Al-Khateeb, S. A. (2006). Effect of salinity and temperature on germination, growth and ion relations of *Panicum turgidum* Forssk. *Bioresource Technology* 97, 292–298.
- Ashraf, M. & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166, 3–16.
- Blanco, F. & Seguí, E. (1992). Variación del contenido de Na en cultivares de *Panicum maximum* y su relación con el rendimiento. *Pastos y Forrajes*, 15(2), 123-131.
- Bazzigalupi, O., Pistorale, S. M., & Andrés, A. N. (2008). Tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). *Cien. Inv. Agr.* 35(3), 277-285.
- Brownwell, P. F., & Crossland, C. J. (1972). The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 49, 794–797.
- Conti, M. (Coord.)(2005). Principios de edafología, con énfasis en suelos argentinos. (2ª Ed). Buenos Aires: FAUBA. 430pp.
- Córdoba, A., García Seffino, L., Moreno, H., Arias, C., Grunberg, K., Zenoff, A., & Taleisnik, E. (2001). Characterization of the effect of high salinity on roots of *Chloris gayana* Kunth: carbohydrate and lipid accumulation and growth. *Grass and Forage Science*, 56, 162-168.
- Cornacchione, M. V. (2008). Avances en gramíneas megatérmicas. Experiencias en el ambiente subtropical semiárido en la provincia de Santiago del Estero. Jornadas técnicas. Vivero San Carlos, Santiago del Estero: INTA 6pp.

- De Luca, M., García Seffino, L., Grunberg, K., Salgado, M., Córdoba, A., Luna, C., Ortega, L., Rodriguez, A., Castagnaro, A. & Taleisnik, E. (2001). Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar. *Aust. J. Agric. Res.* 52, 903-910.
- De Costa, W. A. J. M., Wijeratne, M. A. D., De Costa, D. M., & Zahra, A. R. F. (2012). Determination of the appropriate level of salinity for screening of hydroponically grown rice for salt tolerance. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka* 40(2), 123-136.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- El-Keblawy, A., Al-Ansari, F. & Al-Shamsi, N. (2011). Effects of temperature and light on salinity tolerance during germination in two desert glycophytic grasses, *Lasiurus scindicus* and *Panicum turgidum*. *Grass and Forage Science* 66, 173-182.
- Fanti, S. C., & de Andrade Perez, S. C. J. G. (2004) Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino *Pesq. agropec. bras.*, 39(9), 903-909.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29 (1), 185-212.
- García, J., Monteith, J., & Squire, G. (1982). Time, temperature, and germination of pearl millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.). *J. Exp. Bot.* 33, 288-296.

- González, L. M., González, M. C., & Ramírez, R. (2002). Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. Reseña bibliográfica. *Cultivos Tropicales* 23(2), 27-37.
- Gulzar, S., Khan, M. A., Ungar, I. A. & Liu, X. (2005). Influence of salinity on growth and osmotic relations of *Sporobolus ioclados*. *Pak. J. Bot.* 37(1), 119-129.
- Heuperman, A. F., Kapoor, A. S. & Denecke, H. W. (2002). Appendix 1. Salt tolerant species based on research in Pakistan. In *Biodrainage: principles, experiences and applications* (p.73). Roma: IPTRID, FAO.
- Koyro, H. W., Hussain, T., Huchzermeyer, B. & Khan, M. A. (2013). Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. *Environmental and Experimental Botany* 91, 22– 29.
- Lopez Colomba, E. (2011). Inducción de variabilidad genética para tolerancia a estreses abióticos mediante técnicas de cultivo *in vitro* en *Cenchrus ciliaris* L. (Tesis de Maestría) Universidad Internacional de Andalucía.
- Maas, E. V., & Hoffman, G. H. (1977). Crop salt tolerance current assessment. *Journal of Irrigation and Drainage Division* 103, 115-134
- Marcum, K. B., & Murdoch, C. L. (1994). Salinity tolerance mechanisms of six C4 turfgrasses. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(4), 779–784.
- Martinez, M. L., Valverde, T., & Moreno-Casasola, P. (1992). Germination response to temperature, salinity, light and depth of sowing of ten tropical dune species. *Oecologia* 92:343-353.
- Munns, R. & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–81.

- Pessarakli, M., Kopec, D.M. & Gilbert, J.J. (2009). Growth responses of selected warm-season turfgrasses under salt stress. *The 2009 Turfgrass, Landscape and Urban IPM Research Summary* (P-157), 30-46.
- Priano, L. J. y Pilatti, M. A. (1989). Tolerancia a la salinidad de forrajeras cultivadas. *Ciencias del Suelo* 7(1-2), 113-116.
- Ramírez Reynoso, O., Hernández Garay, A., Carneiro da Silva, S., Pérez Pérez, J., Jacaúna de Souza Júnior, S., Castro Rivera, R., & Enríquez Quiroz, J. F. (2010). Características morfogénicas y su influencia en el rendimiento del pasto mombaza, cosechado a diferentes intervalos de corte. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(2), 303-311.
- Ruiz, M., & Terenti, O. (2012). Germinación de cuatro pastos bajo condiciones de estrés salino. *Phyton* 81, 169-176.
- Radrizzani, A., Perotti, M. & Demichellis, G. (2003). Producción de forraje de gramíneas tropicales en sitios bajos del sudeste de Santiago del Estero. *Revista Argentina de Producción Animal* 23(1), 170-171.
- Radrizzani, A., Renolfi, R. F., & Perotti, M. (2004). Efecto del sitio sobre el establecimiento de *Panicum maximum* cv. Gatton en el sudeste de Santiago del Estero. *Revista Argentina de Producción Animal* 24(1), 103-104.
- Shmueli, M., & Goldberg, D. (1971). Emergence, early growth and salinity of five vegetable crops germinated by sprinkle and trickle irrigation in arid zones. *Horticultural Science* 6, 176-177.
- Smith, G. S., Johnston, C. M., & Cornforth, I. S. (1983). Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *New Phytol.* 94, 537-548.

- Taleisnik, E. y Lopez Launestein, D. (2011). Leñosas perennes para ambientes afectados por salinidad. Una sinopsis de la contribución argentina a este tema. *Ecología Austral* 21, 3-14.
- Toll Vera, J. R., Martín, G. O. (h), Nicosia, M. G., & Cisint, J. C. (2009). Influencia de la salinidad del suelo sobre la composición mineral foliar de gramíneas forrajeras subtropicales. "VI Reunión de Producción Vegetal y IV de Producción Animal del NOA". Universidad Nacional de Tucumán, 23 al 24 de Abril, Tucumán, Argentina.
- USDA. Salinity Laboratory Staff. (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. *Agricultural Handbook N° 60*. USDA, Washington.
- Valluru, R. & Van den Ende, W. (2008). Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, 1- 12.
- Wilson, J. R., Ludlow, M. M., Fisher, M. J. & Schulze, E.-D. (1980). Adaptation to water stress of the leaf water relations of four tropical forage species. *Aust. J. Plant Physiol.* 7, 207-220.

5.7. ANEXO

Concentración de elementos (ppm) de la solución nutritiva F.

<i>Elemento</i>	<i>SN F</i>
	ppm
N	28,46
P	53,34
K	28,73
Ca	76,02
Mg	24,65
Mn	0,195
Mo	0,4
B	0,18
Zn	0,23
Cu	0,25
Fe	0,83
Na	45,54
S	32,8

Contenido de NaCl requerido (g) para preparar las soluciones de riego de cada tratamiento.

	para 1L	para 5 L	para 10 L	para 2 L	para 4 L	para 6 L
mM	g	g	g	g	g	g
1	0,0585	0,2925	0,585	0,117	0,234	0,351
25	1,4625	7,3125	14,625	2,925	5,85	8,775
50	2,925	14,625	29,25	5,85	11,7	17,55
100	5,85	29,25	58,5	11,7	23,4	35,1
200	11,7	58,5	117	23,4	46,8	70,2
1000	58,5	292,5	585	117	234	351

**CAPÍTULO VI:
HERRAMIENTAS DE DETECCIÓN DE
VARIABILIDAD GENÉTICA**

VI. Herramientas de detección de variabilidad genética

6.1. Introducción

6.1.1. Marcadores moleculares: consideraciones generales

Una de las mayores contribuciones de la biotecnología al mejoramiento genético vegetal es la aplicación de marcadores moleculares.

Un marcador genético puede ser definido como un carácter que presenta polimorfismo o variabilidad experimentalmente detectable en individuos de una población segregante y cuya herencia se ajusta a las leyes de Mendel (Sala *et al.*, 2010).

Existe una gran variedad de marcadores genéticos que incluye desde la identificación visual de características fenotípicas (marcadores morfológicos), la detección de polimorfismos en isoenzimas y proteínas de reserva (marcadores bioquímicos), hasta los que exploran la variabilidad genética a nivel del ADN (marcadores moleculares) (Martinez *et al.*, 2010).

Un marcador molecular es una secuencia de ADN de longitud variable ubicada en una región específica del cromosoma, codificante o no, cuya herencia puede estudiarse entre los individuos de una población. Poseen la ventaja de hallarse en un número virtualmente ilimitado, y que pueden aplicarse tempranamente al estado de plántula con el consiguiente ahorro de tiempo y espacio en el proceso de mejoramiento, lo que les aporta gran utilidad.

Según las técnicas utilizadas (hibridación utilizando sondas y enzimas de restricción, amplificación de ADN mediante PCR, o secuenciación), se cuenta con una amplia variedad y clasificación de marcadores moleculares que brindan diferente información ajustándose a distintos usos (Tabla 6.1) (Martinez *et. al*, 2010).

