



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA
DE GERMOPLASMA DE *Panicum coloratum* L var.
coloratum PARA LA TOLERANCIA A LA
SALINIDAD**

Pittaro, M. Gabriela

Tesis
Para optar al Grado Académico
Magister en Ciencias Agropecuarias
Mención en Producción Vegetal

Córdoba, Argentina. 2014

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE GERMOPLASMA DE
Panicum coloratum var. *coloratum* PARA LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD**

Pittaro, M. Gabriela

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. Talesinik, Edith

Asesores: Dra. Tomas, Andrea (Co-director)

Dra. Bruno, Cecilia

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Bruno, Cecilia

Dra. Natalia Bonamico

Dr. Jorge Gieco

Presentación formal académica:

2014

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

Agradecimientos

Agradezco al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, institución que me abrió sus puertas para realizar esta Maestría.

Agradezco a la empresa PEMAN S.A. por financiarme los primeros años de mis estudios. Agradezco profundamente a Edith, por acompañarme incansablemente durante todo el proceso del desarrollo de la tesis, por su dedicación, paciencia, su permanente consejo, por no frenar mis iniciativas y estimular mi aspecto crítico.

Agradezco a los miembros de mi comisión asesora Andrea y Cecilia por su predisposición y buen trato.

Agradezco a todos mis compañeros de INTA (en especial a Loli, Leo O, Leo C, Alicia C, Euge, Mariela, Alita, Pao S, Vero T, Tiki, Pauli, Flor A., Lu, Tomi, Ceci L, Chiche, Nikolaus, Caro, Pablo, Kari T, Diego F, Dani, Nacho, Rodrigo, Nati, Luisiana, Estanislao) que fueron de gran ayuda y compañía.

Finalmente a toda mi familia, en especial a mi madre, padre, hermanos, tío Juan, Sergio, y mis amigas/os de la vida por acompañarme día a día.

*A la memoria de mi padre,
que supo enseñarme
cuan sencilla es la vida.*

Resumen

Los cultivares de *Panicum coloratum* son poblaciones estabilizadas que presentan un cierto grado de variabilidad intracultivar. Plantas individuales provenientes de pasturas establecidas en suelos salinos, afectados además por condiciones de extrema sequía, pueden ser fuente de germoplasma con tolerancia a estreses múltiples. El objetivo del presente trabajo fue identificar la variabilidad para tolerancia a la salinidad en 16 individuos de *P. coloratum* var *coloratum* provenientes de una pastura establecida en la Pampa Deprimida, provincia de Buenos Aires, que sobrevivieron a sequía prolongada y fuertes heladas. Los materiales se multiplicaron vegetativamente en invernadero y se realizaron ensayos en condiciones controladas de luz y temperatura. Esquejes homogéneos enraizados, se cultivaron sobre sustrato inerte de arena y perlita con suministro de solución nutritiva. Se administraron tres niveles de salinidad (0, 200 y 400 mM NaCl) y se evaluó crecimiento vegetativo durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial. Las variables analizadas fueron tasa de aparición de hojas, tasa de macollaje, peso seco aéreo, número de hojas y macollos finales, además se evaluó concentración foliar de Na⁺ y K⁺. La tolerancia a la salinidad fue evaluada por la comparación del crecimiento en presencia salinidad respecto al de ausencia de salinidad, usando una o más variables de crecimiento. El análisis de crecimiento indicó variabilidad entre clones en tolerancia a la salinidad y crecimiento. La jerarquización de los materiales de acuerdo a la tolerancia fue calculada teniendo en cuenta una o varias variables de crecimiento obteniendo resultados similares. También se identificó variabilidad genética entre los clones mediante marcadores moleculares ISSR. La variabilidad identificada podría ser usada en programas de mejoramiento genético vegetal para obtener poblaciones con mayor tolerancia a la salinidad en esta especie.

Palabras claves: *Panicum coloratum*, tolerancia a la salinidad, fenotipificación, marcadores moleculares ISSR, variabilidad fenotípica y genotípica.

Abstract

P. coloratum cultivars are highly heterozygous genotypes and represent panmictic populations where internal genotypic variability offers the possibility of selecting individuals with improved performance in specific traits. Thus, surviving *P. coloratum* plants in pastures established in saline soils may be a source of germplasm for tolerance to multiple stress conditions. The purpose of this work was to determine variability for salt tolerance among 16 *P. coloratum* var. *coloratum* plants that had survived fluctuating soil salinity, severe droughts and frost in a plot established in the Depressed Pampa, in the province of Buenos Aires, Argentina. Plants were vegetatively cloned and trials were conducted under controlled greenhouse conditions, using homogeneous cuttings grown on an inert substrate of sand and perlite and irrigated with nutrient solution. Plants were treated with three salinity concentrations (0, 200 and 400 mM NaCl) and evaluated for responses at the initial stages of vegetative growth. Shoot dry weight, number of leaves and tillers, rate of emergence of leaves and tillers and leaf Na⁺ and K⁺ concentrations were evaluated. Salt tolerance was assessed by comparing growth under saline conditions to growth in the absence of salinity, using one or more growth variables. The analysis of growth data indicated variability among clones both in terms of growth and salt tolerance. Salt tolerance ranking using one or more variables shed similar results. Genetic variability among clones was assessed by inter simple sequence repeat analysis (ISSR). The variability detected in this study suggests the collected plants could be adequately used in a breeding scheme to increase salt tolerance in this species.

Key words: *Panicum coloratum*, salt tolerance, phenotyping, ISSR molecular markers, phenotypic and genotypic variability

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Hipótesis.....	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	10
Material vegetal original y producción de estolones enraizados (clones) para la fenotipificación.....	10
<i>Análisis de datos fenotípicos</i>	14
Índice de éxito de crecimiento inicial (IP) e Índice de tolerancia relativa (IT).....	15
Caracterización genotípica de materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	16
A continuación se muestra la nomenclatura de cada iniciador(en números) y su secuencia con las letras respectivas de los nucleótidos que lo conforman:.....	17
Análisis de datos genotípicos	18
CAPITULO 3 RESULTADOS	19
Identificación de clones comunes a ser incluidos en los demás ensayos	19
Caracterización del crecimiento y de latolerancia a la salinidad en dos clones referentes P4 y P15.....	24
Análisis del crecimiento y tolerancia a la salinidad en 16 clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	25
Criterios para jerarquizar la tolerancia relativa a la salinidad entre clones.....	27
a) Tolerancia a la salinidad basada en el porcentaje de biomasa acumulada en condiciones de salinidad con respecto de la lograda en ausencia de estrés (%PSA) ..	27
b) Jerarquización basada en la consideración de diversas variables de crecimiento...	28
c) Jerarquización basada en la comparación con un clon común.....	29
Comparación de criterios de estimación de tolerancia.....	31
Acumulación diferencial de iones K ⁺ y Na ⁺ en láminas foliares en clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	32
Caracterización genotípica de materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	34

Correlación entre la caracterización genotípica y fenotípica de materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	36
CAPITULO 4 DISCUSIÓN	39
Caracterización de crecimiento y tolerancia de materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i> en presencia de salinidad	39
Selección de variables para caracterizar la tolerancia a la salinidad	41
Caracterización de variabilidad para tolerancia a la salinidad entre clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>Coloratum</i>	43
Acumulación de iones K ⁺ y Na ⁺ en láminas foliares en materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	45
Caracterización genotípica de materiales de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	46
Correlación entre la caracterización genotípica y fenotípica de los clones.....	46
CAPITULO 5 CONCLUSIONES	48
CAPITULO 6 BIBLIOGRAFÍA	50
Anexo 1	58
Tablas y figuras complementarias.....	58

Lista de abreviaturas y/o símbolos

ACP: Análisis de componentes principales

AV: Autovalor producto de ACP

e: Autovector producto ACP

CE: Conductividad eléctrica (dS/m)

CP: Componente principal

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

dS/m: DeciSiemens por metro

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

IP 0; IP 200; IP 400: Índice de éxito de crecimiento vegetativo en condiciones control en relación al clon P15; en condiciones de 200mM NaCl en relación al clon P15; en condiciones de 400mM NaCl en relación al clon P15

IT 200; IT 400: Índice de tolerancia en condiciones de 200mM NaCl en relación al clon P15; tolerancia en condiciones de 400mM NaCl en relación al clon P15

GD: Grados Días con temperatura base de 15°C

mM: mili Molar

M1: clones en estudio;

NH: Número de hojas finales

NM: Número de macollos finales

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pb: Pares de base

PFA: Peso fresco aéreo

PSA: Peso seco aéreo

PST: Peso seco total

SDS: Dodecilsulfato sódico

TCR: Tasa de crecimiento relativo

TCA: Tasa de crecimiento absoluto

TAH GD: Tasa de aparición de hojas Grados Días

TAM GD: Tasa de aparición de macollos Grados Días

UVP: Ultravioleta

Lista de tablas

Tabla 2.1. Resumen por ensayos.....	13
Tabla 3.1. Autovalores y autovectores del análisis de componentes principales para las variables fenotípicas de clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	26
Tabla 3.2. Valores promedios y de EE del peso seco aéreo en salinidad como porcentaje del peso logrado en ausencia de salinidad, en clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	28
Tabla 3.3. Componente principal 1 (CP1) de análisis de componentes principales (ACP), en clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	29
Tabla 3.4. Ordenamiento decreciente de clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i> de acuerdo a los criterios de estimación de tolerancia a la salinidad.....	32
Tabla 3.5. Resumen del análisis de los perfiles de marcadores moleculares ISSR.....	34
Tabla 3.6. Agrupamiento de clones de <i>Panicum coloratum</i> var. <i>coloratum</i> según análisis de conglomerados en ausencia y presencia de salinidad y según relación al control (%).	37
Tabla 3.7. Resultados de AMOVA para la asociación en los agrupamientos de crecimiento vegetativo y los del análisis genético de clones <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	38

Lista de figuras

Fig. 3.1. Efecto de la salinidad sobre variables de crecimiento vegetativo en clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i> evaluados en el ensayo I, en cada panel, las barras indican medias y EE. Variables y número de repeticiones (n): A. PSA: peso seco aéreo n: (7). B. NM: número de macollos (M/planta) n: 6. C. TAM GD: tasa de aparición de macollos GD (NM/ GD) n: 7. D. NH: número de hojas (H/planta) n: 6. E. TAH GD: tasa de aparición de hojas GD (NH/GD) n: 7.....	20
Fig. 3.2. Porcentaje con respecto a la condición no salina de diversas variables de crecimiento evaluadas en clones de <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i> en el ensayo I. Las barras indican medias y EE. Variables y número de repeticiones (n): A. PSA: peso seco aéreo (5). B. NM: número de macollos por planta (5). C. TAM GD: tasa de aparición de macollos, medida en GD (4) 4. D. NH: número de hojas por planta (6). TAH GD: tasa de aparición de hojas medida en GD (6).....	21
Fig. 3.3. <i>Biplots</i> del Análisis de componentes principales, durante el ensayo I. A. En ausencia de estrés salino. B. 200 mM NaCl, y C. 400 mM NaCl. CP1 Componente principal 1, CP2 Componente principal 2.....	23

Fig. 3.4. Gráficos de estrella para las variables de crecimiento vegetativo, medidas en los dos clones comunes A. clon P4 y B. Clon P15, en los sucesivos ensayos (I al VI), para los tratamientos de salinidad 0, 200 y 400 mM NaCl.....	24
Fig. 3.5. Crecimiento y tolerancia relativa de clones <i>P. coloratum</i> var. <i>coloratum</i> en condiciones de estrés por salinidad vs crecimiento en ausencia del mismo, en los ensayos I, II, III, IV y V. A y B: relativo al clon 4 (A) crecimiento vegetativo y tolerancia relativa (B) de los clones en condiciones de salinidad (200 mM NaCl) en relación al crecimiento en ausencia de estrés. C y D: relativo al clon 15 crecimiento vegetativo (A) y tolerancia relativa (B) de los clones en condiciones de salinidad (200 mM NaCl) en relación al crecimiento en ausencia de estrés, en los ensayos I, II, III.....	31
Fig. 3.6. Media y EE de concentración media de K ⁺ en relación al peso seco.....	33
Fig. 3.7. Media y E.E. de concentración de Na ⁺ en relación al peso seco.....	33
Fig. 3.8. Dendrograma a partir del índice de similitud de Dice. Producto del patrón de bandas de nueve iniciadores de marcadores moleculares ISSR en clones de <i>Panicum coloratum</i> var. <i>coloratum</i>	35

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Panicum coloratum L var. *coloratum* es una especie gramínea C4 perenne de crecimiento estival, nativa de África oriental, adaptada a zonas subtropicales y tropicales, (Armando *et al.*, 2013). La producción promedio de materia seca por año es de aproximadamente 8 ton/ha y proporciona valores de proteína cruda superiores a 14% en la estación estival (diciembre) en Argentina. Las principales características de esta forrajera son su resistencia a sequía y a heladas (Petruzzi *et al.*, 2003), su adaptación a una amplia variedad de suelos y condiciones climáticas (Armando *et al.*, 2013) y se considera una alternativa interesante, a ser utilizada en zonas con restricciones climáticas y edáficas para la agricultura, adonde la ganadería ha sido desplazada (Stritzler, 2008).

En Argentina 7,8 millones de hectáreas están sembradas con pasturas forrajeras. De los cuales 1,4 millones son cultivadas con gramíneas tipo C4 y 130.500 hectáreas están sembradas con *P. coloratum*. Esto significa que *P. coloratum* representa el 9,3% de las pasturas de estación cálida y el 1,7 % de la superficie total destinada al uso de pastos forrajeros (INDEC, 2002), la baja adopción de esta especie por los ganaderos se atribuye a la dificultad durante el establecimiento y a la baja disponibilidad de semillas en el mercado. Por ello, su incorporación dentro de programas de mejoramiento genético es importante (Armando *et al.*, 2013) para lograr cultivares con mejores características productivas en ambientes con restricciones climáticas y edáficas. El mejoramiento genético de pasturas basado en el aumento de la producción de forraje, la mejora en la calidad y en el incremento de tolerancia a estreses bióticos y abióticos, como la salinidad (Rasmussen *et al.*, 2010), lo cual requiere de técnicas eficientes que permitan identificar variabilidad genética (Munns y James, 2003).

La salinidad es considerada una seria restricción a la productividad agrícola ya que el rendimiento de la mayoría de los cultivos disminuye cuando la conductividad eléctrica del agua del suelo supera los 4 dS/m (Maas y Hoffman, 1977; Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008). Durante la década del 80, se concluyó que la salinidad afectaba la fisiología de la planta y se identificaron plantas con tolerancia a elevadas concentraciones

de salinidad a las que se denominaron halófitas, observándose además diferentes niveles de tolerancia entre genotipos dentro de una misma especie (Glenn, 1987). Los diversos efectos observados a distinta escala de salinidad, son el producto combinado de estrés hídrico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional (Greenway y Munns, 1980).

La salinidad involucra aproximadamente 900×10^6 ha a nivel mundial (Flowers, 2004; FAO, 2005). Lamentablemente, no se dispone de información sistematizada más actualizada. En la región pampeana de Argentina existen alrededor de 19×10^6 ha con algún problema de salinidad. Aunque esta cuantificación es imprecisa, la extensión estimada es suficiente como para que la salinidad constituya una amenaza para la agricultura, ya que la mayoría de los cultivos no crecen en condiciones de altas concentraciones de salinidad (Taleisnik *et al.*, 2008). La necesidad de mejorar la tolerancia a la salinidad en los cultivos se hace evidente ante una demanda mundial de obtener mayor cantidad de alimentos, tanto para humanos como para animales, con una mayor eficiencia del uso de los recursos naturales (Flowers, 2004; Cominelli *et al.*, 2013).

Los cultivares de *P. coloratum* son considerados poblaciones con cierto grado de variabilidad genotípica intracultivar. Esto ofrece la posibilidad de seleccionar individuos que expresan determinados rasgos diferenciales en cuanto a su aptitud productiva o de tolerancia a estrés abiótico dentro de un cultivar (Young, 1994). La mayoría de las pasturas perennes poseen capacidad de reproducción asexual, ya sea por la propagación vegetativa o por apomixis. En algunas especies, la reproducción asexual es el único modo de regeneración, como ocurre en *Chenchrus ciliaris* L. (Moser *et al.*, 2004). En la mayoría de los taxones, la reproducción vegetativa puede ser de tipo facultativa y combinarse con la reproducción sexual en cierto grado (Eckert y Barrett, 1993). *P. coloratum* presenta polinización de tipo cruzada, la forma de diseminación más común es por semillas pero también puede ser por rizomas cortos que tienen capacidad de emitir raíces cuando los nudos entran en contacto con el suelo (Petruzzi *et al.*, 2003).

Se reconocen principalmente dos variedades *P. coloratum* var. *coloratum* y *P. coloratum* var. *makarikariense*, sin embargo una tercera variedad *P. coloratum* la var. *kabumlabula* también es mencionada en la literatura (Tischler y Ocumpaugh, 2004). El cultivar 'Klein', perteneciente a *P. coloratum* var. *coloratum*, exhibe mayor tolerancia a la

salinidad que el cultivar 'Bambatsi', de *P. coloratum* var. *makarikariense*, mostrando mayor acumulación de biomasa durante el tratamiento de 200 mM de NaCl en condiciones de invernadero y se identificó mayor concentración de K⁺ y mayor relación K⁺/Na⁺ en la parte aérea (Taleisnik *et al.*, 1998). Estas características de tolerancia, hace que el cv 'Klein' sea considerado atractivo para explorar variabilidad en tolerancia a la salinidad. Armando *et al.* (2013) han recolectado individuos de *P. coloratum* en distintas partes de Argentina que presentaron variabilidad genética para caracteres relacionados con la producción de forraje y de semillas. Además, se han identificado genotipos de la especie con algún grado de tolerancia diferencial a salinidad (Chen *et al.*, 2005), abriendo la posibilidad de utilizar esta variabilidad en tolerancia a salinidad en programas de mejoramiento genético vegetal. Existen líneas de investigación para el conocimiento de los procesos fisiológicos involucrados en la tolerancia a estreses abióticos en otras gramíneas como trigo, cebada, arroz, entre otros (Tester y Bacic, 2005). Sin embargo, se desconocen los mecanismos fisiológicos involucrados en tolerancia al estrés salino en *P. coloratum*.

Maas y Hoffmann (1977) definen tolerancia a la salinidad en función de la reducción porcentual del rendimiento en condiciones salinas con respecto a no salinas. Mientras que Yeo (1983) la define como la capacidad de un individuo de mantener el crecimiento y el metabolismo en situaciones de estrés por salinidad. En las respuestas a la exposición a la salinidad se distinguen aquéllas tempranas, dominadas por efectos osmóticos, de las más tardías, donde prevalece la respuesta a la incorporación interna de iones (Greenway y Munns, 1980; Munns, 1993). El efecto osmótico se manifiesta inmediatamente después de la exposición a la salinidad y continúa durante la misma. La segunda fase de respuesta a la salinidad es específica de la presencia de iones, se inicia cuando se acumulan iones Na⁺ y Cl⁻ en la planta. Elevadas concentraciones tisulares de Na⁺ y de Cl⁻ alteran la estructura de proteínas, interfieren en la síntesis y en la actividad de enzimas, produciendo síntomas de toxicidad en hojas maduras que se manifiestan como senescencia. Los mecanismos de tolerancia durante esta fase están relacionados con la capacidad de reducir la concentración de estos iones en el citosol de las células, mediante la compartimentalización en vacuolas o en células específicas, manteniendo la concentración de K⁺ citosólico (Maathuis y Amtmann, 1999) de modo de reducir el daño metabólico (Yeo, 1983; Rajendran *et al.*, 2009).

La excesiva acumulación de los iones sodio (Na^+) y cloro (Cl^-) reducen significativamente el crecimiento y rendimiento de los cultivo por daños osmóticos e iónicos (Munns y Tester, 2008). Los efectos osmóticos se observan inmediatamente, durante la exposición a la salinidad, resultando tanto en inhibición de la división y expansión celular, como en el cierre de estomas (Flowers *et al.*, 1991; Yeo *et al.*, 1991; Passioura y Munns, 2000; Fricke y Peters, 2002; Munns, 2002; Munns y Tester, 2008). El estrés iónico provoca senescencia prematura de hojas maduras y síntomas de toxicidad como clorosis, necrosis (Munns, 2002; Tester y Davenport, 2003; Munns *et al.*, 2006), aunque concentraciones tóxicas toman un tiempo para acumularse antes de comenzar a afectar las funciones de la planta (Munns y Tester, 2008). Altas concentraciones de Na^+ a nivel citoplasmático, interfieren en la síntesis de proteínas y la actividad enzimática (Bhandal y Malik, 1988; Blaha *et al.*, 2000). Además, pueden considerarse tóxicas ya que podrían competir por los mismos lugares que el K^+ en las funciones celulares. Alrededor de 50 enzimas son activadas por K^+ , donde el Na^+ no puede sustituirlo. Altos niveles de Na^+ o alta relación Na^+/K^+ pueden provocar disturbios en diversos procesos enzimáticos (Tester y Davenport, 2003).