En general, el uso de marcadores moleculares (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, entre otros) permite optimizar o hacer más eficiente todos los procesos determinantes de la ganancia genética o del progreso genético por selección. En otras palabras, los marcadores moleculares pueden utilizarse para organizar, mantener e incrementar la diversidad genética (Sala *et al.*, 2010).

Tabla 6.1. Características generales de algunos marcadores genéticos. Tomado de Becerra & Paredes, 2000.

Característica	Proteínas	Isoenzima	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
Polimorfismo	Alto	Bajo	Bajo-alto	Medio-alto	Medio-alto	Alto
Estabilidad ambiental	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta
Número de <i>loci</i>	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto
Reproducibilidad	Alta	Moderada-alta	Alta	Moderada-alta	Alta	Alta
Aplicación	Rápida-barata	Rápida-barata	Lenta-cara	Rápida-cara	Lenta-cara	Lenta-cara

RFLP: Fragmentos de restricción polimórficos,

RAPD: Amplificación de ADN al azar,

AFLP: Amplificación de fragmentos polimórficos,

SSR: Secuencias simples repetidas.

Específicamente, esta tecnología interviene en: el análisis de la variabilidad genética y estudios de filogenia; el desarrollo de mapas genéticos saturados; el aislamiento, clonación y secuenciación de genes; el marcado o etiquetado de genes cualitativos y cuantitativos; la identificación de rutas bioquímicas completas; la selección asistida por marcadores (MAS) y la transferencia de genes (Carrera *et al.*, 2010; IAEA/FAO, 2011).

En todo programa de mejoramiento genético es fundamental, inicialmente, estimar la variabilidad genética existente para luego planificar los cruzamientos entre parentales. De esta manera, la diversidad puede

incrementarse si se planifican cruzas entre individuos que exhiban escaso parecido genético.

La genealogía de los individuos o su parecido fenotípico no es suficiente para determinar si dos individuos están o no estrechamente relacionados genéticamente. Las estimaciones de similitudes genéticas basadas en marcadores, en cambio, proveen un indicador bastante ajustado de las similitudes o distancias genéticas reales. (Carrera *et al.*, 2010; Sala *et al.*, 2010).

Basado en ello, la MAS posibilita escoger por el genotipo de cada individuo e independizarse de su fenotipo. De esta forma, es posible eludir la plasticidad fenotípica presente en numerosas especies, principalmente en poáceas forrajeras, y disminuir la contribución de la interacción genotipo-ambiente. Asimismo, también se reduce el tiempo requerido para completar los ciclos de selección, disminuyendo los costos de los programas de mejoramiento (Sala *et al.*, 2010).

En igual sentido, los marcadores moleculares permiten en los sistemas de retrocruzas la introgresión de ciertos caracteres con un mínimo de incorporación de genes provenientes del individuo dador, garantizando de ese modo que no se reduzcan las medias poblacionales para aquellos caracteres que no están relacionados con el gen introducido.

Por último, cabe mencionar la utilidad de esta herramienta en el mantenimiento de la pureza varietal, uno de los principales requisitos de la semilla comercial. En la producción de semilla puede originarse heterogeneidad dentro del lote por falta de uniformidad en las líneas parentales en el caso de híbridos, polinización cruzada espontánea o mezcla de semillas durante la siembra, cosecha o embolsado. Los individuos fuera

de tipo pueden identificarse mediante el patrón molecular (Carrera *et al.*, 2010).

6.1.2. Microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR)

Los SSR son regiones hipervariables del genoma compuestas por repeticiones de di-, tri- o tetra-nucleótidos dispuestos en tándem flanqueadas por secuencias altamente conservadas y de copia única. La base genética del polimorfismo detectado en los microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones, de 5-50 copias, y consecuentemente, en la diferencia de tamaño del microsatélite entre los individuos de una especie (Martinez *et al.*, 2010; IAEA/FAO, 2011).

Por PCR es posible amplificar los microsatélites a partir de cebadores específicamente diseñados. Los productos amplificados de longitud variable se pueden separar por electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, y visualizar mediante la tinción con plata o bromuro de etidio; autorradiografía, si los cebadores se marcaron radioactivamente; o a través de la automatización, si los cebadores están marcados con fluorescencia. De esta forma, se logran distinguir varios alelos por locus (multialelismo) (Figura 6.1) (Echenique, 2004).

Los SSR son muy atractivos para los genetistas y mejoradores pues combinan varias ventajas como su alta reproducibilidad, abundancia en el genoma, alto polimorfismo, codominancia y su alta heterocigosidad (IAEA/FAO, 2011). El alto nivel de polimorfismo que detectan permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además, el análisis de microsatélites requiere cantidades mínimas de ADN.

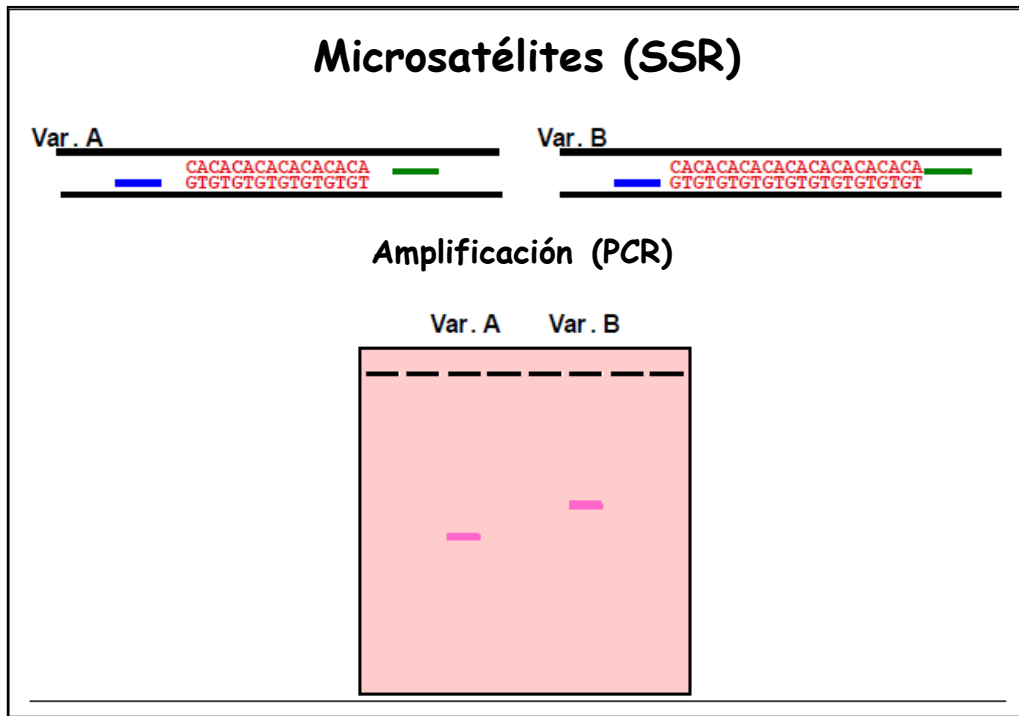


Figura 6.1. Esquema de detección de variabilidad mediante SSR. Electroforesis en gel de los productos de amplificación de la PCR. (SSR A corto y B largo) (tomado de IAEA/FAO, 2011).

Por otro lado, el desarrollo y la obtención de SSR genómicos presenta la desventaja de involucrar mayor tiempo y costo. Sin embargo, existe la posibilidad de adaptar los mismos cebadores en más de una especie (Echenique, 2004). La transferibilidad de los microsatélites entre especies depende de la homología de las secuencias de ADN en las regiones flanqueantes. El éxito en la transferibilidad de los microsatélites también depende de su cercanía filogenética, es decir, de la distancia evolutiva entre la especie para la cual fueron diseñados los cebadores y la especie que se quiere estudiar con tales secuencias.

Un caso particular lo presentan los EST-SSR, microsatélites que forman parte de secuencias codificantes que se expresan (genes), que si bien tendrían un nivel de polimorfismo menor por estar contenidos en

secuencias más conservadas, serían más fácilmente transferibles entre especies relacionadas (Zhang *et al.*, 2005).

Los primeros antecedentes de estudios moleculares en *Panicum maximum*, atañen a la obtención de marcadores moleculares (AFLP y RAPD) ligados al carácter de la apomixis, con el fin de determinar cuáles son los genes que controlan tal proceso (Ebina & Nakagawa, 2001; Ebina *et al.*, 2005).

Posteriormente, Ebina y colaboradores (2007), Chandra & Tiwari (2010) y De Sousa y colaboradores (2011), analizaron la variabilidad genética de diferentes cultivares de *P. maximum* Jacq., pertenecientes a la base de germoplasma de Japón, India y Brasil, diseñando marcadores microsatélites (SSR) específicos.

A su vez, Chandra & Tiwari (2010) adaptaron y comprobaron la transferencia de los SSR diseñados en *P. maximum* sobre otras cinco especies del género (*P. coloratum*, *P. antitolate*, *P. sumatransae*, *P. subalbidinum* y *P. turgidum*). Del mismo modo, De Sousa y colaboradores (2011) probaron con éxito la transferencia de los SSR logrados en *P. maximum* pero, esta vez, sobre cuatro especies forrajeras megatérmicas pertenecientes a dos géneros de diferente grado de cercanía filogenética (*Brachiaria sp.* y *Paspalum sp.*).

A fin de establecer una herramienta útil para el análisis molecular de la variabilidad genética existente o para la detección de nueva variabilidad generada en los programas de mejoramiento de *Panicum maximum* Jacq. se propone adaptar (transferir) SSR de otras especies poáceas disponibles en el IGAEF a *P. maximum* Jacq. para caracterizar y/o discriminar genéticamente dentro y entre cultivares.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Origen y cultivo del material vegetal

Para este trabajo se utilizaron dos cultivares comerciales de *Panicum maximum* Jacq., denominados "Gatton Panic" (*P. maximum* cv. Gatton) y "Green Panic" (*P. maximum* var. *trichoglume* cv. Petrie), seleccionados por sus características fenotípicas contrastantes, principalmente, en cuanto al color de la planta y la pubescencia. Además, en el análisis se incorporó un ecotipo local denominado F₂₂B₂, que posee rasgos comunes a ambos cultivares, sugiriendo un caso de cruzamiento o plasticidad fenotípica (Figura 6.2).

Para la obtención del material vegetal se establecieron plantas en el invernáculo a partir de semillas de ambos cultivares comerciales. El primero provino de una muestra cosechada en el 2009, peleteada y comercializada por el semillero Oscar Pemán y Asociados S.A. (Argentina); el segundo fue provisto por la Ing. Agr. Florencia Ortega del Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS-CIAP-INTA), Tucumán. Las semillas fueron sembradas en macetas de barro de 12 cm de diámetro, con un sustrato mezcla de tierra y vermiculita (3:1). Las plantas obtenidas se mantuvieron en condiciones ambientales semicontroladas, con un fotoperiodo de 16 h. de luz a una temperatura anual promedio de 25±5 °C.

El ecotipo local F₂₂B₂ formaba parte de una colecta desarrollada por la Ing. Agr. Ortega en busca de variabilidad genética de *P. maximum* en el NOA. Este material fue multiplicado vegetativamente por división de matas en Tucumán y fue mantenido en el invernáculo en el IGEAF bajo las mismas condiciones ambientales mencionadas.

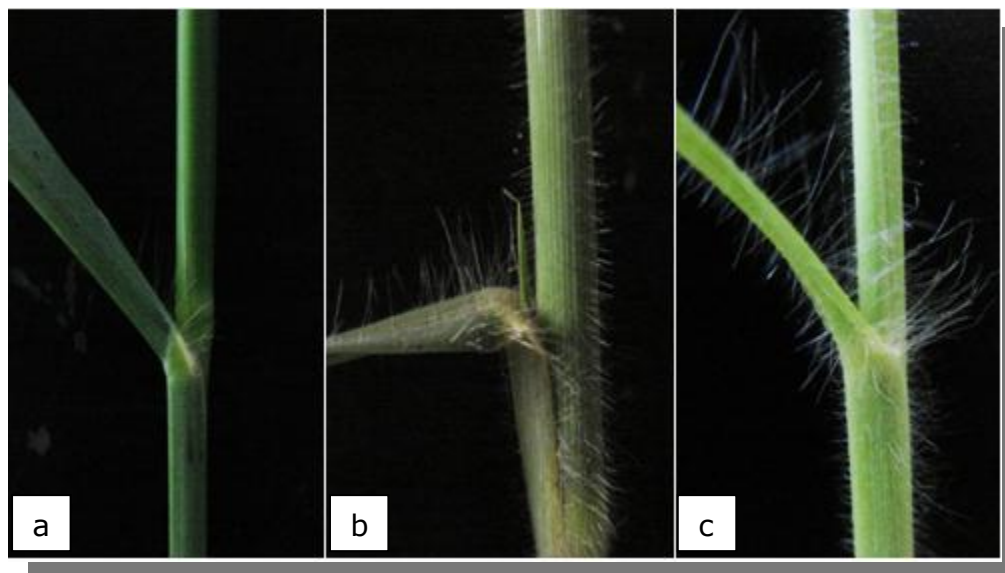


Figura 6.2. Genotipos utilizados. **a.** *Panicum maximum* Jacq. cv Gatton, **b.** ecotipo local "F₂₂B₂", **c.** *P. maximum* Jacq. var. *trichoglume* cv. Petrie

6.2.2. SSR (microsatélites)

6.2.2.1. Extracción de ADN

En una primera aproximación, para extraer el ADN genómico del cv. Gatton se aplicó el método de Puecher y colaboradores (2001)(ANEXO) sobre una muestra de hojas jóvenes (200 mg aprox.), proveniente de un *bulk* conformado por 20 plántulas de 30 días.

Para la obtención de ADN genómico del cultivar comercial "Green Panic" y del ecotipo local F₂₂B₂ se utilizó el método de Saghai-Marooof modificado por Pérez de la Torre y colaboradores (2008)(ANEXO). Se recurrió a este protocolo ya que el material presentaba un estado fenológico avanzado y su contenido de fibras y/o polisacáridos impidió obtener ADN de calidad utilizando el protocolo de Puecher y colaboradores (2001). Se confeccionaron muestras de 500 a 1000 mg de tejido.

La cantidad y calidad de ADN obtenido se evaluó visualmente por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) disuelta en *buffer* TBE 1X

(Tabla 4, Anexo), conteniendo bromuro de etidio (10 mg/ml). Las muestras sembradas correspondieron a 10 μ l de una solución de ADN puro: 2 μ l de ADN stock (25 ng/ μ l), 7 μ l de agua HPLC y 1 μ l de *buffer* de carga (Tabla 5, Anexo). Para la cuantificación por comparación se utilizó como marcador de número de bases y masa ADN del fago λ cortado con la endonucleasa de restricción (GIBCO). Se incluyeron dos calles de 6 y 12 μ l de λ HinD III (33,3 ng/ μ l) (Tabla 6, Anexo) que se calentó por 20 min a 65 °C previo a la siembra. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal con *buffer* TBE 1X manteniendo 45 V constantes. Los geles de cuantificación fueron visualizados por fluorescencia con luz UV en un equipo G:BOX Chemi (Syngene). Eventualmente, se evaluó, de igual forma, la calidad de las diluciones realizadas a partir de las muestras de ADN previamente cuantificadas por Nanodrop.

6.2.2.2. Amplificación mediante la PCR

6.2.2.2.1. SSR

Para la caracterización molecular de *Panicum maximum* Jacq. se utilizó un total de 32 SSR. Entre ellos, 12 SSR fueron desarrollados para *Panicum*: 6 SSR (Chandra y Tiwari, 2010) y 6 SSR (Ebina *et al.*, 2007); 16 SSR desarrollados para Moha (*Setaria italica*) (www.ncbi.nlm.nih.gov); 2 SSR desarrollados para Festuca (*Schedonorus arundinaceus*) en la Samuel Roberts Noble Foundation (Saha *et al.*, 2002); 1 SSR desarrollado en maíz (*Zea mays*) (<http://www.agron.missouri.edu>) y 1 SSR obtenido en raigrás perenne (*Lolium perenne*) (Jones, 2001) (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. SSR.

Nombre	Motivo	Primer	Secuencia	Tamaño esperado (bp)*
Panicum				
GJ-11	(CATG)3	F	GAGAGAGAGAGAGAGAGCCCAA	377
		R	ATTCATGGACGGATGGTCTATT	
GJ-12	(ATCAC)2	F	TTCATTGGTACATACAGCAGCC	243
		R	CAGAGTCCAAGAGGAGAACCAT	
GJ-13	(GTGAT)2	F	TACAAAGATTCGGTTTGGAGGT	386
		R	TTCATTGGTACATACAGCAGCC	
GJ-27	(CT)8	F	ATGACGATCCTACTACCGCCT	159
		R	GTACAGAAAAGCGAAAGGAAGC	
GJ-39	(AG)5	F	GTACAGAAAAGCGAAAGGAAGC	189
		R	GCCATTACCAATCACCAGCTA	
GJ-41	(CGCCTC)2	F	GAAATCCTCTGATCCTCTCTGC	318
		R	GGAAGCAAGCAAAGCTGTAGT	
GNK01-5	(AG)10	F	TGAGAGTTGCATTATCCTTAG	233
		R	TATCTAGGTGCCTATCTACTT	
GNK02-2	(AG)11	F	TCTGCGCTGCGAGTTTC	150
		R	AGCTTGCTCATTTGCCTTAGGA	
GNK02-3	(AG)23	F	GGCCATCAAGGTA ACTCA	206
		R	GAAATCCGGCTGCTGGTTATA	
GNK05-1	(AG)7	F	GCAAGCCCAA ACTGGTAC	130
		R	CTGGCAAAGGAGAAGACATAA	
GNK03-e19	(AG)8T(AG)7	F	TGTATGAGCTGAGTCGC	155
		R	TGGTAATCTAGTTGATATTC	
GNK03-e23	(AT)8	F	AGCTCATCCTTTACGTCA	167
		R	TTTAATCAATATCCATGCTT	
Raygras				
LPSSRH07G05	(TTC)31	F	ACAGTTCATAAGCAGAGTCCCTAA	238
		R	TGCACTAATAACTGCTGCAGAAGA	
Festuca				
NFFa052	N.D.**	F	GTGCTCTTCCTTCCAGTTCC	200
		R	GTGGATCCAACGAATCGAA	
NFFa059	N.D.	F	AACGCTAGCCGTGATGACTT	332
		R	GTCGCCGAGAAGAGAAGAG	
Maiz				
DUPSSR015	N.D.	F	GAAGTCGATCCATCCACC	150
		R	GGGGTAGTGGAGATAACTAGTG	

*Dato reportado en la bibliografía de origen para la especie en donde fue desarrollado el SSR.