Una de las características claves de tolerancia a la salinidad suele ser la capacidad de mantener una alta relación de K^+/Na^+ a nivel del citosol en las células vegetales (Chen *et al.*, 2005). Se considera “alta” cuando la concentración de K^+ excede a la de Na^+ , es decir cuando la relación $\text{K}^+/\text{Na}^+ \geq 1$ (Maathuis y Amtmann, 1999), la cual permite mantener el normal metabolismo celular. En condiciones de salinidad la relación K^+/Na^+ normalmente cae a valores menores a 1. La relación K^+/Na^+ en los tejidos vegetales, a menudo se ha sugerido como una herramienta potencial para la detección de tolerancia a salinidad (Chen *et al.*, 2005). En hojas de trigos tetraploides y hexaploide, se ha encontrado variabilidad genética respecto a esta característica cuando las plantas se encuentran en condiciones de salinidad (Tester y Davenport, 2003). Se conoce que la *P. coloratum* var. *coloratum* presentó mayor concentración de K^+ en hojas que la *P. coloratum* var. *makarikariense* en condiciones de salinidad, relacionándose esta característica con la tolerancia a la salinidad (Taleisnik *et al.*, 1998). Sin embargo se desconoce si existe o no variabilidad genética en este carácter dentro de *P. coloratum* var. *coloratum*.

La fenotipificación se ha definido como la acción de describir un conjunto de organismos por sus caracteres (Walter *et al.*, 2012). Cuando se trata de especies forrajeras, se hace referencia comúnmente al crecimiento en biomasa y/o la productividad, a la arquitectura de planta, la calidad, la duración de las etapas fenológicas de la planta, entre otros caracteres fenotípicos. Identificar los mecanismos fisiológicos involucrados en el control de tales caracteres, permite seleccionar genotipos con características deseadas como materiales potenciales para ser incorporados en programas de mejoramiento genético vegetal.

Convencionalmente, la tolerancia a la salinidad se cuantifica comparando el peso de las plantas que crecen en condiciones de salinidad con el peso obtenido de plantas que se han desarrollado en condiciones no salinas (Rajendran *et al.*, 2009), durante un período de tiempo lo suficientemente prolongado para que las plantas expresen sus mecanismos de tolerancia (Munns, 2010). El tiempo necesario para que las plantas muestren diferencias fenotípicas de tolerancia a la salinidad no es preciso, por lo que el tiempo que la duración de los ensayos debe definirse (Munns, 2002). Sin embargo, es factible que la fase iónica de la salinidad se inicie antes en plantas susceptibles o que se inicie cuando las plantas crecen en condiciones de elevada concentración salina (Munns, 2010). Se desconoce el tiempo necesario que debe transcurrir para encontrar diferencias de tolerancia a la salinidad entre genotipos de *P. coloratum*.

En la actualidad las técnicas de fenotipificación utilizan metodologías rápidas, eficaces y se realizan en ambientes con temperatura, humedad y radiación controlados (Walter *et al.*, 2012). Existen también dispositivos automáticos diseñados para la detección de área foliar total y diversos caracteres morfológicos tales como altura de la planta, ancho de copa, área foliar total, número de hojas y/o forma del dosel de la planta, han sido usados originalmente en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*. Estas técnicas se han mejorado en los últimos años y pueden ser usadas en otras especies, entre ellas las forrajeras. Por otra parte, diversas mediciones fisiológicas, como la de daño celular, el contenido de clorofila y la fluorescencia de la clorofila constituyen herramientas ampliamente utilizadas para caracterizar las respuestas al estrés en plantas (Munns, 2010). En conjunción con las anteriores, permiten diferenciar susceptibilidad entre genotipos. Por

otro lado, herramientas de fenotipificación actuales incluyen los análisis automatizados de transcriptómica, proteómica, metabolómica e iónica.

Durante los últimos 50 años, los ensayos de tolerancia a la salinidad en distintas especies aportaron información valiosa y protocolos de caracterización que fueron variando en el tiempo. Antes de la década del 80, los ensayos para cuantificar la tolerancia a la salinidad en forrajeras se basaron en la caracterización de un gran número de especies en condiciones experimentales no controladas (Albert y Popp, 1977; Briens y Larher, 1982; Gorham *et al.*, 1980; Glenn, 1987). Luego, las líneas de investigación se focalizaron en la evaluación de un gran número de especies bajo condiciones experimentales de luz, temperatura y concentración salina controladas (Ahmad *et al.*, 1981a; Ahmad *et al.*, 1981b; Dudeck y Peacock, 1985; Gorham *et al.*, 1984; Glenn, 1987). Estos experimentos se hicieron con el objetivo de encontrar plantas forrajeras promisorias en condiciones de salinidad. Como ejemplo, se puede citar el trabajo de Glenn (1987) donde se evaluaron en invernadero 25 especies, entre ellas halófitas y glicófitas con suplementación de NaCl en niveles de 0, 180 y 540 mM. En todos los casos, las plantas crecieron mejor en ausencia de salinidad, dado que en presencia de salinidad tuvieron mayor concentración de Na⁺ y menor de K⁺, al igual que menor contenido hídrico de los tejidos en comparación con las plantas en condiciones de control o sin suplementación de NaCl. Se conoce que la especie *P. coloratum* posee cierta tolerancia a la salinidad, con respecto a otras especies forrajera, aunque se desconoce el rango de tolerancia.

La cuantificación de la tolerancia a la salinidad es compleja, entre otras cosas, porque existen variaciones durante el ciclo de vida de las plantas que hacen variar los mecanismos de defensa a dicho estrés (Shannon, 1987). Para el caso del arroz, los componentes del rendimiento son más susceptibles a la salinidad que el crecimiento vegetativo (Zeng y Shannon, 2000). En cambio en tomate, la tolerancia a la salinidad durante la germinación no se relaciona con la capacidad de crecimiento vegetativo en condiciones salinas (Foolad y Lin, 1997). Sin embargo se desconoce la etapa de crecimiento que presenta mayor susceptibilidad a la tolerancia a la salinidad en *P. coloratum*. Las etapas de implantación y establecimiento de pasturas se consideran como las de mayor sensibilidad a las adversidades del medio ambiente, siendo crítica en ambientes con restricciones edafoclimáticas. La implantación incluye la germinación y la

emergencia de las plántulas, mientras que el establecimiento de las mismas hace referencia la cantidad de plantas logradas desde la siembra. Esta última etapa está condicionada por varios aspectos del medio (Di Nucci de Bedendo y Sevilla, 2011), por ello, en este trabajo de tesis se plantea evaluar la tolerancia a la salinidad en *P. coloratum* durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial.

La evaluación conjunta de caracteres fenotípicos y genotípicos constituye el primer paso hacia la identificación de variabilidad en materiales bajo estudio (García *et al.*, 2007). La aplicación de la tecnología de marcador molecular puede mejorar la eficiencia y precisión de proceso de mejoramiento (Kaushik *et al.*, 2003). Tienen la ventaja de poder ser aplicados sobre semillas o en plántulas permitiendo identificar variabilidad genética en grandes colecciones de germoplasma, de manera rápida y específica (Munns y James, 2003). Estos constituyen una herramienta precisa para cuantificar la diversidad genética en plantas y han sido utilizados en otras gramíneas forrajeras, inclusive del género *Panicum*.

La técnica *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), es muy utilizada en el mejoramiento genético de plantas y se ha empleado en numerosas especies forrajeras para estudios de diversidad genética (Dangi *et al.*, 2004). Respecto a *Panicum coloratum* var. *coloratum* hay información del uso de marcadores ISSR, que permitieron diferenciar colecciones de distintas procedencias (Tomas *et al.*, 2011). Resultados preliminares de Barrios *et al.* (2010) indican que existe variabilidad intracultivar en colecciones de *P. coloratum* recolectados de diferentes regiones de Argentina. Esta técnica además permite tipificar polimorfismo de poca cantidad de pares de bases así como el estudio de poblaciones a nivel de subespecie, no requiriendo información previa de secuencia de DNA, por lo que resulta de fácil implementación. Es útil en áreas de estudio de diversidad genética, en filogenia, en el etiquetado de genes, en el mapeo del genoma y en el análisis de la evolución biológica en una amplia gama de especies de cultivo (Reddy *et al.*, 2002). Esta técnica tiene ciertas ventajas, entre ellas la alta reproducibilidad debido al uso de iniciadores largos. La región de amplificación ha tenido, evolutivamente, una tasa de cambio considerablemente mayor que el resto del DNA, por lo que la probabilidad de identificar polimorfismo en estas secuencias es alta (Paäakinskiene *et al.*, 2000; Bornet y Branchard, 2001; Reddy *et al.*, 2002; Budak *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004; Poulin *et al.*, 2005).

En esta tesis se usaron dichos marcadores ISSR, ampliamente utilizados para determinar diversidad intra e inter genómica, ya que revelan variaciones en regiones particulares del genoma de varios *loci* simultáneamente (Blair *et al.*, 1999; Zietkiewicz *et al.*, 1994, Kaushik *et al.*, 2003). Entre sus ventajas, estos marcadores se consideran una técnica rápida y específica, que permite el estudio de poblaciones a nivel de subespecie, no requiriendo información previa de secuencia de DNA de la especie (Bornet y Branchard, 2001), como ocurre para el caso de los clones de *P. coloratum*, por lo que resulta de fácil implementación. Esta técnica es altamente informativa (Reddy *et al.*, 2002), económica y sencilla en el análisis de la diversidad genética de gramíneas (Paäakinskiene *et al.*, 2000). Son marcadores altamente polimórficos y robustos y tienden a distribuirse de manera uniforme en los genomas de las plantas, aunque son de tipo dominantes (Casasoli *et al.*, 2001; Venkateswarlu *et al.*, 2006). Los marcadores ISSR producen la amplificación del ADN a través del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). Los iniciadores son di-nucleótidos, tri-nucleótidos, tetranucleótido o penta-nucleótido. Además pueden ser no anclado o anclado en los extremo 3' o 5' con una a cuatro bases degeneradas, extendido la secuencia a la cual flanquean (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Los iniciadores utilizados en la técnica basada en marcadores ISSR, se denominan no anclados. Son marcadores multilocus usando como cebador a microsatélites (Bornet y Branchard, 2001). Sin embargo, estos marcadores presentan algunas limitaciones, entre ellas que los fragmentos de igual peso molecular entre muestras pueden no tener la misma secuencia molecular de nucleótidos, por lo que el polimorfismo puede ser conocido sólo si los fragmentos son extraídos del gel y posteriormente secuenciados (Reddy *et al.*, 2002).

En este trabajo de tesis se propone identificar variabilidad fenotípica para tolerancia a la salinidad en genotipos de *P. coloratum* var. *coloratum* y caracterizarlos genotípicamente por medio de marcadores ISSR.

HIPÓTESIS

1. La identificación de individuos de *Panicum coloratum* var. *coloratum* con tolerancia diferencial a la salinidad durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial, se logrará a través de la observación de caracteres fenotípicos.
2. La variabilidad fenotípica para tolerancia a la salinidad que presentan los individuos de *P. coloratum* var. *coloratum*, se relacionara con la alteración de la acumulación diferencial de Na⁺ en hoja.
3. La variabilidad fenotípica para tolerancia a la salinidad presente en los individuos de *P. coloratum* var. *coloratum*, se correlaciona con variabilidad genotípica, observable por medio de marcadores moleculares de ISSR.

OBJETIVO GENERAL

Identificar variabilidad intracultivar para tolerancia a la salinidad en *P. coloratum* var. *coloratum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir un criterio de fenotipificación que permita la identificación de individuos de *P. coloratum* var. *coloratum* adaptados a las condiciones de salinidad durante la etapa de crecimiento inicial.
2. Determinar la concentración foliar de sodio (Na⁺) en individuos de *Panicum coloratum* var. *coloratum* y relacionarlo con la tolerancia a la salinidad.
3. Caracterizar la variabilidad genotípica en la colección en estudio y verificar su correspondencia con la variabilidad fenotípica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL ORIGINAL Y PRODUCCIÓN DE ESTOLONES ENRAIZADOS (CLONES) PARA LA FENOTIPIFICACIÓN

En enero del 2009 se recolectaron 16 matas de *Panicum coloratum* var. *coloratum* de la localidad de Chascomús, provincia de Buenos Aires, de un lote ubicado a una latitud de 35° 24' 48'' S y 57° 43' 12'' O de longitud, implantado cinco años antes sobre un suelo Natracualf típico. Las matas fueron elegidas por permanecer verdes, luego de haber sufrido periodos de intensa sequía, ya que las precipitaciones totales durante 2007 fueron semejantes al promedio histórico de los últimos 20 años, mientras que en 2008 y 2009 llovió aproximadamente un 35 % menos coincidente con el período primaveral (Grecco, 2011). Los materiales recolectados fueron denominados P1 hasta P16.

La multiplicación del material se realizó en invernadero, separando macollos de matas originales. Estos se colocaron en vasos de 750 ml, con vermiculita gruesa para promover el enraizamiento. Fueron regados cada dos días con agua corriente y una vez a la semana con solución nutritiva. De esta forma, se obtuvieron esquejes de cada una de las plantas originales recolectadas en Chascomús, a los que haremos referencia desde aquí en adelante como “clones” o “materiales”, que fueron caracterizados fenotípicamente a través de las variables de crecimiento vegetativo, descriptas a continuación.

La caracterización de los clones para tolerancia a la salinidad se realizó sobre mesadas bajo condiciones controladas de invernadero. Esté cuenta con paredes de policarbonato e iluminación suplementaria, programada con ciclo 16/8 horas de luz/oscuridad. Estos ciclos fueron suministrados a través de lámparas de halogenuro metálico HQI de 400W. Además se registraron valores de temperatura (°C) mínima, media y máxima, de radiación fotosintéticamente activa (*photosynthetic active radiation*, PAR, $\mu \text{ mol/m}^2\cdot\text{s}$) y de humedad relativa (%HR), por hora y por ensayo, mediante un *logger* de nombre comercial Cavadevices. La temperatura media en el invernadero fue de 24,5 °C +/- 2,8 °C.

Para la fenotipificación se seleccionaron esquejes de tamaño homogéneo, con dos hojas desarrolladas, sin macollos y de 0,40 g de peso promedio. Los mismos se dispusieron en macetas de caño de PVC de 55 mm de diámetro y 330 mm de alto, el sustrato que se usó fue una mezcla de una parte de arena gruesa de río (previamente lavada) y dos partes de perlita. Las macetas fueron dispuestas en tres bandejas de 59,5×40×18,5 cm, en cada bandeja se ubicaron 60 macetas. Los clones fueron ubicados de acuerdo a una distribución al azar, que fue la misma para cada uno de los tratamientos de salinidad, ubicados en bandejas separadas, y se usaron siete repeticiones por clon y por tratamiento.

La caracterización de cada clon fue evaluada bajo tres tratamientos, un tratamiento sin el agregado de salinidad (control) y dos niveles de salinidad (200 mM y 400 mM de NaCl). El nivel de salinidad final de cada bandeja se logró mediante de incrementos sucesivos de 50 mM NaCl, disuelto en solución de Hoagland (0,5 x) (Hoagland y Arnon, 1950). Las macetas se regaron una vez por semana con 200 ml de solución. Después de cada riego se corroboró la concentración de las soluciones midiendo la conductividad eléctrica (CE) del drenaje por bandeja seleccionando macetas al azar dentro de la bandeja, utilizando un termo/ conductivímetro digital de mesa marca Altronix, modelo CTX-II.

Dado que el espacio físico del invernadero era limitado , no pudo realizar la caracterización de los 16 clones simultáneamente. Para acomodar suficientes repeticiones de cada clon y los tratamientos en el invernadero, los clones tuvieron que ser caracterizado en ensayos sucesivos. Para fines de comparación entre ensayos sucesivos, se incluyeron dos clones comunes: P4 y P15 (Tabla 2. 1), que surgieron de los resultados del primer ensayo.

El protocolo de riego de los ensayos I, II, III, IV y VI fue de tipo manual, con un riego semanal (I, II, III, IV) y dos riegos semanales (VI), mientras que durante el ensayo V, el riego se realizó mediante un sistema de hidroponia automático. Este sistema permitió el ascenso de la solución nutritiva desde la base de las macetas de PVC hasta el borde superior, permaneciendo así durante 12 minutos al cabo de los cuales la solución drenó hacia un depósito. Este ciclo se repitió ocho veces al día, con intervalos de dos horas. Esta variación en el sistema de riego, permitió que el sustrato de las macetas estuviese a capacidad de campo de manera constante.

La fenotipificación se hizo en la etapa de crecimiento vegetativo inicial. La cosecha del material vegetal producido por cada clon, se realizó a los 600-650 grados días (GD) aproximadamente, considerando 10 °C la temperatura base de la especie (Ferri *et al.*, 2006). El crecimiento en esta etapa se corresponde con la etapa de implantación y concuerda con una de las etapa más sensible a las adversidades del medio ambiente en relación con la etapa de germinación de la semilla y las etapas fenológicas posteriores (Di Nucci de Bedendo y Sevilla, 2011).

Durante los ensayos se midieron las siguientes variables fenotípicas:

Número de hojas y macollos (NH y NM): se cuantificaron número de hojas y macollos dos veces por semana.

Tasa de aparición de hojas y macollos (TAH GD y TAM GD): La tasa de aparición fue estimada como la pendiente de la relación entre el número de hojas y de macollos aparecidos en un periodo de tiempo medido en grados días.

Al momento de la cosecha se midieron: peso fresco aéreo (PFA), peso fresco radicular (PFR) y peso seco total (PST); para lo cual se separó la parte aérea de la radicular, se pesaron por separado y juntas. Luego se colocaron en estufa a 70 °C durante tres días hasta peso constante, obteniendo el peso seco aéreo (PSA), radical (PSR) y total (PST). Con estos datos se calculó la razón aérea radical.

En cada ensayo, se calculó la magnitud relativa de cada variable en salinidad con respecto a su control (ausencia de salinidad), para cada repetición, dividiendo el valor de la variable por la media de la misma en condiciones control, en ese clon y se multiplicó por 100. Eso generó una serie de datos relativos al control, para cada clon y condición de salinidad, por ensayo.

Se determinó la concentración de iones Na^+ y K^+ en la primera lámina crecida en condiciones de salinidad durante la cosecha del ensayo. Para ello, se extrajeron tres muestras por clon. Cada lámina se dividió en tres secciones y la concentración de iones se cuantificó en la sección apical. Las muestras fueron cosechadas y puestas en 1 ml de 0.1 N de HNO_3 . La concentración de Na^+ se determinó en las muestras digeridas a través de un fotómetro de llama.

Tabla 2. 1. Resumen por ensayos.

Ensayos	Tratamientos	Clones	Temperatura promedio (°C)	Radiación PAR promedio	Duración del ensayos	Variables de crecimiento
I	0; 200; 400	P4, P5, P8, P9, P13, P14, P15, P16	29,75	379,33	567 (23)	NH, NM, PSA, TAH GD, TAM GD
II	0; 200; 400	P1, P2, P3, P4, P7, P10, P11, P15	26,37	234,54	632 (34)	NH, NM, PSA, TAH GD, TAM GD
III	0; 200; 400	P4, P6, P12, P15	22,23	nd	682 (44)	NH, NM, PSA, TAH GD, TAM GD
IV	0; 200; 400	P2, P3, P4, P5, P8, P9, P12, P14, P15, P16	26,6	213,56	819 (34)	NH, NM, PSA, TAH GD, TAM GD
V	0; 200	P3, P4, P5, P9, P12, P14, P15, P16	25,4	nd	664 (41)	NH, NM, PSA, TAH GD, TAM GD
VI	0; 200	P2, P3, P4, P14, P15, P16	26,32	478,35	480 (30)	NH, NM, PSA, TAH GD, TAM GD

Nota: Tratamientos en concentración salina (0, 200 y 400 mM NaCl), materiales (clones) que participaron en cada ensayo; temperatura promedio (°C); radiación promedio durante el ensayo PAR: $\mu \text{ mol/m}^2 \cdot \text{s}$; duración de los ensayos desde el trasplante a la cosecha medidos en grados días (GD) y días (d). Variables de crecimiento cuantificadas PSA: peso seco aéreo; NM: número de macollos (M/planta); TAM GD: tasa de aparición de macollos GD (NM/ GD); NH: número de hojas (H/planta); TAH GD: tasa de aparición de hojas GD (NH/GD). nd: no hay dato.