**N.D.: No determinado

Tabla 6.2. Continuación

Nombre	Motivo	Primer	Secuencia	Tamaño esperado (bp)*
Moha				
29123375	N.D.**	F	TCACTCACCAATCAGCAGT	235
		R	AATAATGTGGAAAGACCCTGT	
29123369	N.D.	F	AGAAAGTTGTAGATTGGGAAGA	346
		R	AATAATGTGGAAAGACCCTGT	
30351051	N.D.	F	ACTATGTGGTGGAGGGCGGT	279
		R	GATGATAAGAGGCAGGAGTG	
22002767	N.D.	F	TACTTGACTGCTCACACCTTC	376
		R	TTGTCCTTGTAAATCCACTCC	
22002467	N.D.	F	TTTACATCCGAGTGCTGTG	332
		R	GCAAGAAAGAGTTCAGTAGGG	
62318481	N.D.	F	ACTGAACATAGCATACAACATAC	397
		R	TCTCTTCTTCTTTCTCTTTC	
62318482	N.D.	F	AAATGGTGTCCCAATGCC	310
		R	ATGCCTTTCTTCTTGTCTT	
62318482	N.D.	F	TGGAGAAGAAACAAGAAGAAA	328
		R	TTTGGATGGGAGGCTAAA	
62318483	N.D.	F	TATGCCTCAAACCAACATCC	333
		R	ACTCCCTTCCAATGATACAAC	
62318483	N.D.	F	TGCTGCTGGTTATGTTGG	375
		R	AAATGAGGATGATGGACAAG	
62318483	N.D.	F	TCTTGTGCTTTCTTATGGTGT	369
		R	TGGACAGTTTCATTCTCTTCT	
62318488	N.D.	F	TTTACATCCGAGTGCTGTG	333
		R	GCAAGAAAGAGTTCAGTAGGG	
62316489	N.D.	F	ACTGAACATAGCATACAACATAC	397
		R	TCTCTTCTTCTTTCTCTTTC	
62318490	N.D.	F	CTTGTGCTTTCTTATGGTGTG	240
		R	GACATCCCTTCCAATGATAC	
15558946	N.D.	F	AGAAAGTTGTAGATTGGGAAGA	286
		R	GAGAGCGACTGAGACACC	
20257596	N.D.	F	CCACCGCCACAGCCATCT	252
		R	CACCTCGTAGCACTCCTG	

*Dato reportado en la bibliografía de origen para la especie en donde fue desarrollado el SSR.

**N.D.: No determinado

6.2.2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl; usando 3–5 µl de ADN genómico (25 ng/µl); 2 µl de *buffer* de PCR 10X (Invitrogen) (Anexo VIII.5.1); 1,5–2,5 µl de Cl₂Mg (25 mM); 3 µl por cada uno de los cebadores SSR (f y r) (20 ng/µl); 0,3 µl de los cuatro dNTP (10 mM); 0,1 µl de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen) (5 U/µl) y completar el volumen con agua calidad HPLC. (Anexo VIII.5).

- *Determinación de temperatura de apareamiento de los cebadores*

Luego de probar sin buenos resultados los ciclados indicados en las citas correspondientes se decidió realizar el ajuste mediante la determinación de las temperaturas óptimas de apareamiento (*annealing*) de los cebadores. Para ello, ya que los mismos poseían menos de 20 pb, primero se calculó la temperatura de fusión (*melting*) de cada uno (*forward* y *reverse*) según la Fórmula de Wallace:

$$T_m^{\circ} = 2x(A+T) + 4x(G+C)$$

Ecuación 6.1

Luego se calculó la temperatura de hibridación (T_a°) ~ 4 °C menos que la T_m° . De este modo, se agruparon los cebadores en ciclados de PCR con similar temperatura. Si los patrones de bandas no eran claros o fácilmente discernibles se hicieron pruebas variando las condiciones de la reacción de PCR (principalmente, concentración de Cl₂Mg y concentración de ADN). Para ajustar las condiciones de amplificación de los diferentes pares de cebadores y evaluar los ADN de las muestras se utilizó el termociclador Mastercyclerep/Eppendorf.

- *Condiciones de amplificación*

Para los cebadores SSR con $T_a \sim 60$ °C (GJ-11, GJ-12, GJ-13, GJ-27, GJ-39, GJ-41) se utilizó el ciclado:

1 ciclo de 3 minutos a 94 °C (desnaturalización)

45 ciclos de:

1 minuto para desnaturalizar el ADN a 94 °C,

1 minuto para hibridar los cebadores a 60 °C,

2 minutos a 72 °C (extensión)

1 ciclo de 10 minutos a 72 °C (terminación).

4 °C-∞

Para los cebadores SSR con $T_a \sim 50$ °C (GNK01-5, GNK02-2, GNK02-3, GNK05-1, GNK03-e19, GNK03-e23, LPSSRH07G05, NFFa052, NFFa059, DUPSSR015) se utilizó el ciclado:

1 ciclo de 1 minuto a 94 °C (desnaturalización)

40 ciclos de:

30 segundos para desnaturalizar el ADN a 94 °C,

1 minuto para hibridar los cebadores a 50 °C,

2 minutos a 72 °C (extensión)

1 ciclo de 5 minutos a 72 °C (terminación).

4 °C-∞

Para los cebadores SSR diseñados en *Setaria italica* (Ver SSR, SSR Moha) se utilizó el ciclado desarrollado en el laboratorio.

1 ciclo de 4 minutos a 94 °C (desnaturalización)

24 ciclos de:

30 segundos para desnaturalizar el ADN a 94 °C,
30 segundos para hibridar los cebadores a 62 - 51 °C
1 minutos a 72 °C (extensión)

} reducir 1 °C
} c/2 ciclos
} hasta 51 °C

30 segundos a 50 °C

1 minutos a 72 °C (extensión)

1 ciclo de 5 minutos a 72 °C (terminación).

4 °C-∞

6.2.2.2.3. Geles de agarosa MetaPhor

Para verificar la amplificación de los SSR se analizó una alícuota del producto de PCR (10 µl) en geles de agarosa *MetaPhor* 2% en *buffer* TBE 1X (45 mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8.0) con el agregado de bromuro de etidio (10 mg/ml). A cada alícuota se le agregó 1 µl de *buffer* de carga *Orange Green* (Tabla 7, Anexo). Se utilizó *Orange Green* 10X ya que con el *loading buffer* 10X coincidiría el frente de corrida con el rango del tamaño de bandas esperadas complicando su resolución. La electroforesis se realizó con *buffer* TBE 0,5X con una fuente de potencia a 50 V constante por 75 minutos. Se visualizaron los geles con luz UV y estimaron los tamaños de los productos amplificados por comparación con 0,7 µg del marcador de pares de bases 100 pb DNA Ladder Invitrogen (Tabla 8, Anexo).

6.2.2.2.4. Geles de poliacrilamida

Para verificar la amplificación de los SSR con mayor resolución y separación de bandas se analizó una alícuota del producto de PCR (10 µl) en geles de poliacrilamida al 6% (ANEXO). A cada alícuota se le agregó 1 µl de *buffer* de carga *Orange Green*. Las muestras fueron sembradas junto con

el marcador de pares de bases 100 pb Marker (Invitrogen). La electroforesis se realizó con 1,5 litros aprox. de *buffer* TBE 0,5X en cuba vertical, refrigerados con agua corriente en circulación, a 200 V constantes durante 2 horas o hasta que el frente de corrida llegue al borde inferior del gel.

Para el revelado los geles, se sumergieron en Bromuro de etidio durante 30 minutos.

La lectura de los geles se realizó a simple vista, identificando los patrones de los diferentes *loci* amplificados exponiendo el gel a la luz UV en un transiluminador (ultraviolet products LTD).

Se seleccionaron sólo las bandas reproducibles y dentro de un rango comprendido entre 100 y 400 pb. La captación de imágenes se realizó después de anotar la presencia o ausencia de bandas en el gel, dado que el tiempo transcurrido entre la anotación de bandas y la captación de las imágenes puede derivar en la pérdida de alguna de ellas.

6.2.2.2.5. Análisis estadístico

- *Construcción de la matriz básica de datos (MBD)*

Para estimar las relaciones genéticas entre los genotipos, se midieron datos discretos, generados por los marcadores moleculares microsatélites que se codificaron en forma binaria (presencia 1/ ausencia 0 de banda) para su posterior análisis matemático.

Los datos se ordenaron en una Matriz Básica de Datos (MBD). Para ello, se consideró a cada genotipo como una fila y a cada cebador como una columna. Si un cebador produjo más de una banda se registró en columnas independientes.

El programa que se utilizó para el análisis estadístico fue INFO-GEN/P *versión 2006i.1* (Balzarini & Di Rienzo, 2003). INFO-GEN es un software

desarrollado por docentes-investigadores de Estadística y Biometría con sede en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, orientado al análisis estadístico de datos genéticos y su aplicación en el Mejoramiento Genético Vegetal.

- *Matriz de distancia genética*

La distancia entre datos genotípicos fue calculada a partir del índice de similitud *Jaccard*, considerando que la misma se expresa matemáticamente como 1-S:

$$S = a/(a+b+c)$$

Ecuación 6.2

a: número de bandas presentes en ambos individuos i_1 e i_2 donde ambas accesiones coinciden en el 1.

b: número de bandas donde la primera accesión tiene un 1 y la otra un 0.

c: número de bandas donde la primer accesión tiene un 0 y la otra un 1.

El índice de similitud de *Jaccard* siempre dará un valor de asociación menor que el índice de similitud *Dice*, por lo que es usado para especies de menor diversidad genética.

Con estos valores se generó una matriz llamada "matriz de distancia" y así se pudo ver el grado de distancia entre los genotipos. Se considera que dos individuos son más parecidos cuanto más bandas presenten en común.

- *Clasificación: agrupamiento de muestras*

La matriz de distancia obtenida fue sujeta al análisis de agrupamiento jerárquico o *cluster*. El objetivo de este análisis fue formar grupos tales que los elementos de un grupo sean más parecidos entre sí que con los

elementos de otro grupo. Así se buscó clasificar en grupos lo más homogéneos posible. Hay numerosos algoritmos disponibles con esta finalidad. En este trabajo se usó el conocido como UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages*) (Avice, 1994) incluido en el paquete estadístico INFO-GEN versión/P 2006i.1.

Se visualizó el agrupamiento obtenido a través de un dendograma. El mismo se presentó acompañado del coeficiente de correlación cofenético, el cual mide la correlación entre las interdistancias en el dendograma y las interdistancias en la matriz de distancia sobre la que se aplicó el procedimiento.

- *Contenido de información polimórfica (PIC)*

El grado de polimorfismo medido para cada *locus* microsatélite evaluado fue cuantificado por medio del Índice de Contenido Polimórfico (PIC), según la fórmula de Botstein y colaboradores (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Ecuación 6.3

Donde P es la frecuencia de la banda j para el marcador i.

6.3. Resultados

La calidad y cantidad de ADN obtenido para cada muestra fue analizada en geles de agarosa 0,8%. El ADN que se obtuvo no presentó degradación ni evidenció chorreados. La cuantificación fue realizada comparando la intensidad de las bandas con estándares de masas conocidas (Anexo, Tabla 6). Así fue estimada la concentración de ADN para cada muestra.

Las muestras de ADN resuspendido en 100 μ l de *buffer* TE presentaron concentraciones entre 50-200 ng/ μ l. Por último, se realizaron diluciones con agua HPLC de cada muestra en particular para llegar a la concentración de trabajo de 25 ng/ μ l, aproximadamente. Eventualmente, las muestras primero se cuantificaron por Nanodrop, para luego sembrar directamente las diluciones de trabajo realizadas y corroborar su calidad. Se efectuaron diluciones en un rango de 1/2 a 1/10, dependiendo de la concentración medida en cada muestra (Figura 6.3).

De los 32 cebadores SSR probados 16 permitieron obtener fragmentos de amplificación de buena calidad visualizados en gel de agarosa 2%. Entre ellos, 6 correspondieron a la transferencia desde otras especies: 1 SSR de Festuca (*Schenodorus arundinaceus*), 4 SSR de Moha (*Setaria italica*) y 1 SSR de Maiz (*Zea mays*). En la Figura 6.4 se observa la amplificación de un SSR de Moha transferido a *P. maximum* frente a otro que no presentó amplificación, sobre el mismo material. Se corroboró la funcionalidad de cada SSR en la PCR mediante la inclusión de ADN propio de cada especie como control positivo.

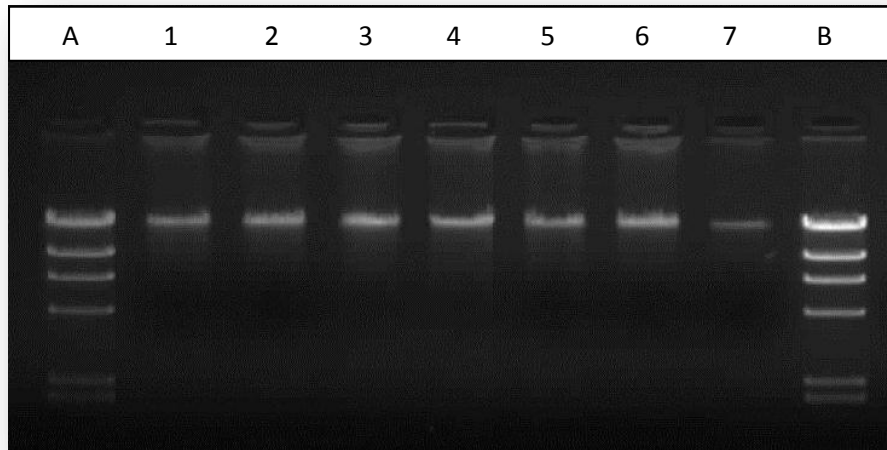


Figura 6.3. Cuantificación de ADN. Gel de agarosa 0,8% para la evaluación de muestras de ADN obtenido de un *bulk* del cultivar “Gatton Panic”.

Las entradas 1-6 son diluciones 1/5 del stock de ADN

La entrada 7 es una dilución 1/10 del stock de ADN

Las entradas A y B corresponden al ADN del fago lambda digerido con la enzima Hind III (100 ng y 200 ng, respectivamente).

A pesar del éxito de la transferencia, los 6 SSR observados en geles de poliacrilamida 6% de alta resolución resultaron monomórficos y, por lo tanto, no informativos.

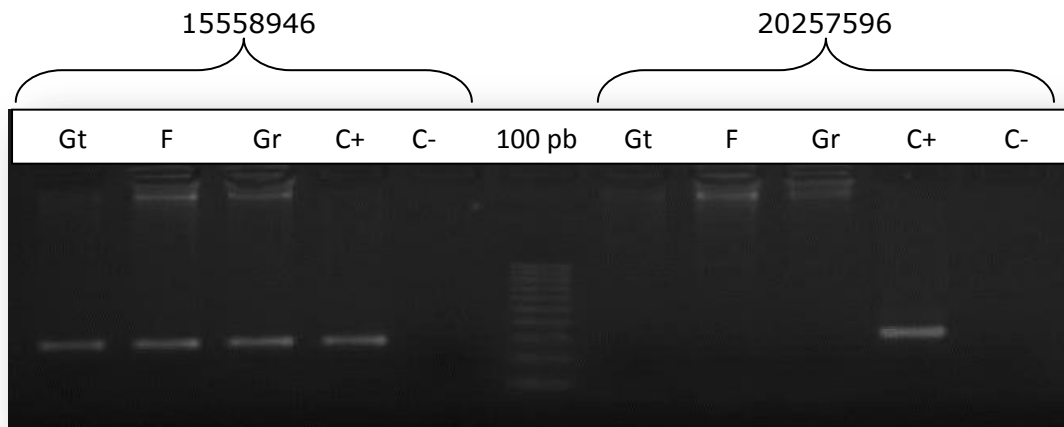


Figura 6.4. Electroforesis en gel de agarosa. Productos de amplificación de la PCR con SSR de *Setaria italica* en *Panicum maximum* Jacq. Gel de agarosa Metaphor 2% con EtBr (0,5 g/l). Gt: “Gatton Panic”, F: F₂₂B₂, Gr: “Green Panic”. C+: *Setaria italica*, C-: MIX

Por otro lado, 8 de los 10 cebadores SSR diseñados específicamente para *Panicum maximum* Jacq., resultaron informativos evidenciando polimorfismo (Figura 6.5).

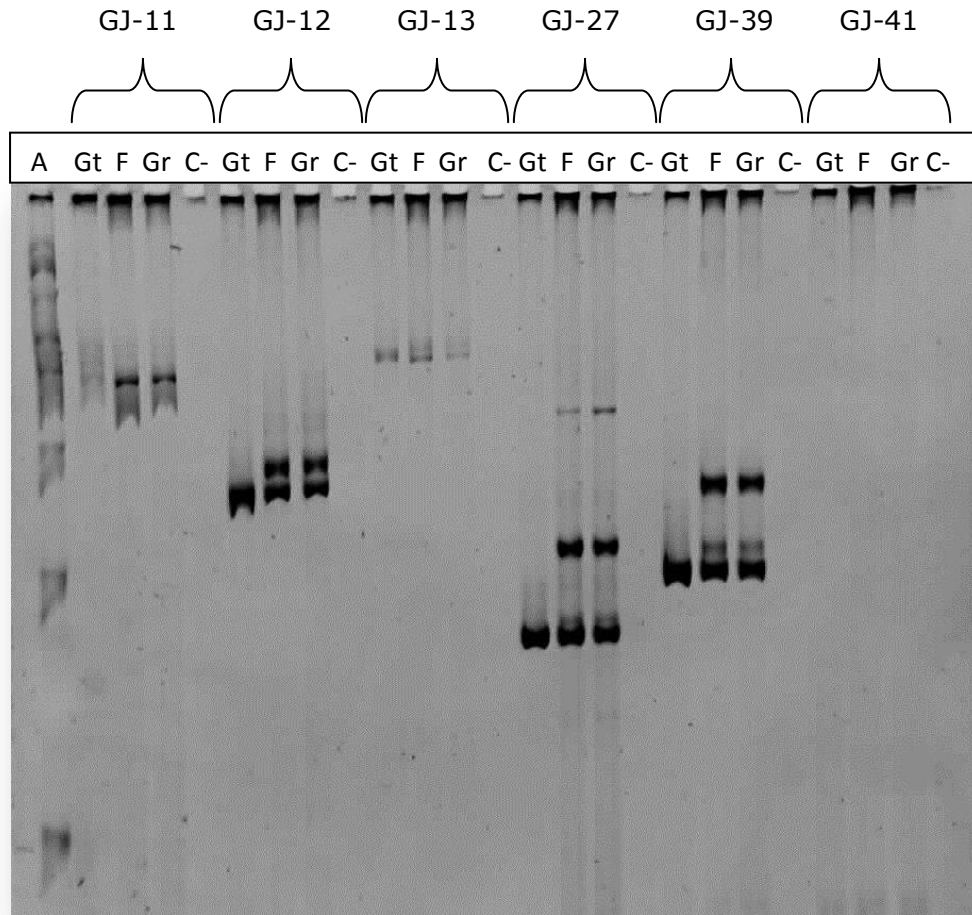


Figura 6.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Productos de amplificación de PCR de SSR de *Panicum maximum* Jacq. Gel de poliacrilamida 6% con EtBr (0,5 g/l). A: marcador de número de bases 100 bp Marker (Promega). Gt: "Gatton Panic". F: F₂₂B₂. Gr: "Green Panic". C-: MIX

Los datos obtenidos de las lecturas de los geles se codificaron en forma binaria y ordenaron en una Matriz Básica de Datos (MBD). Para ello, se consideró a cada genotipo como una fila y a cada cebador como una columna (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Matriz Básica de Datos (MBD) parcial. SSR de *P. maximum*.