Análisis de datos fenotípicos

Los resultados de las mediciones de las variables fenotípicas, tanto los datos absolutos como los relativos (proporción de la variable en condiciones de salinidad con respecto a condiciones no salinas), fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANAVA). En todos los casos se corroboraron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, recurriendo a modelos lineales para contemplar el incumplimiento de estos. Además, todas las variables, por ensayo y por nivel de salinidad, fueron incluidas en análisis multivariado de componentes principales (ACP). Este último se hizo tanto para datos absolutos como relativos. Las componentes principales (CP) generadas son un conjunto de variables sintéticas que resultan de la combinación lineal de las variables originales, previamente estandarizadas multiplicadas por los autovectores (\mathbf{e}). Los coeficientes que acompañan a cada una de las variables originales estandarizadas para formar la CP permiten identificar la contribución de cada una a la variabilidad entre los clones. Cada CP tiene asociado un autovalor (AV) que indica la porción de la variabilidad total explicada por dicha combinación lineal. La CP que explica la máxima variabilidad es denominada CP1, la segunda componente que explica menos variabilidad que la CP1 pero más que la siguiente es denominada CP2 y así sucesivamente (Johnson y Wichern, 1998). Los autovectores (\mathbf{e}), junto al valor del CP1 fueron usados para el cálculo de los índices "de éxito de crecimiento inicial" (IP) y "de tolerancia relativa" (IT) (descriptos más adelante).

Finalmente, los datos de crecimiento y de tolerancia de los clones fueron agrupados según su similitud/disimilitud en ausencia y presencia de salinidad y porcentaje respecto al control, utilizando la técnica multivariada de análisis de conglomerados. Todos los análisis de datos fueron procesados con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2013), Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2013) y con el paquete R ([R development](#) core team, 2010) en su interface con InfoStat e Info-Gen.

ÍNDICE DE ÉXITO DE CRECIMIENTO INICIAL (IP) E ÍNDICE DE TOLERANCIA RELATIVA (IT)

Para poder comparar los sucesivos ensayos entre sí, eliminando posibles fuentes de variabilidad, los resultados de todos los clones fueron comparados, por ensayo, con uno de los clones comunes, utilizando los datos generados por el ACP. El índice IP resume el comportamiento de los clones a través de todas las variables fenotípicas referidas al crecimiento durante la implantación. Para su cálculo, se utilizó el valor promedio por clon y por ensayo de cada una de las variables (fórmula 2.1). Al valor promedio de cada clon, se le restó el promedio de uno de los clones comunes. El valor absoluto de la diferencia es el desvío de un clon respecto al clon común de ese ensayo. Luego, la diferencia se dividió por el promedio del clon común de esa variable. De esta forma se obtuvo el comportamiento relativo de cada clon respecto al clon común de dicho ensayo. Esta comparación, de cada clon con respecto a los clones comunes del ensayo se realizó independientemente con ambos clones comunes (P4 y P15) y por ensayo. Este valor obtenido indica si el valor promedio para esa variable, en ese clon particular, en ese ensayo, estuvo por encima o por debajo del clon común. Este indicador además fue multiplicado por el valor del autovector (e) (ACP). Luego, los indicadores calculados para cada variable fueron sumados a través de todos los clones, de manera tal, que los materiales con mayor variabilidad y mayor diferencia respecto al clon común presentará los valores más altos de IP, tanto negativos como positivos. Finalmente, cada indicador fue ponderado por la variabilidad explicada al combinar todas las variables relacionadas con el crecimiento simultáneamente a través de todos los clones, este ponderador es el autovalor obtenido del ACP (CP1). El índice, se expresa de la siguiente manera (fórmula 2. 1):

$$IP(\%) = \left(\sum_{i=1}^P \left(\left(\frac{|\bar{X}_{v_n}^{P_i} - \bar{X}_{v_n}^{P_j}|}{\bar{X}_{v_n}^{P_j}} \right) \cdot CP1 \right) \cdot \mathbf{e} \right) \cdot 100 \quad (\text{Fórmula 2.1})$$

Donde $\bar{X}_{v_n}^{P_i}$ es el promedio para el i-ésimo clon, con $i=1, \dots, P$, para la n-ésima variable (v), $\bar{X}_{v_n}^{P_j}$ es el promedio para el clon común (j-ésimo clon) para la misma variable. CP1 es el coeficiente obtenido por combinación lineal del autovector (e),

obtenido para cada variable por el valor correspondiente de la variable en un clon determinado.

El IT se calculó de la misma manera que IP, es decir, es un indicador relativo al clon comparado. Pero, para este caso, la comparación de cada clon es relativa al comportamiento del mismo clon sin salinidad (control).

Este índice representa la tolerancia a la salinidad de cada clon, respecto a la tolerancia de un clon común que no ha sido sometido a salinidad. También presenta valores negativos y positivos que indican que el clon presentó una tolerancia superior o inferior al control (fórmula 2.2).

$$IT(\%) : \left(\left(\frac{\sum_{i=1}^P (\bar{X}_{v_n}^{P_i} - \bar{X}_{v_n}^{P_j})}{\bar{X}_{v_n}^{P_j}} \right) \cdot CP1 \right) \cdot e \cdot 100 \quad (\text{Fórmula 2.2})$$

Donde $\bar{X}_{v_n}^{P_i}$ es el promedio para el i-ésimo clon, con $i=1, \dots, P$, para la n-ésima variable (v), $\bar{X}_{v_n}^{P_j}$ es el promedio para el clon común (j-ésimo clon) para la misma variable. CP1 es el coeficiente obtenido por combinación lineal del autovector (e), obtenido para cada variable por el valor correspondiente de la variable en un clon determinado.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE MATERIALES DE *P.*

coloratum var. coloratum

Los clones de *P. coloratum* se caracterizaron genotípicamente mediante el análisis de marcadores moleculares ISSR. La extracción de DNA se hizo a partir de dos láminas de tejido fresco pertenecientes a plantas crecidas en invernadero en condición de no salinidad. Se siguió el protocolo CTAB, descrito en Assefa *et al.* (2003). Las hojas fueron homogeneizadas usando mortero y pilón sobre hielo, adicionando 700 μ l de buffer de extracción (2,5 ml Tris-HCl 50 mM pH 8; 1 ml EDTA 10 mM pH 8; 1 ml

NaCl 100 mM; 35 µL β-mercaptoetanol 10 mM) y docecilsulfato sódico (SDS) al 10 %. La solución se incubó a 65 °C durante 20 min. Luego, se adicionaron 200 µl de acetato de potasio 5 M (pH 4,8) y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugó a 13000 rpm por 20 min y se colectó el sobrenadante, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad durante 10 min, sacando nuevamente el sobrenadante. Se agregaron 700 µl de isopropanol y se incubó por 10 min a -20 °C. Esta última solución se centrifugó durante 4 min a 13000 rpm y se extrajo el DNA depositado en el fondo del tubo. Se realizó un lavado adicionando 600 µl de etanol 70 %, se centrifugó 4 min a 13000 rpm, se descartó la fase líquida y se repitió este paso. Se extrajo el alcohol y se dejó secar el pellet en estufa. Por último, se adicionaron 80 µl de TE 1X (10 mM Tris Base, 2 mM de EDTA, PH 8), se disolvió el pellet, dejándolo en estufa por 30 min. Se verificó la calidad del DNA en geles de agarosa al 1,5 %, teñidos con una solución de bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de tipo Benchtop UV Transilluminator, UVP. También se midió la concentración de DNA utilizando Nanodrop (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

Se usaron 12 iniciadores que contaron con una secuencia repetida de entre 16 a 25 pb, que amplificó múltiples fragmentos localizados entre microsatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Las amplificaciones de PCR se realizaron en un Termociclador LongGene Scientific Instruments Co., Ltd. L series Thermal Cycler, Model MGL96G (Versión 2.0). Para la reacción de amplificación se usaron 23 µl buffer (17,125 µl de agua; 2,5 µl buffer; 1µl MgCl; 0,5 µl BCA; 0,5 µl DNTP; 1,25 µl iniciador; 0,125 µl DNA Polimerasa) y 2 µl de DNA. Se adicionó en cada gel de agarosa un control negativo, solución sin ADN. El programa del termociclador siguió la siguiente secuencias de temperaturas: una desnaturalización inicial de 94°C por 1min 30 s y un paso final a 72 °C por 5 min; con 39 ciclos intermedios de 94 °C por 40 s; 52 °C por 45 s y 72 °C por 1 min y 30 s.

A continuación se muestra la nomenclatura de cada iniciador (en números) y su secuencia con las letras respectivas de los nucleótidos que lo conforman:

14: (CAC)₄GC;

17: (ACTG)₄;

4: (GA)₉T;

5: (AG)₇TC;

8: (GTG) ₃ C;	7: (CT) ₈ TG;
9: (CAA) ₅ ;	11: (ACC) ₅ .
16: (GACA) ₄ ;	13: CAA(GA)
20: (ACTG) ₂ ACCG (ACTG);	12: (AGA) ₅

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis a 80 V durante 90 min, en geles de agarosa al 1,5 % (peso/v) en una solución amortiguadora de TBE 0,5 X (0,0447 M ácido bórico, 0,0445 M Tris Base, 0,001 M de EDTA, PH 8). Se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) a 80 V por 1h 30m para la tinción del gel. En cada gel se corrió un marcador de peso molecular Ladder 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos. Los geles fueron visualizados con el transiluminador citado anteriormente. Los perfiles ISSR fueron registrados para cada clon como caracteres discretos. Se generaron matrices de presencia y ausencia de bandas, de dimensión $n \times p$, donde n representa la cantidad de clones genotipados por ISSR (16 clones) y p la cantidad de marcadores utilizados para la genotipificación (12 ISSR).

Análisis de datos genotípicos

Con la amplificación de los iniciadores se pidieron medidas resumen para describir a los iniciadores usados. Los perfiles genotípicos registrados para cada clon fueron sometidos análisis multivariado de conglomerado y análisis de coordenadas principales, de esta forma se identificaron agrupamientos entre clones de acuerdo a la variabilidad genotípica. Para estos análisis se utilizó el programa InfoGen (Balzarini y Di Rienzo, 2013). La relación entre la matriz de distancia genética generada por los iniciadores ISSR y los agrupamientos fenotípicos entre clones en condiciones de control, 200 mM NaCl y % control explicados anteriormente, utilizando el programa InfoGen (Balzarini y Di Rienzo, 2013). Asimismo se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), la prueba de correspondencia de Mantel (Mantel, 1967).

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN DE CLONES COMUNES A SER INCLUIDOS EN LOS DEMÁS ENSAYOS

En el ensayo I se caracterizaron ocho de los 16 clones bajo estudio: P4, P5, P8, P9, P13, P14, P15 y P16, y en base a los resultados de este ensayo se eligieron dos clones a ser incluidos en todos los ensayos subsiguientes.

En ausencia de salinidad, se pudo observar que hubo variabilidad en el PSA de los clones ($P < 0,001$), distinguiéndose los clones P4 y P14 como los de mayor biomasa (Figura 3.1 A). La salinidad redujo el crecimiento vegetativo ($P < 0,05$), salvo en la TAM GD ($P = 0,429$) tal como se muestra en la Figura 3.1 C. Tal reducción fue mayor en condiciones de estrés severo (400 mM de NaCl) que a 200 mM NaCl y los clones en general tuvieron un crecimiento similar a este nivel de salinidad. A 200 mM NaCl, el PSA de los clones P4, P13 y P14 fue muy afectado por salinidad, mientras que en P5, P8, P9, P15 y P16 lo fue en menor grado. P4 fue el único que mostró reducción en la variable NM a 200 mM NaCl (Figura 3.1 B). Las variables de NH y TAH GD (Figura 3.1 D y E), en general no fueron diferentes entre clones ($P = 0,064$ y $P = 0,1907$, respectivamente).

Los valores de las variables en salinidad, relativizados a la condición control, se muestran en la Figura 3.2. Tal como se observó con el crecimiento absoluto, estos porcentajes fueron mayores a 200 mM NaCl que para el estrés más severo, en la mayoría de las variables (Figura 3.2). Para ambos tratamientos de salinidad, se pudo identificar variabilidad en el %PSA de los clones ($P < 0,0001$) (Figura 3.2 A) el cual osciló entre 30 % a 70 %; P4 y P15 fueron los de mayor y menor susceptibilidad, respectivamente.

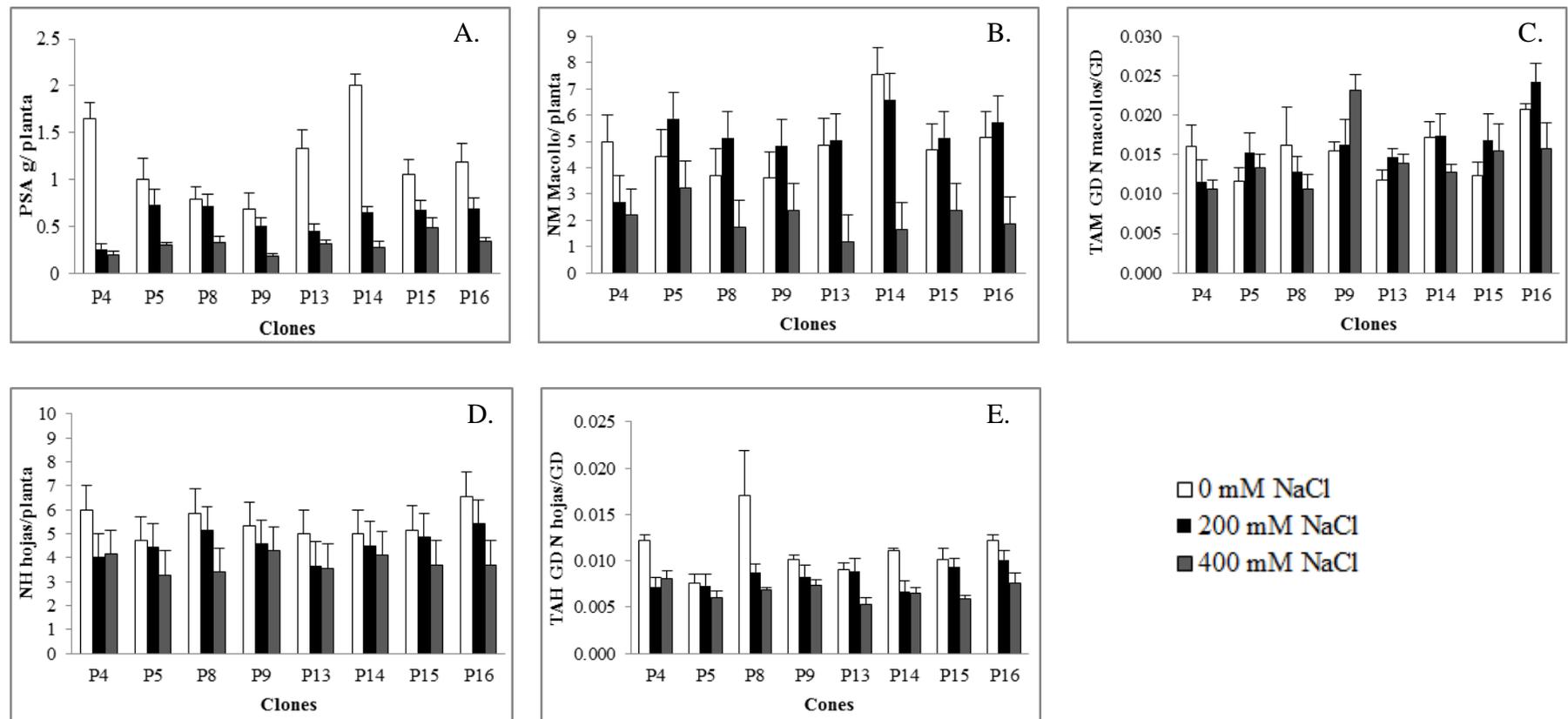


Fig. 3.1. Efecto de la salinidad sobre variables de crecimiento vegetativo en clones de *P. coloratum* var *coloratum* evaluados en el ensayo I, en cada panel, las barras indican medias y EE. Variables y numero de repeticiones (n): A. PSA: peso seco aéreo n: (7). B. NM: número de macollos (M/planta) n: 6. C. TAM GD: tasa de aparición de macollos GD (NM/ GD) n: 7. D. NH: número de hojas (H/planta) n: 6. E. TAH GD: tasa de aparición de hojas GD (NH/GD) n: 7.

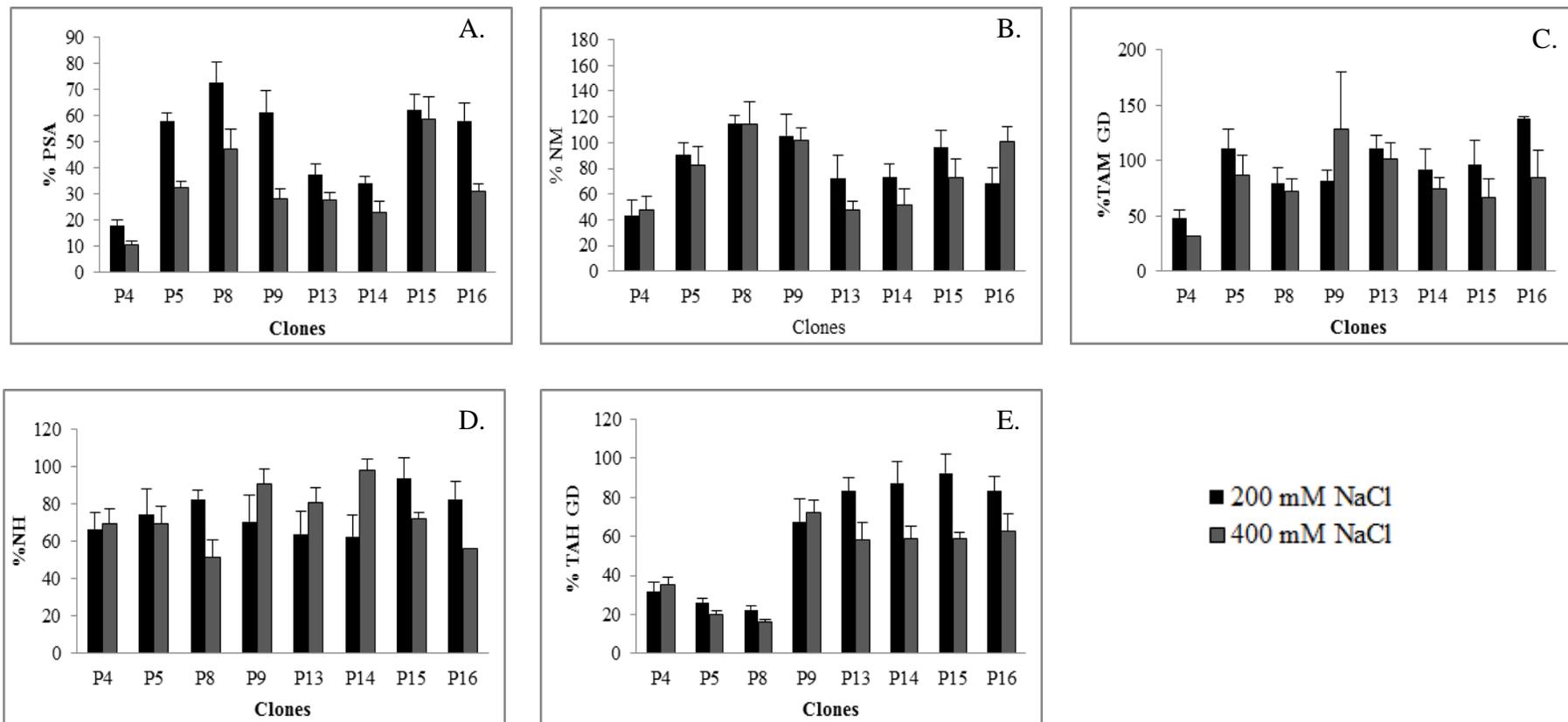


Fig. 3.2. Porcentaje con respecto a la condición no salina de diversas variables de crecimiento evaluadas en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* en el ensayo I. Las barras indican medias y EE. Variables y número de repeticiones (n): A. PSA: peso seco aéreo (5). B. NM: número de macollos por planta (5). C. TAM GD: tasa de aparición de macollos, medida en GD (4). D. NH: número de hojas por planta (6). TAH GD: tasa de aparición de hojas medida en GD (6).

Para cada uno de los tratamientos se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con todas las variables de crecimiento simultáneamente. Las componentes principales 1 y 2 explicaron más del 70 % de la variabilidad total (Figura 3.3 A, B, C). En ausencia de salinidad (Figura 3.3 A), las variables analizadas presentaron una alta correlación positiva entre ellas, salvo NH, TAH y el cociente A/R. Los clones P4 y P14 fueron los de mayor crecimiento, mientras que los P8, P9, P5 y P15 tuvieron menor crecimiento. A 200 mM NaCl (Figura 3.3 B) el clon P4 mostró una reducción severa en crecimiento, ubicándose alejado de los demás y en otro cuadrante. En esta condición los clones P8, P15 y P5 mantuvieron bajo crecimiento medio.

Respecto a las variables relacionadas al crecimiento de raíces, entre ellas PFR, PSR, PFT, PST y A/R, a pesar de haber tenido aportes similares al resto de las variables en análisis multivariado de ACP (Figura 3.3), se decidió no utilizarlas en posteriores análisis ya que cuando se hizo la cosecha hubo pérdida de material radical en el sustrato, difícil de cuantificar (Anexo Tabla 1). Por lo tanto, estas variables no se consideraron para identificar variabilidad entre clones.