	GJ-11A	GJ-11B	GJ-12A	GJ-12B	GJ-13A	GJ-13B	GJ-13C	GJ-27A	GJ-27B	GJ-39A	GJ-39B	GJ-39C	K01-5	K02-2A	K02-2B	K02-3A	K02-3B	K05-1A	K05-1B	K03-e19A	K03-e19B
GT	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
F	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
GR	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0

Gt: "Gatton Panic", F: $F_{22}B_{27}$, Gr: "Green Panic"

Del análisis se desprende que el 50% de la totalidad de los marcadores SSR probados generó 27 productos de amplificación, y un 25% resultaron polimórficos mostrando un 55,56% de bandas polimórficas. El promedio de bandas por SSR fue de 1,69 y el contenido de información polimórfica (PIC) de 0,35 (Tabla 6.4 y 6.5).

Tabla 6.4. Descripción de datos de SSR amplificados.

Resumen	Datos
Muestras	3
Muestras duplicadas	1
Bandas (número)	27
Patrón bandas duplicadas	15
Bandas monomórficas	12
Bandas polimórficas (%)	55,56
Cebadores	16

Tabla 6.5. Descripción de datos de SSR informativos.

Cebador	BP	BM	BT	PIC
GJ-11	2	0	2	0,35
GJ-12	1	1	2	0,35
GJ-13	3	0	3	0,35
GJ-27	1	1	2	0,35
GJ-39	2	1	3	0,35
K02-2	2	0	2	0,35
K05-1	2	0	2	0,35
K03-e19	2	0	2	0,35

BP: bandas polimórficas, BM: bandas monomórficas, BT: bandas totales,
PIC: contenido de información polimórfica

Posteriormente, la MBD se tradujo a una matriz de distancias genéticas basada en el coeficiente de similitud de *Jaccard* (Tabla 6.6), la que permitió realizar un “análisis de agrupamiento” utilizando el método UPGMA.

Tabla 6.6. Matriz de distancia y similitud *Jaccard* (1-S) de SSR de *P. maximum*.

<i>Distancia: (Jaccard (1-S))</i>			
<i>Correlación cofenética= 1,000</i>			
<i>Variables estandarizadas</i>			
Jaccard (1-S)			
	GT	F	GR
GT	0,00		
F	0,56	0,00	
GR	0,56	0,00	0,00
Matriz de distancias ultramétricas			
	GT	F	GR
GT	0,00		
F	0,56	0,00	
GR	0,56	0,00	0,00

El resultado se representó en forma de dendograma (Figura 6.6).

Por medio de esta técnica se diferenció a los dos cultivares comerciales “Gatton Panic” y “Green Panic” a una distancia genética de 0,56. Por el contrario, no se encontró diferencias entre este último y el ecotipo local “F₂₂B₂”.

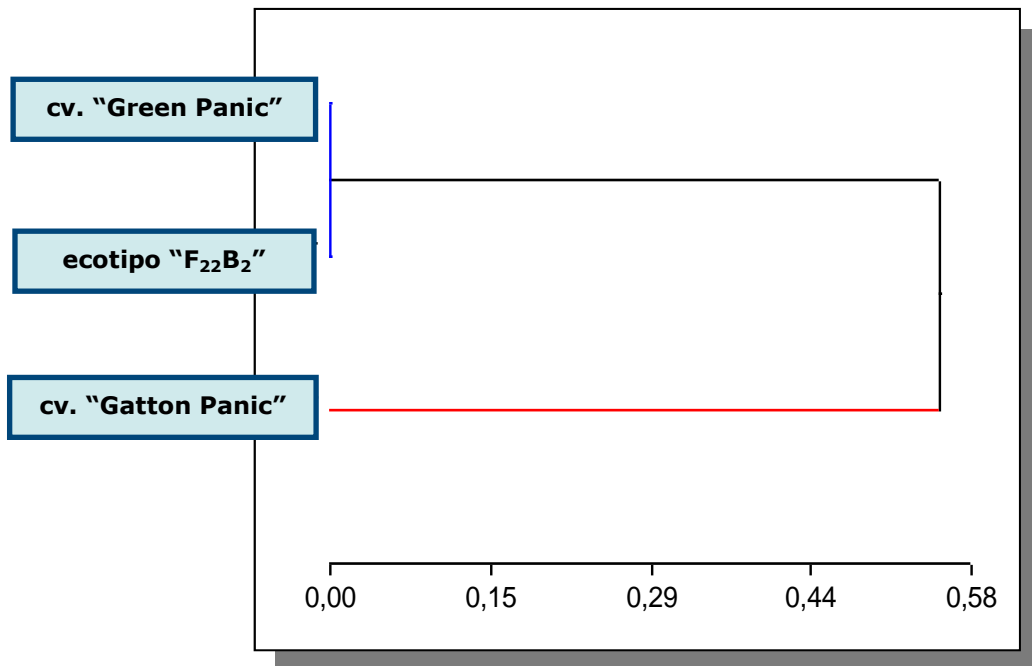


Figura 6.6: Dendrograma obtenido por análisis *cluster* (UPGMA), basado en el coeficiente de similitud de *Jaccard* (1-S)

6.4. Discusión

Para la extracción de ADN, la mayoría de los trabajos realizados en *Panicum sp.* utilizaron el método de CTAB (Murray & Thompson, 1980) o con modificaciones (Doyle & Doyle, 1990; Hoisington *et al.*, 1994). Esta metodología, al igual que el método descrito por Puecher y colaboradores (2001) utilizado en el laboratorio, requiere material vegetal joven, con baja presencia de fibras y polisacáridos (Ebina & Nakagawa, 2001; Ebina *et al.*, 2007; Chandra & Tiwari, 2010; De Sousa *et al.*, 2011). En esta tesis se utilizaron ejemplares de avanzado estado de desarrollo (ecotipo F₂₂B₂) por lo que se recurrió al método de extracción de ADN de Saghai-Marroof modificado por Pérez de la Torre y colaboradores (2008). Por medio de esta metodología se logró obtener con éxito ADN de calidad salvando los inconvenientes mencionados anteriormente (Figura 6.3).

Para realizar estudios de variabilidad inter e intrapoblacional mediante SSR es necesario seleccionar y utilizar los marcadores que presenten mayor poder de discriminación y elevado contenido de información polimórfica (PIC) que permita detectar diferencias entre los individuos. Así, un PIC igual a 0 indica que el marcador en cuestión es monomórfico y un PIC alto (por ejemplo, mayor a 0,7) indica que el marcador en cuestión es altamente polimórfico y que tal polimorfismo está distribuido uniformemente entre los individuos estudiados. En el trabajo realizado, los SSR informativos demostraron valores de PIC de 0,35 (Tabla 6.5) lo que indica un grado intermedio de polimorfismo. Si bien en esta tesis fue posible discriminar los genotipos estudiados utilizando pocos SSR (Figura 6.6), por medio de la utilización de los mismos frente a un mayor número de cultivares o ecotipos se obtendría mayor información en

cuanto al poder de análisis de cada marcador. Asimismo, el bajo número de genotipos evaluados determinó que se obtuviera una correlación cofenética extremadamente alta ($=1$), en la realización del dendograma de distancias genéticas (Tabla 6.6).

Por otro lado, se observó que la mayoría de los SSR amplificados que resultaron polimórficos estaban conformados por repeticiones de dinucleótidos. Este resultado concuerda con la teoría de que los SSR de mayor simplicidad en su composición nucleotídica tienen mejor adaptabilidad (Varshney *et al.*, 2005). En cereales los autores reportaron que los trinucleótidos se encuentran en una frecuencia de 54–78%, seguidos por los dinucleótidos, 17,1–40,4%.

De igual modo, al comparar a los EST-SSR con los SSR genómicos, los mismos señalaron que, los primeros a pesar de ser más robustos, conservados y transferibles, son menos eficientes para distinguir genotipos estrechamente relacionados, debido al menor nivel de polimorfismo. En este trabajo se utilizó en su mayoría SSR genómicos, a pesar de ello los 3 genotipos analizados no pudieron distinguirse entre sí por completo.