La variable de PFA mostró un vector similar al PSA a la hora de explicar la variabilidad de las observaciones en los ACP (Figura 3.3 A, B, C). Además, ésta podría haber sido afectada por el contenido relativo de agua de los tejidos en las distintas condiciones de estrés (dato no tomado durante los ensayos), por lo que no se incluyó en la descripción del crecimiento y tolerancia a la salinidad de los clones de *P. coloratum* var. *coloratum*. La descripción de variabilidad inter clonal se hizo con PSA, NM, TAH GD, TAM GD y NH.

En base a las diferencias en crecimiento, tanto en ausencia de salinidad como en la respuesta a esta condición y además considerando la facilidad para obtener esquejes, se decidió utilizar los clones P4 y P15 como materiales comunes en el resto de los ensayos.

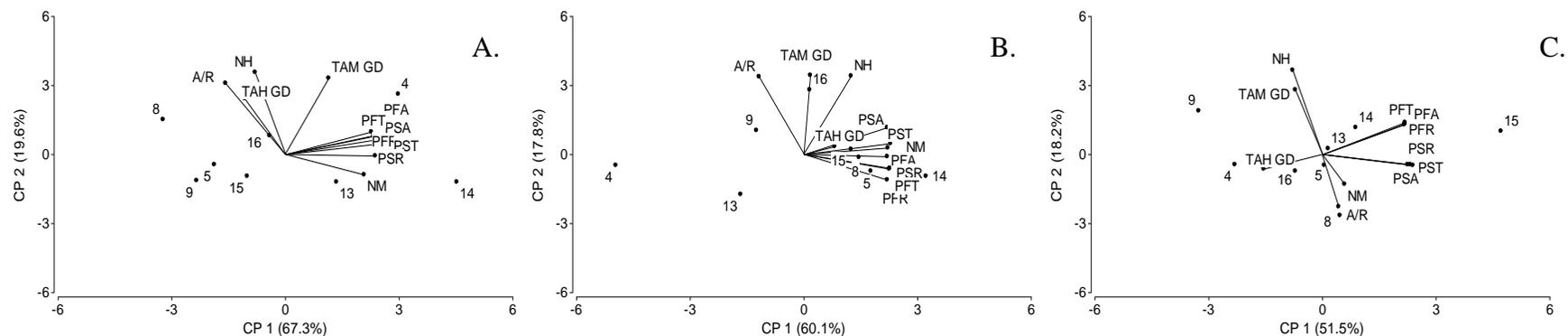


Fig. 3.3. *Biplots* del Análisis de componentes principales, durante el ensayo I. A. En ausencia de estrés salino. B. 200 mM NaCl, y C. 400 mM NaCl. CP1 Componente principal 1, CP2 Componente principal 2.

Nota: variables, PSA: peso seco aéreo, PFA: peso fresco aéreo, PFR: peso fresco de raíces, PSR: peso seco radical, PFT: Peso fresco total, PST: peso seco total; A/R: aéreo/radical, TAH GD: tasa de aparición de hojas; TAM GD: tasa de aparición de macollos; NM: número de macollos y NH: número de hoja.

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DE LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN DOS CLONES REFERENTES P4 Y P15

Como se indicó anteriormente, se hicieron seis ensayos de fenotipificación. En primer lugar, se evaluó si los clones comunes respondieron de manera similar en todos los ensayos (Anexo Tabla 3), para comparar los ensayos de forma rápida, se graficaron estrellas multivariadas con las variables de crecimiento (Figura 3.4). En general, los polígonos resultantes fueron simétricamente similares, tanto para el clon P4 como para P15, a excepción del ensayo VI que presentó un patrón diferente. La comparación de los materiales se llevó a cabo a través de un ANAVA, incluyendo el ensayo VI (Anexo Tabla 3.B) y sin incluir el mismo (Anexo Tabla 3.A), observando que la inclusión del ensayo VI al análisis introdujo diferencias significativas ($P < 0,05$) en PSA y NM en alguno de los dos clones. En base a esto, los resultados de crecimiento y el % control se analizarán solamente en los ensayos I al V.

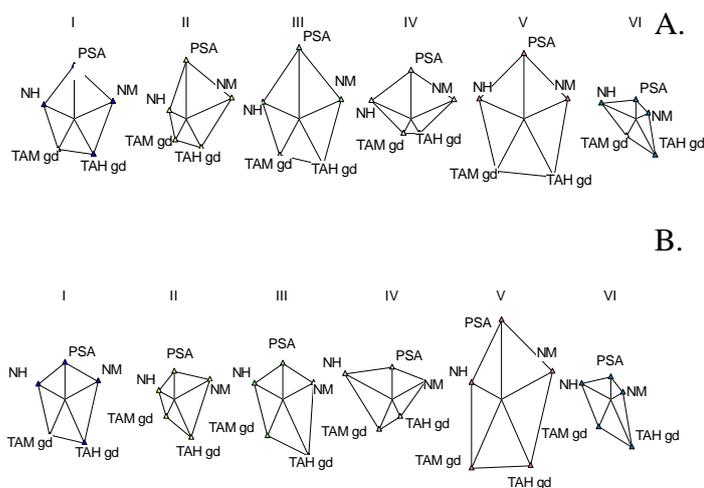


Fig. 3.4. Gráficos de estrella para las variables de crecimiento vegetativo, medidas en los dos clones comunes A. clon P4 y B. Clon P15, en los sucesivos ensayos (I al VI), para los tratamientos de salinidad 0, 200 y 400 mM NaCl.

Nota: variables, PSA: peso seco aéreo; NM: número de macollos; TAH GD: tasa de aparición de hojas GD; TAM GD: tasa de aparición de macollos GD; NH: número de hojas.

ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO Y TOLERANCIA A LA SALINIDAD

EN16 CLONES DE *P. coloratum* var. *coloratum*

En general, el crecimiento y el porcentaje respecto al control de los clones indicaron tendencias similares entre ensayos observándose una disminución en el crecimiento vegetativo por efecto de la salinidad (Anexo Figuras 1 a la 10). Esta disminución fue aún mayor a 400 mM NaCl y según se indicó más arriba, esta condición fue eliminada de los análisis que se muestran a continuación porque a ese nivel de salinidad no se detectaron diferencias entre los clones.

En el análisis de componentes principales (ACP), efectuado sobre los datos de crecimiento absoluto, el componente principal 1 explicó la variabilidad de los datos en más de un 40 % (Tabla 3.1, Anexo Figuras 11, 12, 13, 14 y 15). Los valores de los autovectores indican que las variables de crecimiento vegetativo tuvieron diferentes aportes para explicar la variabilidad de las observaciones tanto en ausencia como en presencia de salinidad, lo que varió también por ensayo. Las variables de PSA, NM y TAM GD tuvieron el mayor peso para diferenciar los materiales.

Este tipo de análisis también se llevó a cabo con los datos relativos de salinidad con respecto al control (Anexo Tabla 4) también en estos casos. La CP1 explicó más del 50 % de la variabilidad total. Asimismo, al igual que los resultados obtenidos con los datos de crecimiento absoluto, se identificaron diferentes aportes por variable y por ensayo.

Tabla 3.1. Autovalores y autovectores del análisis de componentes principales para las variables fenotípicas de clones de *P. coloratum* var. *coloratum*.

Ensayos	Clones	Salinidad (mM NaCl)	Autovalores CP 1	Autovectores				
				PSA	NM	TAH GD	TAM GD	NH
I	P4, P5, P8, P9, P13, P14, P15, P16	0	0,49	0,4	0,16	0,61	0,61	0,26
		200	0,57	0,53	0,39	0,26	0,44	0,55
II	P1, P2, P3, P4, P7, P10, P11, P15	0	0,78	0,47	0,48	0,44	0,43	0,4
		200	0,48	0,53	0,59	-0,12	0,59	0,12
III	P4, P6, P12, P15	0	0,72	0,52	0,28	0,44	0,5	0,47
		200	0,46	0,54	0,66	-0,36	-0,02	-0,38
IV	P2, P3, P4, P5, P8, P9, P12, P14, P15, P16	0	0,4	0,37	0,67	0,11	0,63	-0,04
		200	0,41	0,45	0,6	-0,16	0,59	-0,25
V	P3, P4, P5, P9, 12, P14, P15, P16	0	0,48	0,49	0,61	-0,25	0,56	-0,1
		200	0,64	0,51	0,55	-0,39	0,53	0,1

Nota: Ensayos I a V, para los tratamientos de salinidad 0 y 200 mM NaCl, variables: PSA: peso seco aéreo; NM: número de macollos; TAH GD: tasa de aparición de hojas GD; TAM GD: tasa de aparición de macollos GD; NH: número de hojas.

CRITERIOS PARA JERARQUIZAR LA TOLERANCIA RELATIVA A LA SALINIDAD ENTRE CLONES

Para la caracterización de la tolerancia a la salinidad en los 16 clones, se propusieron tres criterios utilizando en todos los casos los valores de las variables en estrés como proporción de los valores alcanzados en ausencia de estrés (de aquí en adelante, a este cálculo se lo denominará “tolerancia”):

- teniendo en cuenta únicamente la biomasa aérea,
- teniendo en cuenta en forma conjunta todas las variables de crecimiento
- teniendo en cuenta todas las variables de crecimiento, pero relativizadas a uno de los clones comunes.

a) Tolerancia a la salinidad basada en el porcentaje de biomasa acumulada en condiciones de salinidad con respecto de la lograda en ausencia de estrés (%PSA)

Como se indica, en este cálculo se tomó en cuenta únicamente el porcentaje de peso seco aéreo obtenido en condición de salinidad con respecto a la condición no salina (%PSA). Los datos calculados por ensayo fueron incluidos en un único análisis. A partir de las medias ajustadas por un ANAVA, contemplando una varianza por clon, se obtuvieron los valores medios del %PSA para cada clon (Tabla 3.2). Las diferencias estadísticamente significativas entre materiales se obtuvieron a *posteriori* con un test DGC. Los materiales se ordenaron decrecientemente según esta variable y se agruparon en tres categorías según la misma. El clon P4 fue el menos tolerante y el P15 se ubicó en una posición intermedia, resultando de los más tolerantes.

Tabla 3.2. Valores promedios y de EE del peso seco aéreo en salinidad como porcentaje del peso logrado en ausencia de salinidad, en clones de *P. coloratum* var. *coloratum*.

Clones	Porcentaje de peso seco aéreo	EE	
P8	68,44	7,19	A
P7	64,99	16,74	A
P5	63,28	6,56	A
P 3	61,99	6,83	A
P 6	57,11	12,45	A
P 9	57,1	5,26	A
P 2	54,18	6,61	A
P 15	50,99	4,24	A
P 1	43,48	7,4	B
P 11	43,33	6,78	B
P 12	43,23	5,82	B
P 16	39,46	5,31	B
P 13	36,21	4,81	B
P 10	31,58	5,65	B
P 14	31,22	3,31	B
P 4	22,67	2,41	C

Nota: letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor $p < 0.05$)

b) Jerarquización basada en la consideración de diversas variables de crecimiento

Para este cálculo se consideraron por ensayo los datos de todas las variables de crecimiento a 200 mM NaCl, relativizadas a su valor en ausencia de salinidad (% peso seco aéreo, % tasa de aparición de hojas GD, % tasa de aparición de macollos GD, % número de macollos y % número de hojas). Con todos estos datos, sin particionar por ensayo, se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Las componentes principales 1 y 2 explicaron el 80 % de la variabilidad total (Anexo Figura 16). En la Tabla 3.3, los materiales se ordenaron decrecientemente según la variable sintética CP1. El clon P4 mostró tener uno de los valores menores de CP1, junto con P1 y P10, mientras que P15 se ubicó nuevamente en una posición intermedia.

Tabla 3.3. Componente principal 1 (CP1) de análisis de componentes principales (ACP), en clones de *P. coloratum* var. *coloratum*.

Clones	CP1
P 8	4,05
P 5	2,53
P 9	1,69
P 3	0,7
P 13	-0,04
P 2	-0,16
P 15	-0,19
P 6	-0,37
P 14	-0,43
P 7	-0,5
P 12	-0,54
P 16	-0,58
P 11	-0,77
P 4	-1,32
P 1	-1,72
P 10	-2,37

Nota: datos de los ensayos I, II, III, IV y V.

c) Jerarquización basada en la comparación con un clon común

Como se indicó en la sección de Material y Métodos, se calcularon dos índices, uno de éxito de crecimiento inicial (IP) y otro de tolerancia relativa a salinidad (IT) para comparar a todos los clones con uno en común, incluido en todos los ensayos. Estos índices se calcularon en cada ensayo para cada una de las condiciones de crecimiento (0 y 200 mM NaCl). En primer lugar, se realizaron comparaciones con cada uno de estos dos clones comunes por separado (P4 y P15), a fin de decidir con cuál de ellos se trabajaría como material de comparación. El cálculo de los índices incluyó las variables de crecimiento vegetativo mencionadas en el apartado anterior, ponderadas en cada ensayo por los valores de los autovectores para considerar su contribución a la distinción entre los clones.

La Figura 3.5 A y B muestra los valores de IP200 e IT200 con respecto a IP0, tomando como base el material P4, y calculados para los ensayos I, II, III, IV y V.

En la Figura 3.5 A se observa que la mayoría de los clones se encuentran en el cuadrante superior izquierdo, indicando un mayor crecimiento en presencia de 200 mM NaCl y menor crecimiento en ausencia de estrés, en relación al clon P4, excepto P14 que parece tener mayor crecimiento en ausencia de estrés. Al evaluar los IT 200 respecto a P4, la mayoría de los clones mostraron mayor tolerancia que P4 (Figura 3.5 B). Por lo anterior, la comparación de los clones respecto a P4 no permitiría establecer una jerarquización entre los mismos basada en crecimiento (IP) ni en tolerancia, ya que P4 mostró alto crecimiento en ausencia de salinidad (IP0), superior al resto y relativamente baja tolerancia a 200 mM NaCl (IT).

Por el contrario, las comparaciones con el clon P15 (Figuras 3.5 C y D) permitieron detectar diferencias entre los clones. Se pueden distinguir clones como P7, P2, P1, P3 y P10, con crecimiento inferior a P15 en ausencia de estrés por salinidad, mientras que en presencia de salinidad su crecimiento fue inferior. Los clones P4 y P14 fueron de crecimiento superior a P15 en ausencia de salinidad y se distingue a P4 de bajo crecimiento y tolerancia a 200 mM NaCl respecto a este clon común (Figura 3.5 C y D). El resto de los clones (P11, P8, P9, P5, P13 y 16) se encontraron cercanos a P15 en crecimiento en ambas condiciones y en tolerancia. Sin embargo, P12, también cercano a P15 en crecimiento en ausencia de salinidad, tuvo valores de tolerancia superiores a P15.

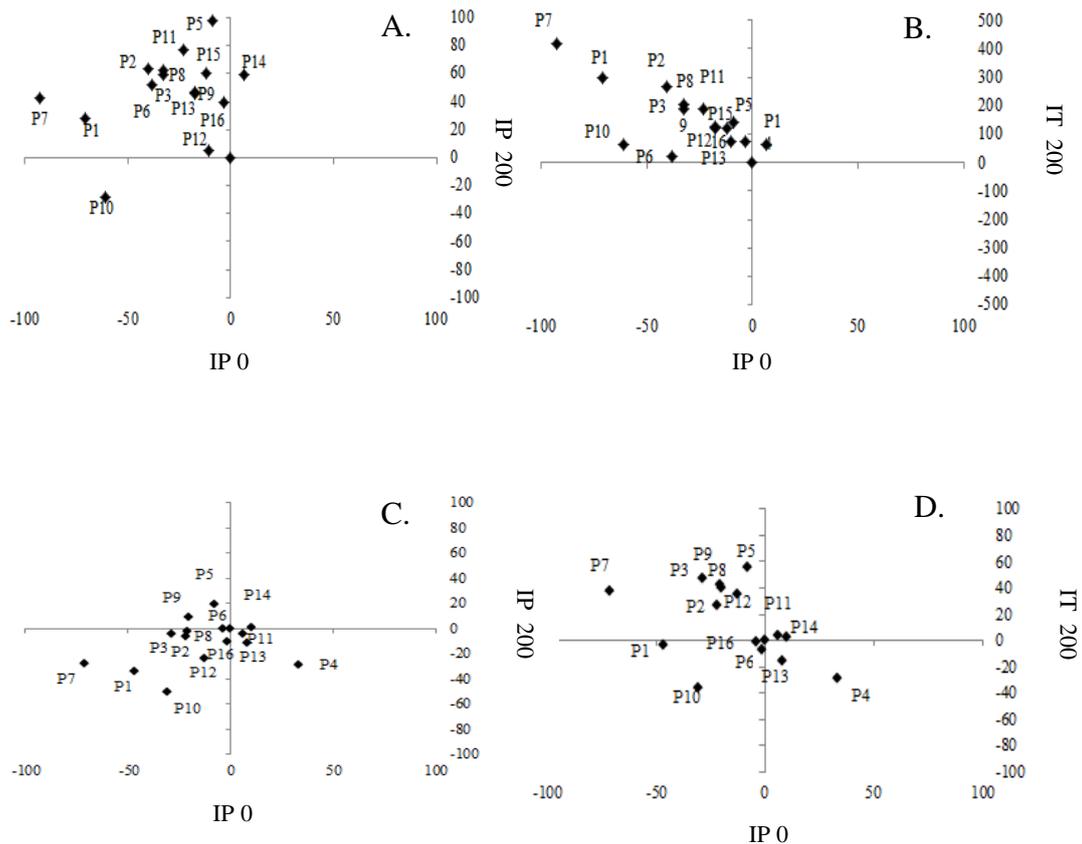


Fig. 3.5. Crecimiento y tolerancia relativa de clones *P. coloratum* var. *coloratum* en condiciones de estrés por salinidad vs crecimiento en ausencia del mismo, en los ensayos I, II, III, IV y V. A y B: relativo al clon 4 (A) crecimiento vegetativo y tolerancia relativa (B) de los clones en condiciones de salinidad (200 mM NaCl) en relación al crecimiento en ausencia de estrés. C y D: relativo al clon 15 crecimiento vegetativo (A) y tolerancia relativa (B) de los clones en condiciones de salinidad (200 mM NaCl) en relación al crecimiento en ausencia de estrés, en los ensayos I, II, III.

COMPARACIÓN DE CRITERIOS DE ESTIMACIÓN DE TOLERANCIA

Al comparar los tres métodos, se pudo observar que dieron resultados concordantes para varios de los clones (Tabla 3.4). Los clones P8, P3, P5 y P9 se ubicaron consistentemente en el tercio superior del listado basado en los valores decrecientes de tolerancia, mientras que P15, P6 y P2 presentaron una tolerancia media de acuerdo a los tres criterios. Los clones P4, P10 y P16 fueron menos tolerantes que el resto de los clones

de acuerdo a estos criterios. Sin embargo, se observaron clones con diferentes tendencias de acuerdo a los diversos criterios, entre ellos P7, P13, P12, P14 y P1.

Tabla 3.4. Ordenamiento decreciente de clones de *P. coloratum* var. *coloratum* de acuerdo a los criterios de estimación de tolerancia a la salinidad.

Porcentaje de peso seco aéreo	CP 1	IT
P8	P 8	P 5
P7	P 5	P 3
P5	P 9	P 8
P 3	P 3	P 9
P 6	P 13	P 7
P 9	P 2	P 12
P 2	P 15	P 2
P 15	P 6	P 11
P 1	P 14	P 14
P 11	P 7	P 15
P 12	P 12	P 6
P 16	P 16	P 1
P 13	P 11	P 16
P 10	P 4	P 13
P 14	P 1	P 4
P 4	P 10	P 10

Nota: CP1 producto de ACP % control de las variables %PSA, %NM, %NH, %TAH GD y %TAM GD; IT: índice de tolerancia respecto al clon común P15

ACUMULACIÓN DIFERENCIAL DE IONES K⁺ Y NA⁺ EN LÁMINAS FOLIARES EN CLONES DE *P. coloratum* var. *coloratum*

Se observó que la salinidad no afectó la acumulación de iones de K⁺ en las láminas foliares de los clones (Figura 3.6) los clones P10 y P13 se eliminaron en la figura ya que no dieron resultados consistentes. Respecto a la concentración de este ion, la interacción entre clones y tratamientos de salinidad (0, 200 y 400 mM NaCl) no fueron estadísticamente diferentes (P>0,005). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre clones (P<0,005) pero no entre los distintos tratamientos.

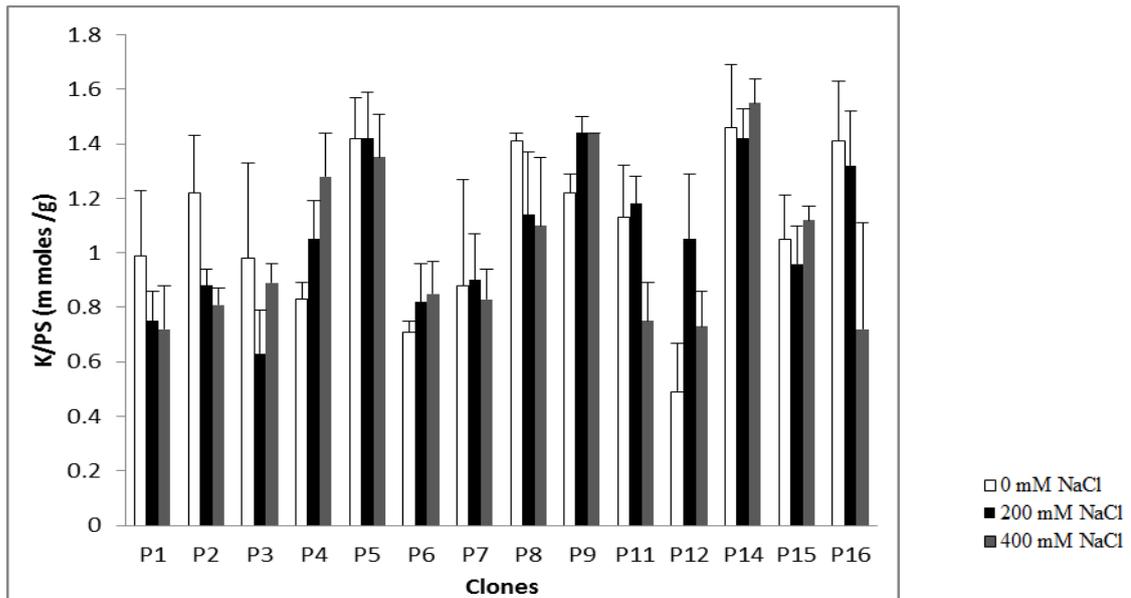


Fig. 3.6. Media y EE de concentración media de K^+ en relación al peso seco. Nota: en clones de *P. coloratum* var. *coloratum*. n=3. Ensayos I, II, III.

Se observaron incrementos en la concentración de Na^+ en condiciones de estrés más severo (Figura 3.7). La interacción entre clones y los tratamientos de salinidad no fueron estadísticamente diferentes respecto a la concentración Na^+ a nivel de lámina foliar ($P > 0.005$).

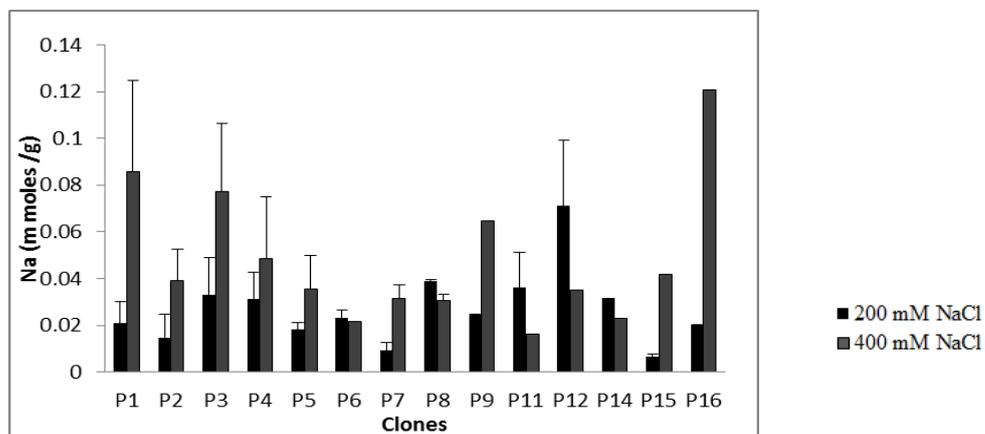


Fig. 3.7. Media y E.E. de concentración de Na^+ en relación al peso seco. Nota: en clones de *P. coloratum* var. *coloratum*. n=3. Ensayos I, II, III.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE MATERIALES DE *P. coloratum* var. *coloratum*

Para estimar la cercanía genética entre los clones de *P. coloratum* var. *coloratum*, se utilizó la amplificación de solo nueve de los iniciadores usados en los marcadores moleculares ISSR, los restantes se descartaron por no permitir una correcta visualización.

Los marcadores moleculares generaron 87 bandas, se trabajó con un 95,4 % bandas polimórficas, que permitieron diferenciar los clones. Se identificaron ocho bandas con el mismo perfil a través de las observaciones, es decir duplicadas y cuatro bandas monomórficas las cuales no varían a través de las observaciones. El iniciadores más polimórfico fue el 11 (Tabla 3.5), con un 46,53 % de amplificación y los iniciadores 4 y 11 fueron los de mayor contenido de información polimórfica (PIC).

Tabla 3.5. Resumen del análisis de los perfiles de marcadores moleculares ISSR.

Iniciador	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	EE	AMP
4	10	0	10	1	0,31	0,02	38,75
20	11	0	11	1	0,26	0,03	23,3
9	11	0	11	1	0,24	0,03	21,59
11	8	1	9	0,89	0,31	0,01	46,53
16	9	0	9	1	0,2	0,03	34,03
8	7	1	8	0,88	0,27	0,03	42,19
7	8	0	8	1	0,24	0,02	25,78
14	9	1	10	0,9	0,23	0,03	27,5
17	10	1	11	0,91	0,26	0,03	46,02
Total	83	4	87				33,69

BP: número de bandas polimórficas, BM: número de bandas monomórficas y BT: número de bandas totales, PMF 95: proporción de *locis* polimórficos, PIC: contenido de información polimórfica. EE: error estándar del PIC, AMP: porcentaje de amplificación.

En esta tesis se usaron análisis estadísticos de tipo multivariados para identificar agrupamientos genotípicos entre clones. Entre ellos, el análisis de coordenadas principales y el análisis de conglomerado, como métodos exploratorios que permitieron conocer la estructura genotípica de los clones.

El análisis de coordenadas principales (Anexo Figura 17), permitió interpretar diferencias y relaciones entre clones en cuanto al perfil genético. Este, identificó clones de mayor inercia que se encontraron a mayor distancia del cero en el eje 1, como fueron los casos del P8, P13, P114 y P9 en un sector, en otro sector opuesto P2, P5, P4, P11 y P1. Asimismo se hizo un análisis exploratorio de agrupamiento genotípicos entre clones mediante la técnica multivariada de conglomerados, usando método promedio e índice de similitud de Dice (correlación cofenética 0,764, como una medida de la calidad de la reducción lograda). Esta técnica generó tres grandes grupos, donde el clon P15 se separa del resto de los materiales indicando un perfil genómico diferente al resto de los clones. Uno de los grupos estuvo conformado por los clones P1 y P10, P16, P4 y P5, P11, P7 y P2 (Figura 3.8) y el otro por los restantes.

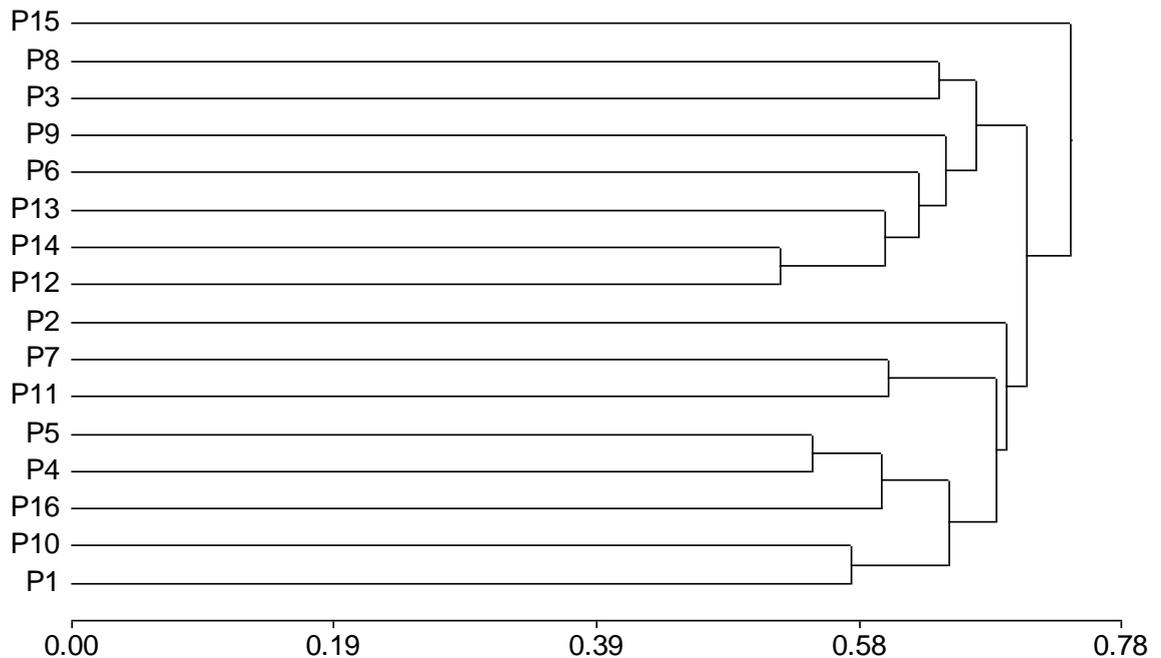


Fig. 3. 8 Dendrograma a partir del índice de similitud de Dice. Producto del patrón de bandas de nueve iniciadores de marcadores moleculares ISSR en clones de *Panicum coloratum* var. *coloratum*.

CORRELACIÓN ENTRE LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE MATERIALES DE *P. coloratum* var. *coloratum*

En esta instancia, se evaluó si la variabilidad genotípica de los clones tenía correlato en las agrupaciones que surgieron del análisis de crecimiento vegetativo y tolerancia. Para definir grupos de clones mediante las características fenotípicas, se usó la técnica multivariada de conglomerados, en la que se combinaron diferentes distancias y algoritmos. Los agrupamientos se hicieron de acuerdo a los criterios de crecimiento vegetativo (teniendo en cuenta las variables PSA, TAH GD, TAM GD, NM y NH) en ausencia y presencia de salinidad y respecto a su relación a la tolerancia relativa (porcentaje al control de las variables PSA, TAH GD, TAM GD, NM y NH); (Anexo Figuras 18, 19 y 20). En ausencia y presencia de salinidad, la distancia Gower y el algoritmo promedio dieron los mayores coeficientes cofenéticos de 0,8 y 0,804, respectivamente (Anexo Figuras 18 y 19), al igual que respecto a la tolerancia relativa la distancia Gower y el algoritmo promedio dio un mejor coeficiente cofenético (0,804). Para estimar la significancia estadística de los agrupamientos mencionados, se realizaron ANAVA, utilizando en cada caso, como criterio de clasificación los grupos y como variable el valor del componente principal 1 que surgió del ACP en cada caso. Se evaluó si los agrupamientos eran o no estadísticamente diferentes entre ellos. Estos resultados (Anexo Tabla 5 y 6) indicaron que si bien los grupos fueron estadísticamente diferentes entre sí, no puede descartarse que haya algún grado de heterogeneidad dentro de cada uno.

Posteriormente, se aplicó la herramienta estadística AMOVA, que permitió estimar la variabilidad genética dentro de cada uno de los grupos que resultaron del análisis de crecimiento (Tabla 3.6). Para ello, se tomaron como referencia los grupos formados según tres diferentes criterios: a) según el crecimiento vegetativo en condiciones de salinidad, b) según el crecimiento vegetativo en ausencia de salinidad y c) según la disminución en PSA en tratamiento salino respecto del control. Los conglomerados con sus integrantes se detallan en la Tabla 3.6.

Tabla 3. 6. Agrupamiento de clones de *Panicum coloratum* var. *coloratum* según análisis de conglomerados en ausencia y presencia de salinidad y según relación al control (%).

Criterios de agrupamientos	Conglomerados		
	A	B	C
PSA, NM, TAH GD, TAM GD en presencia de salinidad	P1, P2, P3, P5, P8, P10, P11, P13,	P4, P6, P9, P12, P15, P16,	P7
PSA, NM, TAH GD, TAM GD en ausencia de salinidad	P1, P7, P10,	P2, P3, P4, P8, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P16,	P5, P6
% PSA, %NM, %TAH GD, %TAM GD	P1, P2, P3, P6, P7, P11, P12, P13, P14, P15, P16,	P4, P10,	P5, P8, P9

Variables: peso seco aéreo (PSA); número de macollos (NM); tasa de aparición de hojas GD (TAH GD); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) y número de hojas (NH).

En la tabla 3.7, los valores de p superiores a 0.05 indican que la probabilidad de que los perfiles genotípicos de los clones entre *clusters* sean iguales es muy alta, tanto como lo es dentro de un mismo *cluster*, como fue en todos los agrupamientos. Es decir, los agrupamientos propuestos, en ausencia y presencia de salinidad, como porcentaje al control, no fueron genéticamente diferentes, lo que sugiere que los agrupamientos no se asociaron con el perfil genotípicos de los clones.

Las pruebas de Mantel realizadas entre las matrices de distancia genética basadas en marcadores ISSR y cada uno de los agrupamientos morfológicos propuestos, confirmaron que no fueron significativos las asociaciones entre los agrupamientos fenotípicos y los genotípicos. Los valores de r en todos los casos fueron muy bajos y no significativos (para agrupamiento de crecimiento vegetativo en ausencia de salinidad r: 0,027, p: 0,660, para crecimiento vegetativo en presencia de salinidad, 0,024, p: 0,62 y para porcentaje control r: 0,035, p: 0,67).

Tabla 3.7. Resultados de AMOVA para la asociación en los agrupamientos de crecimiento vegetativo y los del análisis genético de clones *P. coloratum* var. *coloratum*.

Fuente de Variación	p-valor	Porcentaje
Entre <i>clusters</i> en ausencia Salinidad	0,552	0
Dentro <i>clusters</i> en ausencia Salinidad	0,507	100
Entre <i>clusters</i> en presencia Salinidad	0,754	62%
Dentro <i>clusters</i> en presencia Salinidad	0,463	38%
Entre <i>clusters</i> % control	0,105	12%
Dentro <i>clusters</i> % control	0,763	88%

DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE CRECIMIENTO Y TOLERANCIA DE MATERIALES DE *P. coloratum* var. *coloratum* EN PRESENCIA DE SALINIDAD

Las estrategias para mitigar los problemas de salinidad en la producción de cultivos, incluyen el desarrollo de opciones de manejo (Shannon, 1987) y la mejora genética para tolerancia a la salinidad (Epstein *et al.*, 1980). La estrategia de manejo puede incrementar el rendimiento en estos ambientes, aunque su implementación es a menudo limitada debido al costo y la disponibilidad de recursos, lo que resalta la necesidad de mejorar la tolerancia a la salinidad en los cultivos (Flowers, 2004). La carencia de métodos de evaluación eficaces para detectar tolerancia a la salinidad se ha mencionado como una de las razones del escaso éxito en el mejoramiento convencional de cultivos (Chen *et al.*, 2005).

Existen trabajos que describen la tolerancia a la salinidad en cultivares comerciales de *P. coloratum*, enfocados en la etapa de germinación y/o supervivencia de plántulas en diferentes niveles de salinidad (Taleisnik *et al.*, 1998), aunque se desconoce cómo son afectados diferentes parámetros de crecimiento, que definirán el rendimiento de la pastura. En este trabajo la caracterización fenotípica de tolerancia a la salinidad, durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial de la pastura tuvo una duración de aproximadamente 600 GD que fue suficiente para identificar variabilidad entre clones.

Los diferentes ensayos realizados en esta tesis (I a VI), se hicieron en condiciones controladas de invernadero, sin embargo, se registraron algunas diferencias en las temperaturas medias (Anexo Tabla 2) y en el sistema de riego (detallado en materiales y métodos). No obstante, las temperaturas siempre se mantuvieron dentro del rango óptimo de crecimiento de gramíneas tipo C4 (óptimo fotosintético alrededor de 37° C) (Gliessman, 1998).

En los ensayos conducidos sobre grupos de clones diversos, siempre se incluyeron dos clones comunes, cuyo análisis permitió evaluar la estabilidad de los ensayos. Pese a las diferencias en las condiciones ambientales, el análisis de crecimiento de los clones comunes indicó que las tendencias en los ensayos, en general fueron similares para la gran mayoría de las variables (Figura 3.4; Anexo Figura 1 a la 10 y Tabla 3), excepto en el ensayo VI, por lo que se decidió omitirlo de los análisis. Las causas de las diferencias entre el ensayo VI y los demás solamente puede asociarse a la gran amplitud térmica verificada en ese ensayo (Anexo Tabla 2).

Los clones presentaron variabilidad en crecimiento en ausencia de salinidad (Figura 3.1, Anexo Figuras 1 a 5). El posible uso de esta variabilidad para la selección de materiales para zonas salinas se discute más adelante. Las variables de crecimiento vegetativo (NH, PSA, TAH GD y TAM GD); (Figura 3.1, Anexo Figuras 1 a 5) fueron afectadas negativamente por la salinidad en todos los clones de *P. coloratum* var. *coloratum*. Estas respuestas a la salinidad fueron similares a las registradas en otras especies. Tal como fue reportado por Munns y Rawson (1999) en trigo, donde la salinidad redujo el crecimiento vegetativo, afectando la superficie foliar, el número de hojas y una aceleración en la senescencia de hojas. En maíz, Cramer y Quarrie (2002) identificaron una reducción similar del crecimiento en presencia de salinidad, además de un escaso desarrollo de distintas partes aéreas e inhibición de la aparición de hojas nuevas. En otras forrajeras se identificaron respuestas similares como fue el caso de 18 líneas de *Panicum miliaceum* evaluadas, donde incrementos de NaCl tuvieron efecto negativo sobre diferentes variables de crecimiento (Sabir y Ashraf, 2007) y el caso de *Chloris gayana*, donde la salinidad redujo el rendimiento, estimado principalmente por la reducción del área foliar (De Luca *et al.*, 2001).

La respuesta a la salinidad varía de acuerdo al grado de estrés impuesto (Shannon, 1987). Como era de esperar, en este trabajo se observó un efecto negativo en el crecimiento de 16 clones de *P. coloratum* en dos niveles de salinidad (200 y 400 mM NaCl) siendo mayor con un nivel de salinidad de 400mM NaCl (Figura 3.1, 3.2 Anexo Figura 1 a la 10). La elevada concentración de NaCl no permitió identificar variabilidad entre clones que sí pudo identificarse a 200 mM NaCl. Concordando con lo citado por Shannon (1987) donde había identificado mayor variabilidad en tolerancia a la salinidad a bajas que altas concentraciones en glicófitas. Diferente a lo observado en

ecotipos de *Agrotis stolonifera*, donde Ahmad *et al.*, (1981b), encontraron que bajas concentraciones de salinidad redujeron las diferencias entre los ya que fueron necesarias elevadas concentraciones de salinidad (300 mM NaCl) para identificar variabilidad.

SELECCIÓN DE VARIABLES PARA CARACTERIZAR LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD

En fenotipificación se ha definido como la descripción de un conjunto de organismos por medio de sus caracteres. Al tratarse de especies forrajeras, las características frecuentemente usadas se refieren al crecimiento en biomasa, calidad, fotosíntesis, arquitectura y/o productividad (Walter *et al.*, 2012). Los indicadores comúnmente usados en una caracterización en salinidad además incorporan criterios de supervivencia, área foliar, necrosis foliar, entre otros (Munns, 2010). Sin embargo, se desconocen los parámetros más eficientes para determinar variabilidad en diversos genotipos en condiciones de salinidad (Zeng *et al.*, 2002).

Los indicadores usados para identificar variabilidad en crecimiento y tolerancia a la salinidad, son herramientas destinadas a incrementar la tolerancia en distintos cultivos de importancia agrícola en programas de mejoramiento genético (Ashraf y Harris, 2004). En un contexto agronómico, la tolerancia se describe de acuerdo al rendimiento en un gradiente de concentraciones salinas (Maas y Hoffman, 1977). Otros indicadores, involucran la conductancia estomática, exclusión Na^+ (García *et al.*, 1995), mantenimiento de alta relación de K^+/Na^+ (Asch *et al.*, 2000), exclusión de Cl^- (Noble y Rogers, 1992), etc. que también pueden otorgar mediciones indirectas de tolerancia, siempre y cuando se relacionen con respuestas del crecimiento en condiciones de salinidad. En todos los casos se entiende que un genotipo que presenta tolerancia a la salinidad, mantiene valores relativamente similares en condiciones de salinidad respecto a la ausencia de estrés en las variables utilizadas para caracterizar su crecimiento (Rajendran *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios valoran la tolerancia a la salinidad a través de técnicas destructivas (Munns, 2010), sin embargo, hay numerosas técnicas no destructivas que

miden tasa de elongación de hojas y/o raíces o usan tecnologías de imágenes modernas para estimar biomasa y otros parámetros de crecimiento (Walter *et al.*, 2012). En esta tesis, para caracterizar la tolerancia a salinidad de *P. coloratum var. coloratum* se utilizaron ambos tipos de técnicas, mediciones no destructivas donde se recabaron datos diarios para estimar NH, TAH GD, NM y TAM GD y mediciones de tipo destructivo tales como mediciones de acumulación de biomasa (PSA) y la determinación de la concentración de iones Na⁺ y K⁺ a nivel foliar.