En relación al análisis realizado, Chandra & Tiwari (2010) diseñaron 15 SSR genómicos específicos que resultaron polimórficos, lo que les permitió estudiar y distinguir 34 accesiones de *P. maximum*. Sin embargo, observaron que 2 genotipos presentaban el 100% de similitud, por lo que postularon que los mismos podrían ser accesiones duplicadas. De igual modo, Ebina y colaboradores (2007) también hallaron una accesión duplicada entre los 77 genotipos de *P. maximum* analizados. En nuestro trabajo, si bien 2 genotipos presentaron 100% de similitud, el bajo tamaño de la muestra analizada no permitiría arribar a tal conclusión.

De esta manera, Chandra & Tiwari (2010) consiguieron transferir los SSR a 5 especies del mismo Género. Mientras que, De Sousa y colaboradores (2011) también lograron la transferencia de 20 SSR diseñados en *P. maximum*, pero sobre 4 especies de gramíneas tropicales del género *Brachiaria sp.* y *Paspalum sp.* En un sentido inverso, en esta tesis se pudo transferir con éxito SSR específicos desarrollados en otras especies hacia *P. maximum*, especialmente y en mayor número provenientes de *Setaria italica*. Esta especie comparte la misma tribu Paniceae, corroborando el mayor poder de transferibilidad de los marcadores SSR procedentes de especies de mayor relación filogenética.

6.5. Conclusión

En esta tesis se realizó de forma exitosa la transferencia de SSR diseñados en otras especies poáceas sobre *Panicum maximum* Jacq.

Con los marcadores moleculares microsatélites utilizados y adaptados en este estudio no se podría afirmar que el ecotipo local "F₂₂B₂" y el cultivar "Green Panic" poseen diferente constitución genética. De este modo, el cultivar "Green Panic" presentaría algún tipo de plasticidad fenotípica, por lo menos, en cuanto al color y la pubescencia.

La adaptación de un mayor número de SSR que evidencien polimorfismos podría utilizarse como una herramienta molecular para la detección de variabilidad y de ayuda al mejoramiento genético clásico.

6.6. Bibliografía

- Balzarini, M. & Di Rienzo, J. (2003). Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Becerra, V. V. & Paredes, M. C. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270-281.
- Botstein D., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314-331.
- Carrera, A., Tranquilli, G., Garayalde, A. & Helguera, M. (2010). Aplicaciones de los marcadores moleculares. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginsky. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. (III-2). (pp. 311-324). Buenos Aires: INTA.
- Chandra, A. & Tiwari, K. K. (2010). Isolation y characterization of microsatellite markers from guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) for genetic diversity estimate and cross-species amplification. *Plant Breeding*, 129, 120-124.
- De Sousa, A. C. B., Jungmann, L., Campos, T., Sforcad, A., Boaventura, L. R., Silva, G. M. B., Zucchi, M. I., Jank L. & Souza, A. P. (2011). Development of microsatellite markers in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species. *Plant Breeding*, 130, 104-108
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

- Ebina, M. & Nakagawa, H. (2001). RAPD Analysis of apomictic and sexual lines in Guineagrass (*Panicum maximum* jacq.). *Grassland Science*, 47 (3), 251-255.
- Ebina, M., Kouki, K., Tsuruta, S., Akashi, R., Yamamoto, T., Takahara, M., Inafuku, M., Okumura, K., Nakagawa, H. & Nakajima, K. (2007). Genetic relationship estimation in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) assessed on the basis of simple sequence repeat markers. *Grassland Science*, 53, 155-164.
- IAEA/FAO. (2011). *Molecular characterization of mutant germplasm. A manual*. Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Viena: Autor.
- Hoisington, D., Khairallah, M. & González de León, D. (1994). *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. (2nd. Ed.). D. F., México: CIMMYT.
- Jones, E. S., Dupal, M. P., Kölliker, M. C., Drayton, M. C. & Forster, J. W. (2001). Development of and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) *Theor. Appl. Genet.*, 102, 405-415.
- Martínez, M. C.; Helguera, M. & Carrera, A. (2010). Marcadores Moleculares. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginsky. *Bioteconología y mejoramiento vegetal II*. (I-5). (pp. 70-85). Buenos Aires: INTA.
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of highmolecular-weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, 8, 4321-4325.
- Pérez de la Torre, M., Zirilli, P., Rodríguez, M. & Escandón, A. (Noviembre, 2008). Análisis de la variabilidad genética utilizando marcadores

moleculares en el género *Mecardonia*. 4^o Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 10^a Jornadas Nacionales de Floricultura, (pp. 409–414). Corrientes: INTA-UNNE.

Puecher, D., Robredo, C., Rios, R. & Rimieri, P. (2001). Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 121, 229-236.

Sala, C., Bulos, M., Fresco, A. & Altieri, E. (2010). Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginsky. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. (III-3). (pp. 325-337). Buenos Aires: INTA.

Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology* 23(1), 48-55.

Zhang, L. Y., Bernard, M., Leroy, P., Feuillet, C., & Sourdille, P. (2005) High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theor. Appl. Genet.* 111, 677–687.

6.7. ANEXO

6.7.1. Protocolos de extracción de ADN genómico vegetal

6.7.1.1. Puecher y colaboradores (2001)

A- Liberación del ADN total de la estructura celular.

1. Macerar aproximadamente 200–250 mg de tejido fresco (hojas jóvenes) en mortero de porcelana enfriado con nitrógeno líquido para minimizar la degradación de los nucleótidos.
2. Trasvasar el tejido molido con espátula de madera, previamente enfriada, a un tubo de 2 ml enfriado en hielo, llenándolo hasta 1/3 del mismo.
3. Agregar 810 µl de *buffer* de extracción (Tabla 1, Anexo) sin CTAB calentado a 65 °C, mezclar con vortex, calentar la muestra a 65 °C y luego agregarle 90 µl de CTAB 10%, mezclar con vortex e incubar a 65 °C durante 30 minutos con agitación suave y continua.

B. Lavado con cloroformo:octanol para remover el CTAB.

4. Destapar el tubo durante 5 minutos para permitir que la temperatura descienda, y luego agregarle 450 µl de cloroformo:octanol (24:1). Mezclar la muestra por inversión durante 10 minutos hasta obtener una emulsión.
5. Centrifugar la emulsión durante 30 minutos a 14000 rpm, a temperatura ambiente.

C- Degradación de ARN.

6. Trasvasar la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml, agregar 5 µl de ARNasa (10 mg/ml). Mezclar la solución suavemente por inversión, durante 5 minutos e incubar 60 minutos a 37 °C.

D- Desnaturalización de proteínas

7. Agregar 450 μ l de cloroformo:octanol (24:1). Mezclar suavemente por inversión durante 10 minutos hasta obtener una emulsión.
8. Centrifugar durante 30 minutos a 14000 rpm, a temperatura ambiente.
9. Trasvasar la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml.

E- Precipitación

10. Precipitar el ADN agregando 600 μ l de isopropanol frío (-20 °C). Mezclar suavemente por inversión.
11. Realizar un "spin" de centrífuga para precipitar la medusa de ADN.

F- Lavado para eliminar isopropanol

12. Descartar el sobrenadante y agregar 500 μ l de etanol 70% frío (-20 °C), dejarlo durante 30 minutos despegando el precipitado para un mejor contacto con el alcohol.
13. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
14. Descartar el alcohol y dejar secar el precipitado durante 10 minutos en flujo laminar.

G- Resuspensión

15. Realizar la resuspensión del ADN en 100 μ l de agua calidad HPLC o *buffer* TE (Tabla 2, Anexo) y dejar solubilizar a 4 °C por 24 horas para su posterior cuantificación. El stock de ADN se guarda a una temperatura de -20 °C.

6.7.1.2. Sanghai-Marroof modificado – M. Pérez de la Torre y colaboradores (2008)

A- Liberación del ADN total de la estructura celular.

1. Precalentar 1,1 ml/muestra de *buffer* de extracción CTAB (Tabla 3, Anexo) con 2% de β -mercaptoetanol a 65 °C.
2. Pesar 30-40 mg (2 puntas de espátula) de la muestra liofilizada en un tubo de 2 ml.
3. Agregar 1000 μ l del *buffer* de extracción precalentado (Paso 1). Agitar (Vortex).
4. Incubar a 65 °C por 2 horas en baño termostático con agitación.

B- Lavado con cloroformo:octanol para remover el CTAB.

5. Agregar un volumen de cloroformo:octanol. Agitar y liberar vapores.
6. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm a 2 °C.
7. Separar el sobrenadante en un tubo de 2 ml (Se puede repetir centrifugando por 5 min)

C- 1ª Precipitación

8. Precipitar con medio volumen de isopropanol frío.
9. Incubar por 30 min a -20 °C. (Se puede mantener overnight)
10. Centrifugar a 13.500 rpm por 40 min a 2 °C.
11. Descartar el sobrenadante.
12. Resuspender en 250 μ l de *buffer* TE 1X hasta disolver. De ser necesario llevar a baño termostático (55 °C) hasta disolución total de ADN.

D- Degradación de ARN.

13. Agregar 2,5 μ l de ARNasa A (10 mg/ml) o 1% del volumen de resuspensión. Agitar.

14. Incubar 30 min a 37 °C o 1 h a temperatura ambiente.

E- Desnaturalización de proteínas

15. Agregar un volumen de fenol. Agitar (liberar vapores).

16. Centrifugar 10 min a 13.500 rpm a 2 °C. Separar la fase acuosa en un nuevo tubo de 1,5 ml.

17. Agregar un volumen de *buffer* TE 1X al tubo del fenol. Agitar (liberar los vapores).

18. Centrifugar 10 min a 13.500 rpm a 2 °C. Separar la fase acuosa y agregarla al tubo anterior de 1,5 ml.

19. Agregar un volumen de cloroformo:octanol. Agitar. (liberar los vapores).

20. Centrifugar 10 min a 13.500 rpm a 2 °C. Separar el sobrenadante. Repetir este paso, de ser necesario, centrifugando por 5 min.