El criterio de selección de variables de crecimiento vegetativo para la fenotipificación fue que contribuyeran a caracterizar la variabilidad entre clones. Algunas variables usadas en esta tesis no sirvieron para este propósito, por lo que no se incluyeron en la fenotipificación, entre ellas, eficiencia del PSII, FV/FM y tasas de fotosíntesis (datos no discutidos en esta tesis), ya que no diferenciaron los clones entre sí. Otras variables que no otorgaron información para diferenciar los clones, entre ellas las relacionadas al crecimiento de las raíces (Anexo Tabla 1), directamente no fueron incluidas en los análisis. Las variables de mayor peso, para la distinción entre los clones como fueron NM y PSA y en algunos ensayos la TAM GD (Figuras 3.1, 3.2, Anexo Figuras 1, 2, 3, 6, 7 y 8). Sin embargo otras variables, no siempre identificaron variabilidad entre clones y tratamientos, entre ellas TAH GD y NH, siendo estos caracteres muy conservados (Skinner y Nelson, 1995), con poca variación interclonal. Asimismo se encontraron diferencias entre variables (Tabla 3.1), un clon con tolerancia a la salinidad superior en PSA, no necesariamente será igualmente tolerante que otro con elevada tolerancia en NH.

En plantas forrajeras los macollos son la unidad principal de crecimiento, el aumento en la producción forrajera puede atribuirse a un aumento en densidad y/o peso de los mismos (Hernández Garay *et al.*, 1999). Lemaire *et al.* (2009) consideran que los componentes morfológicos están determinados genéticamente, aunque estos pueden ser afectados por variables ambientales alterando de esta forma la estructura de las pasturas. En forrajes es conocida la plasticidad morfológica como un fenómeno propio de pasturas de reproducción de tipo clonal (Hernández Garay *et al.*, 1999). Richards (1983) indicó que los suelos con problemas de salinidad son heterogéneos, por lo que esto podría modificar la plasticidad morfológica. Esto le permite conducir las ramificaciones dependiendo del tipo de hábitat donde se encuentre la pastura. De Kroon

y Hutchings (1995) observaron un incremento de las ramificaciones en parches de suelo relativamente buenos, conduciendo sus ramificaciones de manera selectiva.

En pasturas megatérmicas, se desconocía cómo la salinidad podría afectar la tasa de macollaje, David y Laude (1964) observaron que este era un fenómeno dependiente principalmente de la luz, siendo esto mismo confirmado por otros autores, entre ellos Deregibus *et al.* (1983) y Casal *et al.* (1985) que encontraron vinculación entre el macollaje y fenómenos de defoliación, relacionados con la intensidad y frecuencias del mismo, es decir mediante modificaciones de la luz que ingresa en la estructura de la planta. En esta tesis los clones *P. coloratum* var. *coloratum*, presentaron variabilidad en NM de acuerdo a las condiciones de salinidad, algunos de ellos incrementaron las ramificaciones con 200mM NaCl respecto del control, entre ellos P2, P3, P5, P6, P7, P8, P9, P15 y P16, por lo que estos clones fueron afectados ventajosamente, por salinidad (200mM NaCl); (Figura 3.1, Anexo Figuras 1 a 5). De esta forma podríamos hablar de un efecto estimulante de la salinidad en algunos clones durante las etapas de crecimiento vegetativo inicial. En otras *Poaceas*, sin embargo, la salinidad afectó negativamente la tasa de aparición y desarrollo de macollos y estimuló su muerte, reduciendo significativamente el número de macollos primarios y secundarios, además afectando, aunque en menor medida, el porcentaje de espiguillas por macollos como se vio en los cultivares 'Anza' y 'Yecora Rojo' de trigo (Maas *et al.*, 1994).

CARACTERIZACIÓN DE VARIABILIDAD PARA TOLERANCIA A LA SALINIDAD ENTRE CLONES DE *P. coloratum* var. *coloratum*

En este estudio, se compararon distintos criterios para evaluar variabilidad para tolerancia a la salinidad en un grupo de clones de *P. coloratum* var. *coloratum* y jerarquizar los mismos. Uno de ellos tuvo en cuenta la relativización únicamente de la variable peso seco aéreo en condiciones de 200 mM NaCl respecto a la ausencia de salinidad (% PSA), mientras que los demás tuvieron en cuenta el conjunto de variables de crecimiento en salinidad relativizadas al control (entre ellas, peso seco aéreo, número de hojas y macollos, tasas de aparición de hojas y macollos). En un caso, se utilizaron para la jerarquización de los clones los resultados de la técnica multivariada

de análisis de componentes principales, de ésta se usó la variable sintética CP1. En otro, en el caso de los índices (IP e IT), los datos que se utilizaron son las variables relativizadas respecto a los valores de las de los clones comunes (P4 y P15) incluidos en todos los ensayos (I, II, III, IV y V) y además se tuvo en cuenta el peso relativo de las variables en la diferenciación de los materiales, por ensayo. El uso de índices mitigó las diferencias entre ensayos y fue similar, conceptualmente, a la usado por Rajendran *et al.* (2009), donde se evaluaron tolerancia a la salinidad en distintos cultivares de *Triticum monococum*, relativizando respecto al genotipo de mayor tolerancia de los genotipos evaluados.

Respecto al uso de los índices, la decisión sobre la utilización de cual clon común usar como base de la comparación (P4 o P15), se basó en la tolerancia relativa de cada uno a 200 mM NaCl, P15 es un clon de tolerancia intermedia respecto a los demás, mientras que P4 es muy susceptible, por lo que la comparación con P15 fue la que otorgó mayor información sobre la variabilidad en tolerancia a la salinidad entre clones (Figura 3.5).

Estos distintos criterios otorgaron resultados similares en la jerarquización de clones de *P. coloratum* var. *coloratum* (Tabla 3.4), la inclusión de distintas variables de fenotipificación (relativizadas o no a un clon común) no modificó sustancialmente la jerarquización de la tolerancia a la salinidad de clones de *P. coloratum* var. *coloratum* respecto a la basada únicamente en el %PSA, sugiriendo que esta variable es una herramienta fuerte para evaluar la tolerancia a la salinidad en esta especie.

Como ya se mencionó, los clones presentaron variabilidad en ausencia de salinidad (Figura 3.1, Anexo Figuras 1 a 5), lo cual debe ser considerado al evaluar los materiales para zonas salinas con un criterio diferente al de tolerancia. Debido a la heterogeneidad en la distribución de las sales en suelos salinos (Richards, 1983), resulta conveniente tener en cuenta esta característica a la hora de identificar variabilidad en crecimiento y/o tolerancia a salinidad. La confrontación de la tolerancia en salinidad y el crecimiento en ausencia de estrés tuvo en cuenta estas características (Figura 3.5). Aunque pocos fueron los clones identificados con tolerancia y crecimiento alto, este tipo de análisis puede considerarse ventajoso para materiales destinados a suelos heterogéneos.

ACUMULACIÓN DE IONES K^+ Y Na^+ EN LÁMINAS FOLIARES EN MATERIALES DE *P. coloratum* var. *coloratum*

El mantenimiento de bajas concentraciones foliares de Na^+ y un adecuado balance K^+/Na^+ se han asociado con tolerancia a la salinidad en muchos cultivos (Tester y Davenport, 2003). En los clones de *P. coloratum*, la concentración de K^+ fue superior a la de Na^+ , en ausencia y presencia de salinidad, es decir los clones no alteraron la concentración de este ion en presencia de salinidad, manteniendo la relación K^+/Na^+ por encima de 1. En promedio se cuantificaron entre 1,091 y 1,055 mmoles de K^+/g PS, a 0 y 200mM NaCl respectivamente. En cambio, Glenn, (1987) encontró que en glicófitas crecidas a 180 mM NaCl, la concentración promedio de K^+ en salinidad se redujo respecto a la ausencia de salinidad, desde 1,05 a 0,6 mmoles de K^+/g PS, aunque ésta no fue estadísticamente significativa.

Glenn (1987) identificó que la tolerancia a la salinidad en 25 especies forrajeras, definida por el crecimiento, se encontró asociada a la capacidad para excluir Na^+ , es decir a baja tasa de transporte de Na^+ a la parte aérea y alta selectividad de K^+ , siendo similar a lo identificado para trigos tolerantes a la salinidad (Gorham y Bristol, 1990; Schachtman *et al.*, 1992; Munns y James, 2003; Poustini y Siosemardeh, 2004) en los cuales se encontró correlación positiva entre el rendimiento en grano, la exclusión de Na^+ a nivel foliar y alta relación K^+/Na^+ (Chhipa y Lal, 1995; Ashraf y O' Leary, 1996; Ashraf y Khanum, 1997). En general, en trigo, genotipos con bajas concentraciones de Na^+ produjeron una mayor cantidad de materia seca, presentaron menor daño foliar y mayor proporción de hojas vivas que muertas (Munns y James, 2003), aunque esta característica, no puede generalizarse a todos los genotipos de trigo (Ashraf y McNeilly, 1988; El-Hendawy *et al.*, 2005), como tampoco es un rasgo que se haya observado en otros cereales (Garthwaite *et al.*, 2005). En el presente estudio, la variabilidad en tolerancia a la salinidad observada en los clones de *P. coloratum*, no se relacionó con diferencias en la acumulación de Na^+ a nivel foliar, ya que los 16 clones presentaron una concentración promedio de Na^+ de 0,027 mmoles/g PS en condiciones de 200 mM NaCl, siendo ésta inferior a la concentración de Na^+ observada en brotes de cultivares tolerantes a la salinidad de cebada (Chen *et al.*, 2005) una *Poacea* con reconocida tolerancia a la salinidad.

En plántulas de cultivares de cebada, con tolerancia diferencial a la salinidad, concentraciones de Na⁺ radical, pareciera ser un indicador menos sensible que el de K⁺ a 300 mM NaCl (Chen *et al.*, 2005). En numerosas especies no incluyentes de Na⁺, se registró ajuste osmótico a través del ion K⁺ (Yeo, 1983). En ecotipos de *Agrostis estolonifera* (halófito) crecidos en condiciones salinas, el ajuste osmótico estuvo relacionado a la capacidad de reducir o regular la acumulación de Na⁺ y Cl⁻ en los tejidos aéreos, mediante la capacidad de exclusión de sales (Chen *et al.*, 2005). No obstante se desconoce si los clones de *P. coloratum* var *coloratum* acumulan iones de Cl⁻ como respuesta a la salinidad.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE MATERIALES DE *P. coloratum* var. *coloratum*

Paäakinskiene *et al.* (2000), informaron que mediante los marcadores moleculares ISSR, se revelaron diferencias y se logró discriminar entre *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*. Asimismo Dangi *et al.* (2004), usaron estos marcadores como una herramienta efectiva para identificar diversidad genotípica y descifraron relaciones filogenéticas entre especies de *Trigonella foenum-graecum* y *Trigonella caerulea*, asistiendo las estrategias de mejoramiento genético. En esta tesis el uso de estos marcadores permitió identificar variabilidad genotípica entre los clones de *P. coloratum* var. *coloratum*.

Se usaron 9 iniciadores para la caracterización genotípica de clones de *P. coloratum*, los cuales generaron numerosas bandas polimórficas y tal como ocurrió en Paäakinskiene *et al.* (2000) algunos iniciadores fueron mejores para identificar diferencias genotípicas entre especies que otros, es decir más polimórficos.

CORRELACIÓN ENTRE LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE LOS CLONES

Cotejando ambas caracterizaciones, la genotípica y la fenotípica, se pueden observar diferentes agrupamientos entre clones. Mediante la prueba de Mantel no se encontró correlación significativa entre los datos fenotípicos con los genotípicos. Asimismo una baja correlación entre los agrupamiento fenotípicos y genotípicos, se ha observado en

otros casos, tal como lo demuestra el trabajo de Zeng *et al.* (2004) donde la diversidad genética en genotipos de arroz, mediante marcadores ISSR, fue diferente a la identificada por adaptaciones de arroz en suelos salinos. Sin embargo Kaddour *et al.* (2011) observaron que la variabilidad en tolerancia a la salinidad identificada entre dos variedades de *Sulla*, mediante características de peso seco aéreo y la relación K^+/Na^+ , se correlacionó positivamente con el agrupamiento identificado por los marcadores ISSR. Esto mismo se observó en cultivares de arroz con tolerancia diferencial a la salinidad, donde iniciadores de ISSR identificaron una correlación positiva (Sheetal *et al.*, 2008). Por otra parte y reafirmando lo anterior, el análisis molecular de la varianza (AMOVA), identifico que la variabilidad dentro de los grupos morfológicos propuestos, fue mayor a la identificada entre los grupos, por lo que estos no correlacionan con el perfil genotípico, lo cual es diferente a lo observado por Hensen *et al.* (2009), donde grupos de *Stipa capillata* L. de diferentes regiones de Europa central, identificaron mayor variabilidad entre los grupos que dentro de los mismos.

Es posible que la falta de correlación entre la información fenotípica y genotípica se deba a que los ISSR son marcadores neutrales asociados a regiones no codificantes del genoma (Chen *et al.*, 2009) y pueden no ser los más indicados para separar los individuos de acuerdo a su capacidad para tolerar la salinidad, por ello, puede ser necesario el uso de otros marcadores con otras características que nos permitan identificar las plantas que por su tolerancia parecen diferentes.

CONCLUSIONES

En esta tesis se evaluó variabilidad en tolerancia a la salinidad en un grupo de clones de *Panicum coloratum* var. *coloratum* durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial, mediante la observación de caracteres fenotípicos. Se probaron varios criterios para jerarquizar los clones entre sí, utilizando como datos las variables de crecimiento medidas en condiciones de salinidad relativizadas a la condición control (ausencia de salinidad). Uno de los criterios consideró únicamente la variable de biomasa aérea, otro el producto de análisis multivariado de componentes principales y el tercero, índices elaborados en base a la comparación del crecimiento de cada clon con el de clones comunes incluidos en cada ensayo. De esta manera se aceptó la primer hipótesis planteada en este trabajo ya que pudo identificarse tolerancia diferencial a la salinidad durante la etapa de crecimiento vegetativo inicial en clones de *Panicum coloratum* var. *coloratum* mediante la observación de caracteres fenotípicos.

Las distintas variables de crecimiento vegetativo evaluadas en los clones de *P. coloratum* var. *coloratum* fueron, en general, afectadas negativamente por la presencia de salinidad, aunque en grado variable. Es interesante destacar que en algunos casos se observó que la presencia de 200 mM NaCl estimuló la producción de macollos durante la etapa de crecimiento inicial, este es un componente del peso seco aéreo de importancia durante la etapa de establecimiento de la pastura, por lo que este aspecto merece ser investigado en profundidad en el futuro.

En condiciones de salinidad se incrementó la acumulación de Na^+ a nivel de láminas foliares. Los 16 clones caracterizados presentaron una acumulación similar de Na^+ , de esta forma se rechazó la segunda hipótesis planteada, ya que la variabilidad fenotípica para tolerancia a la salinidad que presentaron los clones de *P. coloratum* var. *coloratum*, no se relacionó con la acumulación diferencial de Na^+ en hoja.

Se identificó variabilidad genética entre los clones mediante los marcadores moleculares ISSR, las diferencias genotípicas entre clones no se correspondieron con las diferencias fenotípicas, tanto en ausencia como en presencia de salinidad, por lo que se rechazaría la tercera hipótesis del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad I., Larher F. and Stewart G. R. 1981 a. The accumulation of A'-acetylornithine and other solutes in the salt marsh grass *Puccinellia maritima*. *Phytochemistry*, 20 (7): 1501-1504.
- Ahmad I., Wainright S. J. and Stewart G. R. 1981 b. The solute and water relations of *Agrostis stolonifera* ecotypes differing in their salt tolerance. *New Phytologist*, 87 (3): 615-629.
- Albert R. and Popp M. 1977. Chemical composition of halophytes from the Neusiedler Lake region in Austria. *Oecologia*, 27 (2): 157-170.
- Armando L. V., Carrera A. D. and Tomas M. A. 2013. Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 1737-1747.
- Asch F., Dingkuhn M., Dörffling K. and Miezán K. 2000. Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. *Euphytica*, 113 (2): 109-118.
- Ashraf M. and McNeilly T. 1988. Variability in salt tolerance of nine spring wheat cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 160 (1): 14-21.
- Ashraf M. and O'leary J. W. 1996. Responses of some newly developed salt-tolerant genotypes of spring wheat to salt stress: 1. Yield components and ion distribution. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 176 (2): 91-101
- Ashraf M. and Khanum A. 1997. Relationship between ion accumulation and growth in two spring wheat lines differing in salt tolerance at different growth stages. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 178 (1): 39-51
- Ashraf M. and Harris P. J. C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166 (1): 3-16.
- Assefa K., Merker A. and Tefera H. 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Hereditas*, 139 (3): 174-183.
- Barrios C., Baravalle E., Thompson C., Andrés A. y Tomás A. 2010. Variación genética en la colección de *Panicum coloratum* L. var. *coloratum* del INTA-EEA Rafaela, Argentina. En: Sexto Simposio Internacional de Mejoramiento Molecular de Pastos y Forrajes. MBFT 2010, Buenos Aires, Argentina. 77 pp.
- Balzarini M. G. y Di Rienzo J. A. InfoGen versión 2013. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- Bhandal I. S. and Malik C. P. 1988. Potassium estimation, uptake and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. En: *International Review of Cytology*. Vol 110. Bourne G. H., Jeon K. W. y Friedlander M. (ed). San Diego, California, pp. 205-254

- Blaha G., Stelzl U., Spahn C. M. T., Agrawal R. K., Frank J. and Nierhaus K. H. 2000. Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in Enzymology*, 317: 292-306.
- Blair M. W., Panaud O. and McCouch S. R. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 780-792.
- Bornet B. and Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Journal Plant Molecular Biology Reporter*, 19 (3): 209-215.
- Briens M. and Larher F. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant, Cell and Environment*, 5 (4): 287-292.
- Budak H., Shearman R. C. Parmaksiz I. and Dweikat I. 2004. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 280-288
- Casal J. J., Deregibus V. A. and Sanchez R. A. 1985. Variations in tiller dynamics and morphology in *Lolium multiflorum* Lam. vegetative and reproductive plants as affected by differences in Red/Far-Red Irradiation. *Annals of Botany*, 56 (4): 553-559.
- Casasoli M., Mattioni C., Cherubini M. and Villani F. 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill) based on RAPD, ISSR and isozymes markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1190-1199
- Chen Q., Wang Ch-H., Lu G., Song X., Xu J-W., Yang Q-L. and Li S-F. 2009. Analysis of genetic variation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*.) from native and colonized regions using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 549-555.
- Chen Z., Newman I., Zhou M., Mendhan N., Zhang G. and Shabala S. 2005. Screening plants for salt tolerance by measuring K⁺ flux: a case study for barley. *Plant, Cell and Environment*, 28 (10): 1230-1246.
- Chhipa B. R. and Lal P. 1995. Na/K ratios as the basis of salt tolerance in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46 (3): 533-539.
- Cramer G. R. and Quarrie S. A. 2002. Abscisic acid is correlated with the leaf growth inhibition of four genotypes of maize differing in their response to salinity. *Functional Plant Biology*, 29 (1): 111-115.
- Cominelli E., Conti L., Tonelli Ch. and Galbiati M. 2013. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*, 30 (4): 355-361.
- Dangi R. S., Lagu M. D., Choudhary L. B., Ranjekar P. K. and Gupta V. S. 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD. *BMC Plant Biology*, 4 (13): 1-11

- David L. D. and Laude H. M. 1964. The development of tillers in *Bromus mollis*. Crop Science, 4 (5): 477-480.
- De Luca M., García Seffino L., Grunberg K., Salgado M., Córdoba A., Luna C., Ortega L., Rodríguez A., Castagnaro A. and Taleisnik E. 2001. Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar. Australian Journal of Agricultural Research, 52 (9): 903-910.
- De Kroon H. and Hutchings M. J. 1995. Morphological plasticity in clonal plants: the foraging concept reconsidered. Journal of Ecology, 83 (1): 143-152.
- Deregibus V. A., Sanchez R. A. and Casal J. J. 1983. Effects of light quality on tiller production in *Lolium* spp. Plant Physiology, 72: 900-902.
- Di Nucci de Bedendo E. y Sevilla G. 2011. Recomendaciones para una implantación correcta de pasturas. Publicado en Internet. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion y manejo pasturas/pasturas%20artificiales/172-implantacion.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/172-implantacion.pdf). Activo desde 2011.
- 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. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dudeck A. E. and Peacock C. H. 1985. Effects of salinity on seashore *Paspalum* turf grasses. Agronomy Journal, 11 (1): 47-50.
- Eckert C. G. and Barrett S. C. H. 1993. Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). American Journal of Botany, 80 (10): 1175-1182.
- El-Hendawy S. E., Hu Y. and Schmidhalter U. 2005. Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. Australian Journal of Agricultural Research, 56 (2): 123-134.
- Epstein E., Norlyn J. D., Rush D. W., Kingsbury R. W., Kelley D. B., Cunningham G. A. and Wrona A. F. 1980. Saline culture of crops: A genetic approach. Science, 210 (4468): 399-404.
- Excoffier L, Smouse P. and Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131:479-49.
- FAO. 2005. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt affected soils. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutr. Manag. Service. Publicado en internet, disponible en: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- Ferri C. M., Brizuela M. A. Cid M. S. y Stritzler N. P. 2006. Dinámica de acumulación de láminas foliares y estructura del forraje diferido de *Panicum coloratum* L. Agricultura Técnica, 66 (4): 376-384.
- Flowers T. J., Hajibagher, M. A. and Yeo, A. R. 1991. Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. Plant, Cell and Environment, 14: 319-325
- Flowers T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 55 (396): 307-319.

- Foolad M. R. and Lin G. Y. 1997. Absence of a genetic relationship between salt tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato. *Plant Breeding*, 116 (4): 363-367.
- Fricke W. and Peters W. S. 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology*, 129 (1): 374-388.
- García A., Senadhira D., Flowers T. J. and Yeo A. R. 1995. The effects of selection for sodium transport and of selection for agronomic characteristics upon salt resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 90 (7-8): 1106-1111
- García M., Balatti P. and Arturi M. J. 2007. Genetic variability in natural populations of *Paspalum dilatatum* Poir. analyzed by means of morphological traits and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (5): 935-946.
- Garthwaite A. J., Von Bothmer R. and Colmer T. D. 2005. Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na⁺ and Cl⁻ into the shoots. *Journal of Experimental Botany*, 56 (419): 2365-2378.
- Glenn E. P. 1987. Relationship between cation accumulation and water content of salt-tolerant grasses and a sedge. *Plant, Cell and Environment*, 10 (3): 205-212.
- Gliessman S. R. 1998. Ecological processes in sustainable agriculture. En: Symposium 8.2. Agroecology. Florence, Italia, pp. 3-9.
- Gorham J., Hughes L. and Wyn Jones R. 1980. Chemical composition of salt-marsh plants from Ynys Môn (Anglesey): the concept of physiotypes. *Plant, Cell and Environment*, 3 (5): 309-318.
- Gorham J., Mc Donnell E. M. and Wyn Jones R. G. 1984. Salt tolerance in the Triticeae: growth and solute accumulation in leaves of *Leymus sabulosus*. *Journal of Experimental Botany*, 35 (7): 1200-1209.
- Gorham J., Hardy C., Wyn Jones R. G., Joppa L. R. and Law C. N. 1987. Chromosomal location of a K/Na discrimination character in the D genome of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 74 (5) 584-588.
- Gorham J. R. G. and Bristol A. 1990. Partial characterization of the trait for enhanced K⁺/Na⁺ discrimination in the D genome of wheat. *Planta*, 180 (4): 590-597
- Greenway H. and Munns R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 149-190.
- Greco F. 2011 Producción animal en un pastizal natural fertilizado de la Pampa Derpimida: efecto de las precipitaciones. En: 34° Congreso Argentino de Producción Animal, Mar del Plata, Buenos Aires, 31 (1): 208
- Hamilton E. W., Mcnaughton S. J. and Coleman J. S. 2001. Molecular, physiological and growth responses to sodium stress in C4 grasses from a soil salinity gradient in the Serengeti ecosystem. *American Journal of Botany*, 88 (7): 1258-1265.
- Hensen I., Kilian C., Wagner V., Durka W., Pusch J. and Wesche K. 2009. Low genetic variability and strong differentiation among isolated populations of the rare steppe grass *Stipa capillata* L. in Central Europe. *Plant Biology*, 12: 526-536.

- Hernández Garay A., Matthew C. and Hodgson J. 1999. Tiller size-density compensation in ryegrass miniature swards subject to differing defoliation heights and a proposed productivity index. *Grass and Forage Science*, 54 (4): 347-356.
- Hoagland D. R. and Arnon D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, 347: 32.
- INDEC.2002. Instituto Nacional de Estadística y Censos de Argentina. Publicado en internet, disponible en http://www.indec.gov.ar/agropecuario/cna_principal.asp. Activo desde agosto 2012.
- Johnson R. and D. Wichern. 1998. Applied multivariate statistical analysis. 4th ed. Prentice Hall Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Kaddour R., Sellami N., Chennaoui H., Nasri N., Baatour O., Mahmoudi H., Tarchoun I., Lachaâl M., Gruber M. and Trifi N. 2011. Correlation between salt tolerance and genetic diversity between *Sulla carnosa* and *Sulla coronaria*. *African Journal of Biotechnology*, 10 (65): 14355-14365.
- Kaushik A., Saini N., Jain S., Rana P. Singh R.K. and Jain R K. 2003. Genetic analysis of a CSR10 (*indica*) × Taraori Basmati F3 population segregating for salt tolerance using ISSR markers. *Euphytica*, 134 (2): 231-238.
- Lemaire G., Da Silva S. C., Agnusdei M., Wade M. and Hodgson J. 2009. Interactions between leaf lifespan and defoliation frequency in temperate and tropical pastures: a review. *Grass and Forage Science*, 64 (4): 341-353.
- Maathuis F. J. M. and Amtmann A. 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the Basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany* 84: 123-133.
- Maas E. V. and Hoffman G. J. 1977. Crop salt tolerance. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*, 102: 115-134.
- Maas E. V., Lesch S. M., Francois L. E. and Grieve C. M. 1994. Tiller development in salt-stressed wheat. *Crop Science*, 34 (6): 1594-1603.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Martins M., Sarmiento D. and Oliveira M. M. 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* 23: 492- 496.
- Moser L. E., Burson B. L. and Sollenberger L. E. 2004. Warm season (C4) grasses. Kleingrass, BluePanic, and Vine Mesquite. En: American society of agronomy, crop science society of America, soil science of America. USA. Cap 1: pp1-14.
- Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* 16: 15-24.
- Munns R. and Rawson H. M. 1999. Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26 (5): 459-464.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25 (2): 239-250.

- Munns R. and James R. A. 2003 Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil*, 253 (1): 201-218.
- Munns R., James R. A. and Lauchli A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57 (5): 1025-1043.
- Munns R. and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Plant Biology*, 59: 651-681.
- Munns R. 2010. Approaches to identifying genes for salinity tolerance and the importance of time scale. En: *Plant stress tolerance. Methods and protocols*. Ramanjulu S. (ed). Oklahoma- EEUU, pp. 25-38.
- Noble C. L. and Rogers M. E. 1992. Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Plant and Soil*, 146 (1): 99-107
- Pääakinskiene I., Griffiths C. M., Bettany A. J. E., Paplauskiene V. and Humphreys M. W. 2000. Anchored simple-sequence repeats as primers to generate species specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. *Theoretical and Applied Genetics*, 100 (3-4): 384-390.
- Passioura J. B. and Munns R. 2000. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27 (10): 941-948.
- Petruzzi H. J., Stritzler N. P., Adema E. O., Ferri C. M. y Pagella J. H. 2003. Mijo Perenne- *Panicum coloratum*. Publicado en internet, disponible en http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/09-mijo_pernne.pdf. Activo desde octubre 2004.
- Poulin J., Weller S. G. and Sakai A. K. 2005. Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona, California and Hawaii. *Diversity and Distributions*, 11 (3): 241-247
- Poustini K. and Siosemardeh A. 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. *Field Crops Research*, 85 (2-3): 125-133.
- R, Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL. Publicado en internet, disponible en: <http://www.R-project.org>. Activo desde 2012.
- Rajendran K., Tester M. and Roy S. J. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 32 (3): 237-249.
- Rasmussen S., Parsons A. J. and Jones C. S. 2010. Metabolomics of forage plants: a review. *Annals of Botany*, 110 (6): 1281-1290.
- Reddy M. P., Sarla N. and Siddiq E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128 (1): 9-17.
- Richards R. A. 1983. Should selection for yield in saline regions be made on saline or non-saline soils? *Euphytica*, 32 (2): 431-438.
- Sabir P. and Ashraf M. 2007. Screening of local accessions of *Panicum millaceum* L. for salt tolerance at seedling stage using biomass production and ion

- accumulation as selection criteria. *Pakistan Journal of Botany*, 39 (5): 1655-1661.
- Schachtman D. P., Lagudah E. S. and Munns R. 1992. The expression of salt tolerance from *Triticum tauschii* in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 (5-6): 714-719.
- Shannon M. C. 1987. Adaptation of plants to salinity. *Advances in Agronomy*, 60: 75-120.
- Sheetal Y., Poonam R., Navider S., Sunita J. and Rajinder K. J. 2008. Assessment of genetic diversity among rice genotypes with differential adaptations to salinity using physio-morphological and molecular markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17 (1) 1-8.
- Stritzler N. P. 2008. Producción y calidad nutritiva de especies forrajeras megatérmicas. Publicado en internet, disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/101-calidad.pdf. Activo desde 2008.
- Skinner R. H. and Nelson C. J. 1995. Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. *Crop Science*, 35:4-10.
- Taleisnik E., Pérez H., Córdoba A., Moreno H., García Seffino L., Arias C., Grunberg K., Bravo S. and Zenoff A. 1998. Salinity effects on the early development stages of *Panicum coloratum* cultivar differences. *Grass and Forage Science*, 53 (3): 270-278.
- Taleisnik E., Grunberg K. y Santa María G. 2008. Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. En: La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria. EDUCC (ed), Córdoba- Argentina, pp. 11-15.
- Tester M. and Bacic A. 2005. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants state of the field. *Plant Physiology*, 137 (3): 791-793.
- Tester M. and Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91 (5): 503-527.
- Tischler C. R. and Ocumpaugh W. R. 2004. Warm season (C4) grasses. Kleingrass, BluePanic, and Vine Mesquite. En: American society of agronomy, crop science society of America, soil science of America. USA. Cap 18: pp 623-643.
- Tomas M. A., Barrios C., Tolozano B. y Pisani M. 2011. Variabilidad genética en una colección de *Panicum coloratum* L. var. *coloratum* analizada por medio de caracteres morfológicos y moleculares. En: Compendio de trabajo e investigación año 2011. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. INTA. 13pp
- Venkateswarlu M., Raje Urs S., Surendra Nath B., Shashidhar H. E., Maheswaran M., Veeraiah T. M. and Sabitha M. G. 2006. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy. *Tree Genetics & Genomes*, 3 (1): 15-24.

- Walter A., Studer B. and Kölliker R. 2012. Advanced phenotyping offers opportunities for improved breeding of forage and turf species. *Annals of Botany*, 110 (6): 1271-1279.
- Yeo A. R. 1983. Salinity resistance: Physiologies and prices. *Plant Physiology*, 58 (2): 214-222.
- Yeo A. R., Lee λ.-S., Izard P., Boursier P. J. and Flowers T. J. 1991. Short and long term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 42 (7): 881-889.
- Young B. A. 1994. Genetic variation in a *Panicum coloratum*L. population with a limited germplasm base. Genetic variation in a *Panicum coloratum* L. population with a limited germplasm base. *Euphytica*, 75 (1-2): 71-76.
- Zeng L. and Shannon M. C. 2000. Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. *Crop Science*, 40 (4): 996-1003.
- Zeng L., Shannon M. C. and Grieve C. M. 2002. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters. *Euphytica*, 127 (2): 235–245.
- Zeng L., Kwona T-R, Liua X., Wilsona C., Grievea C. M. and Gregorio G. B. 2004. Genetic diversity analyzed by microsatellite markers among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different adaptations to saline soils. *Plant Science* 166: 1275-1285.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2): 176–183.

ANEXO 1

TABLAS Y FIGURAS COMPLEMENTARIAS

Tabla 1. Medias y EE de variables de crecimiento en clones de *Panicum coloratum* var. *coloratum* en tratamientos de 0, 200 y 400mM NaCl, durante el ensayo I.

Trat	Clon	A/R		PFR (g/planta)		PFT (g/planta)		PSR (g/planta)		PST (g/planta)	
		media	E.E	media	E.E.	media	E.E.	media	E.E.	media	E.E.
0	13	1,72	0,14	5,42	1,22	13,78	2,5	0,82	0,17	2,16	0,35
0	14	1,64	0,12	8,43	0,95	17,54	0,04	1,3	0,15	3,3	0,27
0	15	1,98	0,16	2,8	0,32	7,02	0,56	0,55	0,09	1,6	0,25
0	16	2,34	0,25	4,54	1,69	10,83	3,05	0,55	0,14	1,73	0,32
0	4	2,13	0,27	7,5	2,41	17,71	3,91	1,02	0,27	2,92	0,55
0	5	2,1	0,3	1,96	0,52	5,33	1,05	0,51	0,14	1,51	0,36
0	8	2,72	0,47	1,85	0,41	5,04	0,71	0,31	0,03	1,11	0,14
0	9	1,99	0,27	1,95	0,91	5	2,67	0,32	0,07	1,01	0,24
200	13	1,58	0,24	2,03	0,82	3,51	1,24	0,34	0,07	0,79	0,13
200	14	1,57	0,14	3,58	0,37	7,01	0,81	0,44	0,05	1,09	0,09
200	15	1,83	0,1	3	0,85	5,71	1,53	0,37	0,05	1,05	0,15
200	16	2,06	0,23	1,91	0,67	3,99	1,25	0,32	0,07	0,95	0,18
200	4	1,99	0,29	1,28	0,17	2,61	0,36	0,14	0,03	0,4	0,09
200	5	1,62	0,24	2,77	0,51	5,19	0,68	0,48	0,08	1,21	0,22
200	8	1,8	0,21	2,48	0,46	5,45	0,8	0,42	0,06	1,13	0,17
200	9	2,22	0,26	2,15	0,83	4,22	1,31	0,26	0,07	0,77	0,15
400	13	1,61	0,15	1,49	0,56	2,69	0,89	0,22	0,04	0,53	0,08
400	14	1,34	0,13	2,8	0,16	4,95	0,66	0,2	0,03	0,48	0,09
400	15	2,44	0,92	4,23	0,29	7,19	0,24	0,28	0,07	0,77	0,15
400	16	2,6	0,36	1,19	0,33	2,67	0,42	0,15	0,02	0,52	0,05
400	4	2,37	0,8	1,54	0,15	2,52	0,22	0,13	0,03	0,33	0,05
400	5	1,43	0,17	1,34	0,61	2,53	0,89	0,23	0,03	0,53	0,06
400	8	2,57	0,85	1,46	0,68	2,65	1,12	0,22	0,08	0,54	0,14
400	9	1,64	0,21	0,83	0,03	1,76	0,22	0,12	0,02	0,3	0,03

Nota: variables y número de repeticiones (n) A/R relación aéreo/radical (7); PFR: peso fresco radical (g/planta) (3); PFT: peso fresco total (g/planta) (7); PSR: peso seco radical (g/planta) (7) y PST: peso seco total (g/planta) (7).

Tabla 2. Radiación y temperatura máxima, mínima y media registrada en invernadero, durante los ensayos (I, II, III, IV, V y VI). Los datos promedio por ensayo.

Ensayos	Temp max	Temp min	Temp media	Radicación cenit	Duración en GD	Duración en días
I	50,7	20,1	29,75	379,33	567	23
	38,1	16	26,37	234,54	632	34
III	nd	nd	22,23	nd	681	44
IV	42,6	17,9	26,6	213,56	819	34
V	45,24	15,2	25,4	nd	663	41
VI	54,1	12	26,32	478,35	480	30

Nota: nd, no hay datos

Tabla 3. Resultados de ANAVA entre ensayos en clones comunes de *P. coloratum* var. *coloratum*, P4 y P15.

A.	P-valor, P4, Ensayos I, II, III, IV y V				
	PSA	NM	TAH GD	TAM GD	NH
Ensayos	0,2383	0,9373	<0,0001	0,0004	<0,0001
Trat	<0,0001	0,0050	<0,0001	0,0147	<0,0001
Ensayos: Trat	0,1839	0,7512	0,0318	0,7508	0,0314
	P-valor, P15, Ensayos I, II, III, IV y V				
	PSA	NM	TAH GD	TAM GD	NH
Ensayos	<0,0001	0,05	0,0042	<0,0001	<0,0001
Trat	<0,0001	0,5674	0,0995	0,0725	0,0159
Ensayos: Trat	0,1439	0,185	0,3852	0,3915	0,0576
B.	P-valor, P4, Ensayos I, II, III, IV, V y VI				
	PSA	NM	TAH GD	TAM GD	NH
Ensayo	0,0102	0,2126	<0,0001	0,0001	<0,0001
Trat	<0,0001	0,0005	<0,0001	0,0047	<0,0001
ENSAYO: Trat	0,035	0,7950	0,0203	0,8183	0,0002
	P-valor P15, Ensayos I, II, III, IV V y VI				
	PSA	NM	TAH GD	TAM GD	NH
Ensayos	0,0001	0,0002	0,013	<0,0001	<0,0001
Trat	<0,0001	0,0465	0,0613	0,0130	0,0790
Ensayo: Trat	0,2067	0,0043	0,5647	0,3613	0,0485

Nota: tratamientos 0 y 200 mM NaCl. Variables y número de repeticiones (n) peso seco aéreo, (PSA) (g/planta) (7); número de macollos (NM) (7); tasa de aparición de hojas GD, (TAH GD) (N H/GD) (7), tasa de aparición de macollos GD, (TAM GD) (N M/GD) (7); número de hojas NH (7). A. Durante los ensayos I, II, III, IV y V. B. Incluye, además de los anteriores el VI. La tabla muestra la probabilidad (P-valor) de que los efectos no sean significativos, $P < 0,05$ indican efectos significativos.

Tabla 4. Análisis de componentes principales de datos relativos de salinidad con respecto a control, obtenidos de clones de *P. coloratum* var. *coloratum* durante los ensayos I, II, III, IV, V y VI para los tratamientos de salinidad 200 y 400mM NaCl.

Ensayos	Clones	Salinidad (mM NaCl)	Autovalores CP 1	Autovectores CP1				
				PSA	NM	TAM GD	NH	TAH GD
I	P4, P5, P8, P9, P13, P14, P15, P16	200	0,49	0,55	0,58	0,4	0,2	0,41
		400	0,49	0,52	0,58	0,03	-0,37	-0,51
II	P1, P2, P3, P4, P7, P10, P11, P15	200	0,71	0,5	0,51	0,4	0,4	0,41
		400	0,6	0,55	0,54	0,6	-0,04	0,31
III	P4, P6, P12, P15	200	0,49	-0,07	-0,32	0,5	0,6	0,54
		400	0,6	0,23	0,57	0,52	0,4	-0,46
IV	P2, P3, P4, P5, P8, P9, P12, P14, P15, P16	200	0,47	0,56	0,58	0,58	0,06	0,04
		400	0,52	0,55	0,57	0,49	-0,17	0,31
V	P3, P4, P5, P9, 12, P14, P15, P16	200	0,79	0,43	0,5	0,48	-0,49	0,3
VI	P2, P3, P4, P14, P15, P16	200	0,6	0,53	0,5	0,49	0,41	0,23

Variables: peso seco aéreo (PSA); número de macollos (NM); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD); número de hojas (NH); tasa de aparición de hojas GD (TAH GD).

Tabla 5. ANAVA de los agrupamientos producto de los análisis de conglomerados en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* con más de dos repeticiones entre ensayos.

	p-value
<i>Cluster</i> de crecimiento en ausencia de salinidad	<0,0001
<i>Cluster</i> de crecimiento en presencia de salinidad	<0,0007
<i>Cluster</i> de tolerancia	<0,0001

Nota: variables peso seco aéreo (PSA); número de macollos (NM); tasa de aparición de hojas GD, (TAH GD); tasa de aparición de macollos GD, (TAM GD); número de hojas, (NH), en ausencia y presencia de salinidad; variables relativas al control. En los ensayos I, II, III, IV, V, VI. La tabla muestra la probabilidad (P) de que los efectos no sean significativos, $P < 0,0001$ indican efectos significativos.