F- 2ª Precipitación

21. Precipitar con 5% (volumen de sobrenadante) de NaCl 5 M y medio volumen de isopropanol frío. (En este orden)

22. Incubar a -20 °C por 30 min (Se puede mantener overnight)

23. Centrifugar 40 min A 13.500 rpm a 2 °C.

24. Descartar el sobrenadante.

G- Lavado para eliminar isopropanol.

25. Agregar 500 µl de etanol 70%. Centrifugar a 13.500 rpm por 2 minutos.

26. Descartar el sobrenadante y repetir el paso anterior.

27. Descartar el sobrenadante y secar invertido.

H- Resuspensión

28. Resuspender en cantidad necesaria de *buffer* TE 1X hasta disolver. De ser necesario llevar a baño termostático (55 °C) hasta disolución total del ADN.

29. Conservar a – 20 °C.

6.7.2. Insumos para la extracción de ADN y la transferencia de SSR.

Tabla 1: *Buffer* de extracción

STOCK	X1 (900 µl)
TRIS 1 M (pH 8)	90 µl
EDTA 0,5 M (pH 8)	90 µl
NaCl 5 M	126 µl
Agua HPLC	495 µl
β-mercaptoetanol 14 M	9 µl

Tabla 2: *Buffer* TE (Tris-EDTA)

STOCK	Concentración Final
TRIS 1 M (pH 8)	10 mM
EDTA 0,5 M (pH 8)	1 mM

Tabla 3: *Buffer* de extracción CTAB 2X

(Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio)

COMPONENTE	VOLUMEN
	[ml]
TRIS 1 M (pH 8)	20
EDTA 0,5 M (pH 8)	20
NaCl 5 M	56
	[g]
CTAB	4
PVP (polivinilpirrolidona)	0,2
Vol. Final: 200 ml (con Agua MilliQ)	

Tabla 4: Buffer TBE 10X

STOCK	
Tris base	216 g
Ácido bórico	110 g
EDTA 0,5 M (pH 8)	80 ml
Vol. Final: 2000 ml (con Agua MilliQ)	

Tabla 5: Buffer de carga 6X

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Azul de Bromofenol	0,25%
Xileno Cianol FF	0,25%
Glicerol 100%*	30%
H ₂ O	70 ml
Vol. Final: 100 ml	

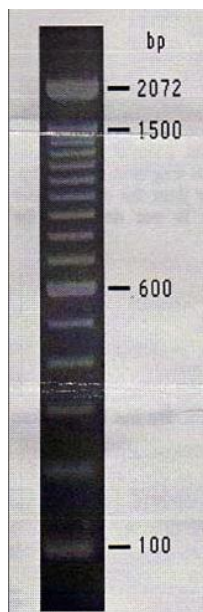
Tabla 6: λ Hind III

Nº de banda	% total	ng por banda
1	48	48
2	19	19
3	14	14
4	9	9
Total		100

Tabla 7: Buffer de carga Orange Green 10X

STOCK	
Ficoll-400	1,25 g
Tris-Cl 1 M (pH 7,4)	0,5 ml
EDTA 0,5 M (pH 8)	1 ml
H ₂ O _d	5 ml
Xileno	12,5 ml
Orange	25 mg

Tabla 8: Número de bases del marcador 100 pb DNA Ladder, Invitrogen.



Geles de Poliacrilamida

Para la preparación de un gel de poliacrilamida utilizar:

Insumos	6%
	1 gel (80 ml)
Acri-bis 40% (19:1)	12 ml
TBE 10X	4 ml
Agua bidestilada	64 ml
Temed	80 µl
APS (35%)*	80/160 µl

* En verano, poner igual volumen de APS que de Temed. En invierno se utiliza el doble para que polimerice más rápido. Se utiliza 4 y 8 ml de TBE 10X correspondientes a 80 y 160 ml de TBE 0,5X.

Armado

Primero, apoyar sobre la mesada un vidrio "grande", arriba los separadores en los laterales y por encima el vidrio "chico" (verificar que las superficies que van hacia adentro enfrentadas repelan el agua, sino ponerles "sigmacote") Encastrar en el marco de plástico blanco y montar sobre la base, previamente nivelada con los tornillos y nivel de burbuja.

Entre la base y los vidrios ubicar la tira de goma gris que impide que se escurra la solución. Ajustar bien todo. Con una pipeta P₅₀₀₀ o jeringa poner agua entre los vidrios para verificar que no pierdan por debajo. Retirar y escurrir bien.

A continuación, poner 80 ml del preparado cuidadosamente por un vértice superior entre los vidrios tratando de no generar burbujas. Luego, si fuera necesario, nivelar el gel con agua agregando un poco de agua y secar el agua con papel de filtro. Sumergir los dientes de los peines cuidadosamente y dejar endurecer. Sacar los peines con cuidado hacia arriba tratando de no romper las calles formadas. Montar los marcos en el armazón portavidrios de la cuba. Introducir en la cuba. Poner 1,5 litros de *buffer* tratando de no generar burbujas debajo y tapar. Conectar la manguera de refrigeración a la canilla, hacer circular agua hasta que salga por la manguera de desagüe.

Preparación de insumos:

- Acri bis 40% (19:1) (200 ml)

Para la preparación de 200 ml, en un vaso de precipitados poner un poco de agua bidestilada y un agitador magnético, agregar cuidadosamente 76 g de Acrilamida y 4 g de Bisacrilamida. Disolver bien y llevar a volumen en probeta. Filtrar y guardar en heladera en botella bien cerrada y rotulada (producto-nombre-fecha).

- APS 35% (100 ml)

Para la preparación de 100 ml, en un vaso de precipitados, disolver 35 g de APS en agua bidestilada. Llevar a volumen en probeta. Rotular (producto-nombre-fecha) y guardar en freezer.

- TBE 10X (2 litros)

Para la preparación de 2 litros, un vaso de precipitados, disolver Tris base 216 g, Ácido bórico 110 g y EDTA (0,5 M ph=8) 80 ml en agua bidestilada. Llevar a volumen en probeta. Poner en botella, rotular (producto-nombre-fecha) y guardar.

- TBE 0,5X (2 litros)

Para la preparación de 2 litros, colocar 100 ml TBE 10X en botella y llevar a volumen con agua bidestilada. Cerrar, agitar un poco, rotular (producto-nombre-fecha) y guardar.

CONCLUSIÓN GENERAL

En esta tesis se desarrollaron y aplicaron diferentes metodologías biotecnológicas para la generación, detección y/o selección de variabilidad genética en relación con la tolerancia al estrés abiótico, principalmente al déficit hídrico y/o salinidad, del cultivar Gatton de *Panicum maximum*. Para ello se utilizó una muestra comercial de semillas cuya calidad fue evaluada mediante análisis morfológicos, fisiológicos (test de viabilidad, germinación, dormición) y citogenéticos (conteo cromosómico). Por medio del cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras se pudo desarrollar un protocolo de embriogénesis somática a partir del cual se obtuvieron plantas regenerantes, plantas albinas e incluso una planta con notables variaciones clorofílicas. Con esta herramienta es posible vislumbrar la obtención de variantes somaclonales tolerantes al carácter mencionado anteriormente, entre otros. Del mismo modo, este protocolo abre paso a desarrollar posibles transformaciones genéticas del cultivar mediante la transgénesis. Por otro lado, también se estudió la metodología de generación de variabilidad mediante la mutagénesis inducida de semillas. Mediante esta técnica se ajustaron las dosis más eficientes en la generación de variabilidad utilizando un agente físico, rayos x, y uno químico, EMS. Se estudiaron ambos agentes ya que, debido a su diferente modo de acción, son métodos complementarios. La preferencia del mejorador de optar por cada agente dependerá, principalmente, de las bases moleculares del carácter a modificar. Tanto la mutagénesis como la variación somaclonal obtenida mediante el cultivo *in vitro* son metodologías de generación de variabilidad aleatoria y con diferente probabilidad de ocurrencia. En cuanto

al carácter de estudio, se analizaron los efectos de la salinidad y la sequía sobre la germinación y el crecimiento del cultivar en condiciones de laboratorio e hidroponía determinando valores críticos de selección. Por último, se realizó el ajuste de un protocolo de transferencia de marcadores SSR que permitió diferenciar dos cultivares filogenéticamente muy cercanos. Aumentando el número de SSR transferidos se podrá detectar variabilidad genética de forma eficiente y a un costo reducido. Del mismo modo, mediante la asociación de caracteres se podrá seleccionar individuos en estado de plántula acelerando el proceso de mejora en los programas de mejoramiento. Cabe aclarar que también sería de utilidad combinar las técnicas citadas. Por ejemplo, seleccionar individuos regenerantes o provenientes de semillas M1 germinadas o cultivadas en condiciones artificiales de estrés hídrico-salino (determinadas en este trabajo), *in vivo* o *in vitro*, y luego fijar y recuperar el clon a partir del cultivo *in vitro* de las inflorescencias de las plantas adultas. La información generada en este trabajo permitirá colaborar en el desarrollo de un mercado de cultivares de origen nacional que fortalecerá la sustentabilidad de la expansión ganadera en la región extra-pampeana.