Tabla 6. Test a posteriori de LSD Fisher,

<i>Cluster</i> de crecimiento en ausencia de salinidad	Medias	E.E,			
2	1,86	0,26	A		
1	-1,13	0,24		B	
3	-3,98	0,68			C
<i>Cluster</i> de crecimiento en presencia de salinidad	Medias	E.E,			
3	2,19	1,02	A		
2	0,47	0,29	A		
1	-2,61	0,59		B	
<i>Cluster</i> de tolerancia	Medias	E.E,			
3	2,76	0,42	A		
1	-0,42	0,22		B	
2	-1,84	0,51			C

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

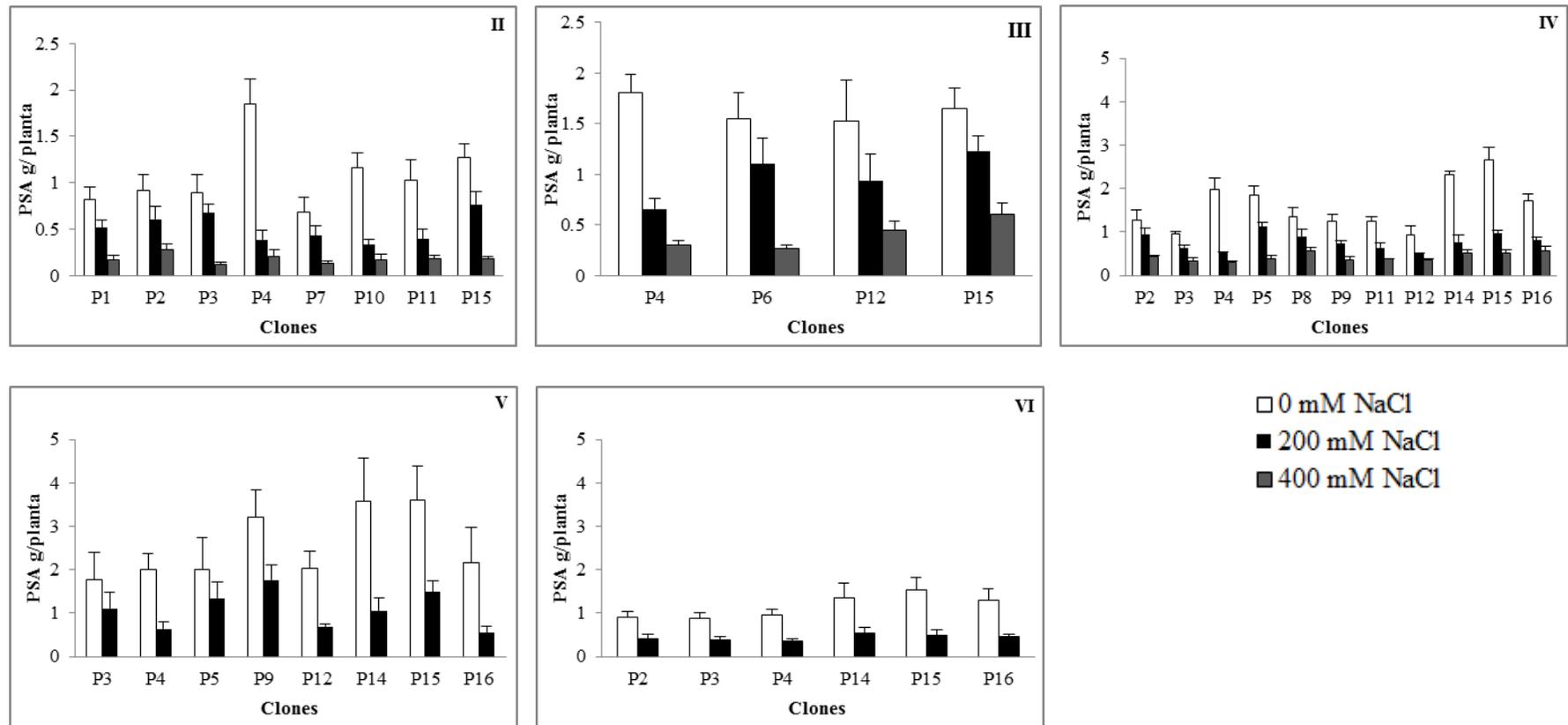


Fig. 1. Efecto de la salinidad sobre el peso seco aéreo (PSA) en clones de *P. coloratum* evaluados en los ensayos II, III, IV, V y VI. En cada panel, las barras indican medias y EE, (6). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

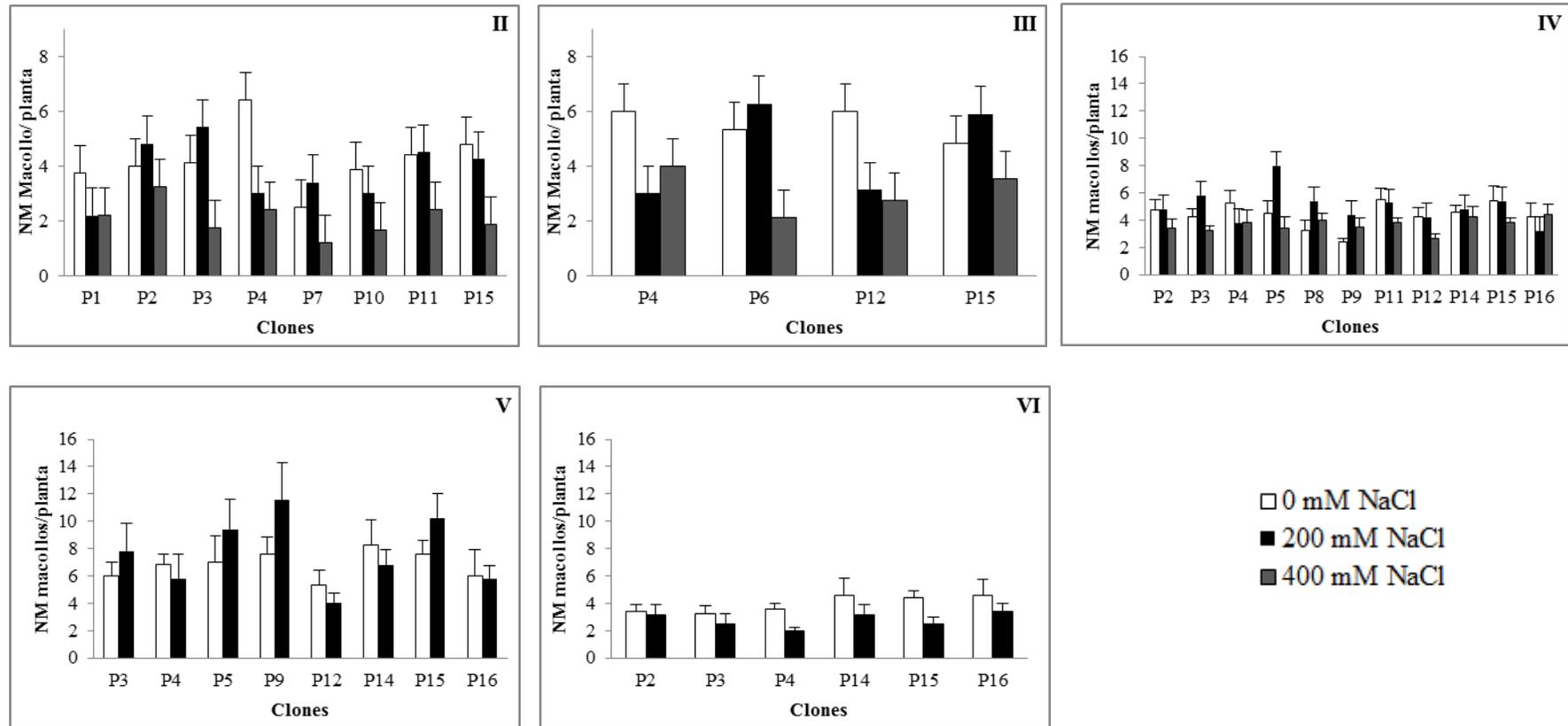


Fig. 2. Efecto de la salinidad sobre el número de macollos (NM) en clones de *P. coloratum* evaluados en los ensayos II, III, IV, V y VI. En cada panel, las barras indican medias y EE, (5). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

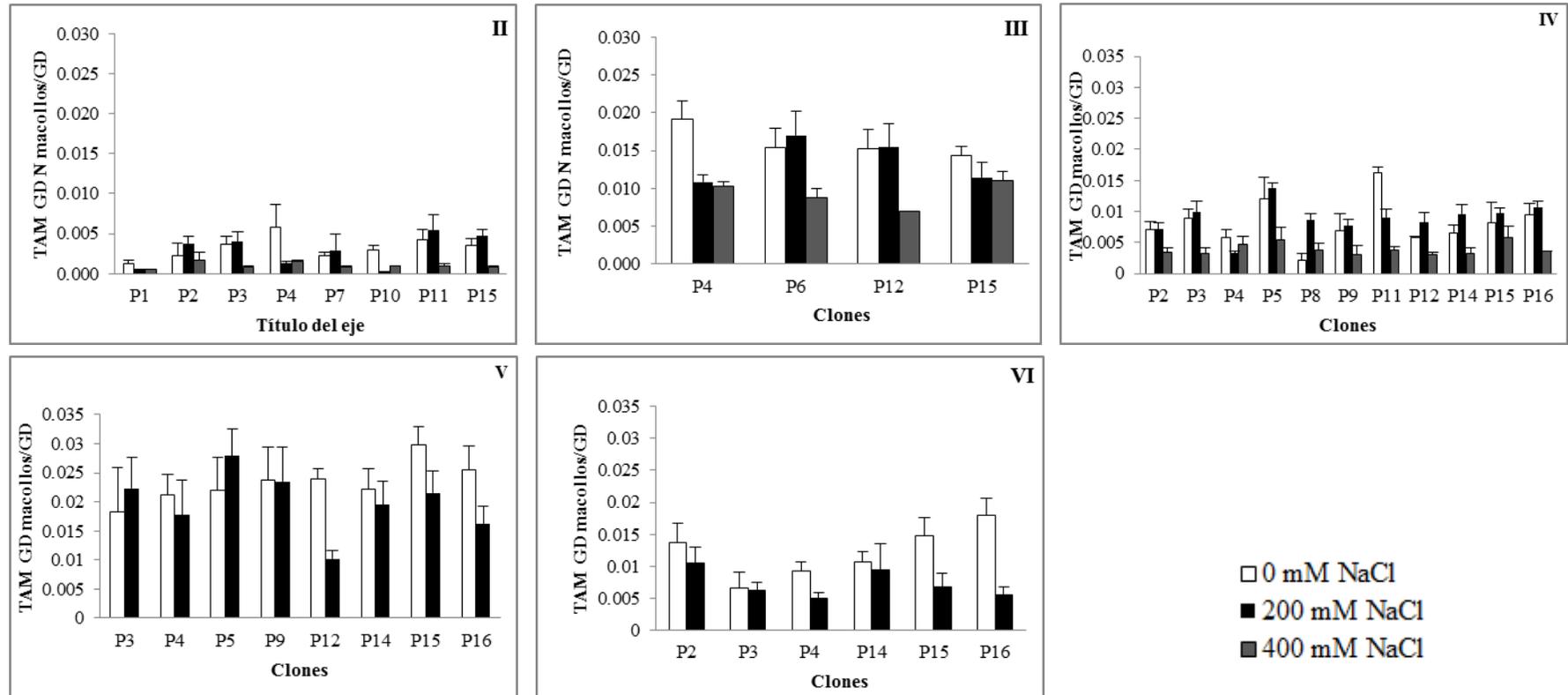


Fig. 3. Efecto de la salinidad sobre tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) (NM/GD) en clones de *P. coloratum* evaluados en los ensayos II, III, IV, V y VI. En cada panel, las barras indican medias y EE, (5). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

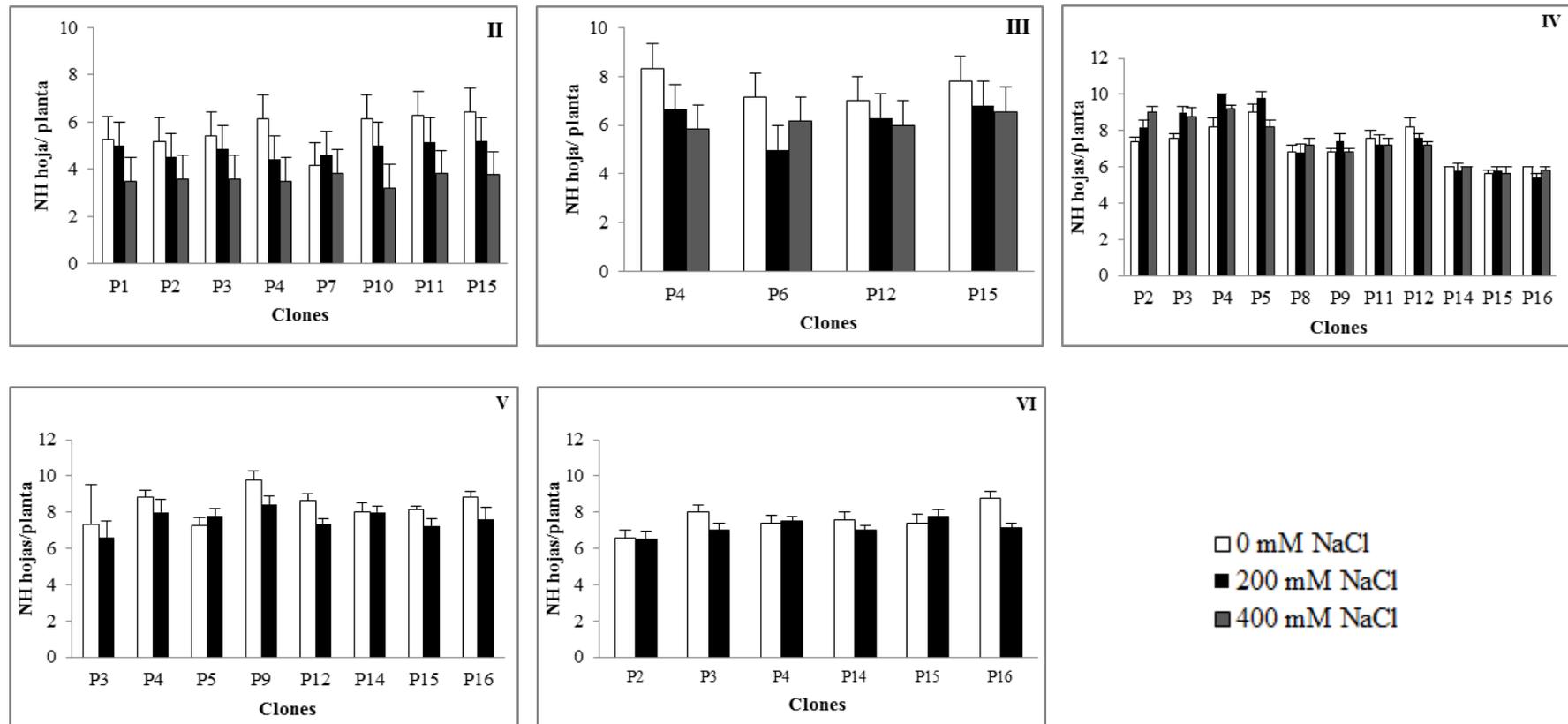


Fig. 4. Efecto de la salinidad sobre el número de hojas (NH) en clones de *P. coloratum* evaluados en los ensayos II, III, IV, V y VI. En cada panel, las barras indican medias y EE, (5). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

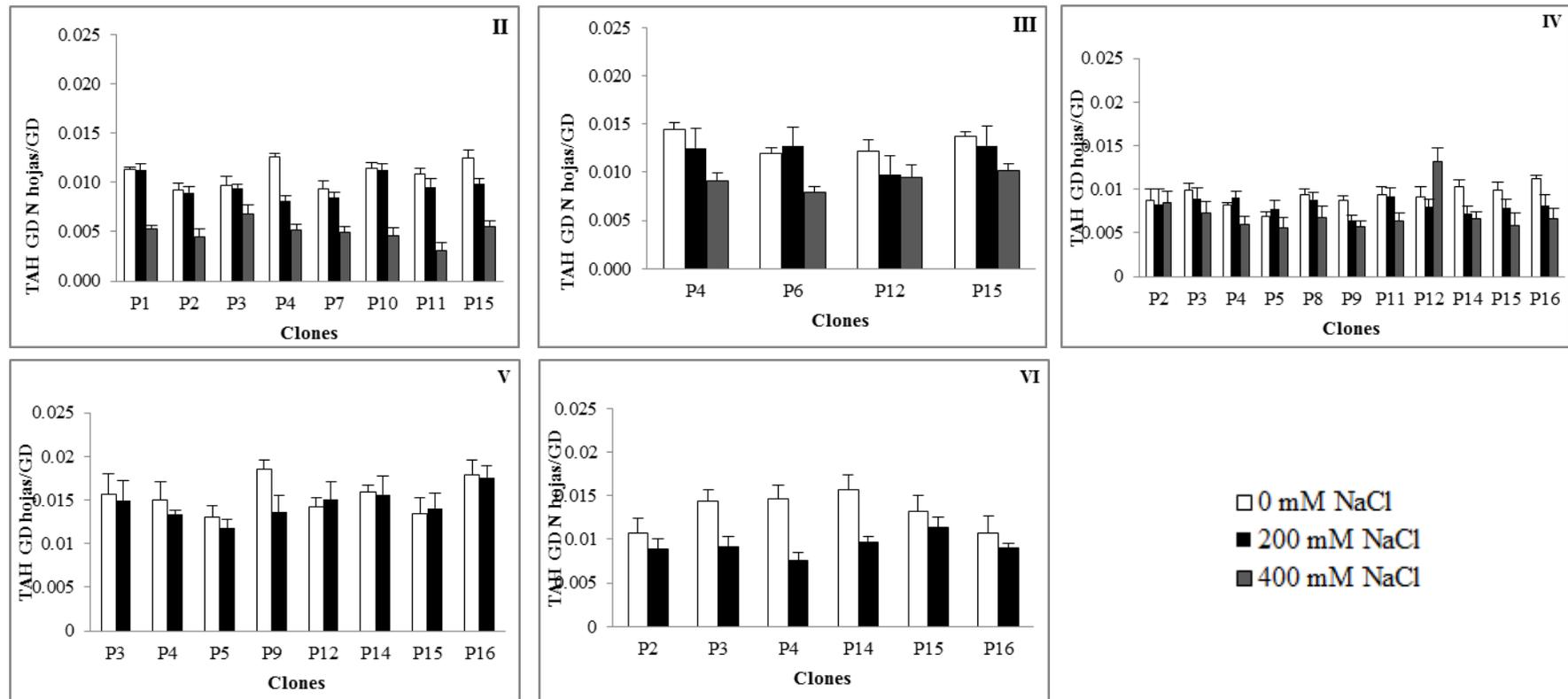


Fig. 5. Efecto de la salinidad sobre la tasa de aparición de hojas GD (TAH GD) (NH/GD) en clones de *P. coloratum* evaluados en los ensayos II, III, IV, V y VI. En cada panel, las barras indican medias y EE, (5). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

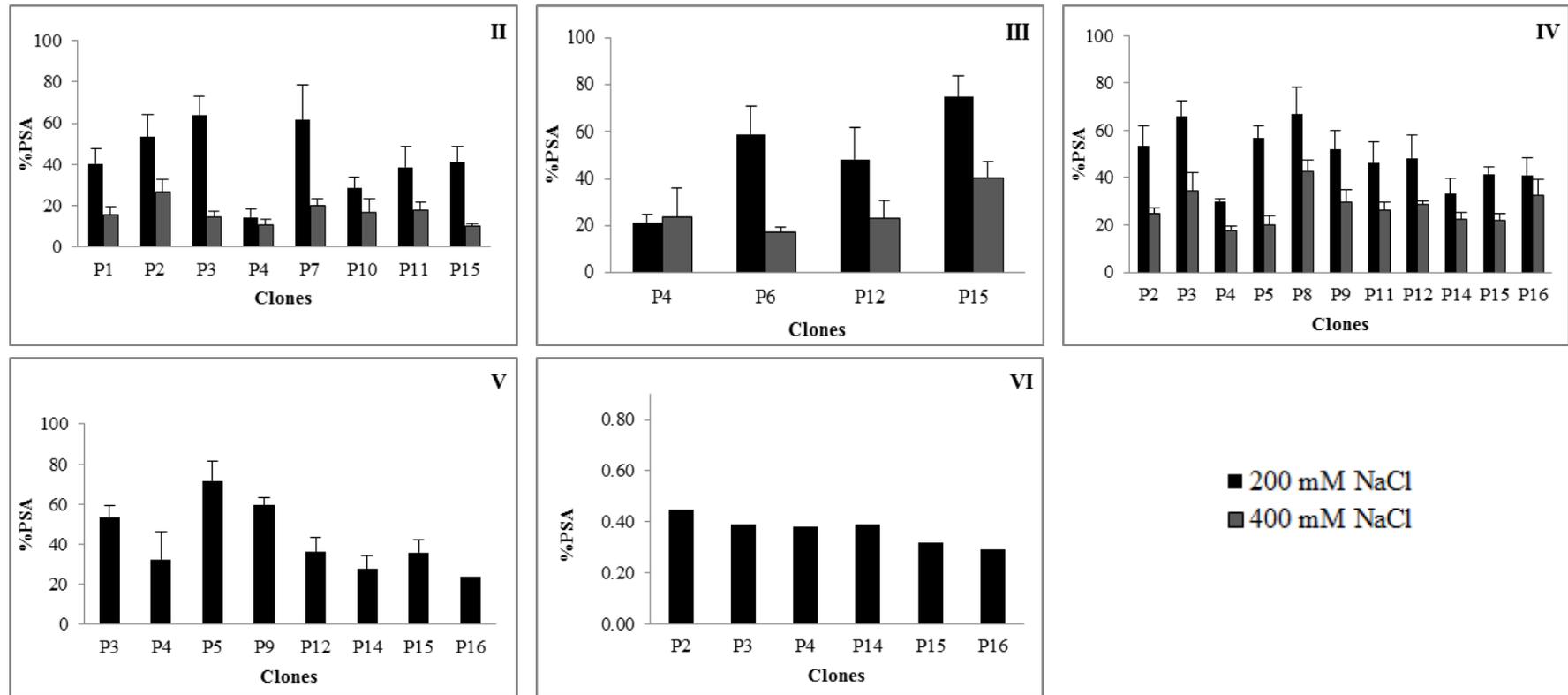


Fig.6. Porcentaje con respecto a la condición no salina sobre el peso seco aéreo (PSA) evaluadas en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* en el ensayo II, III, IV, V Y VI, Las barras indican medias y EE (7). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

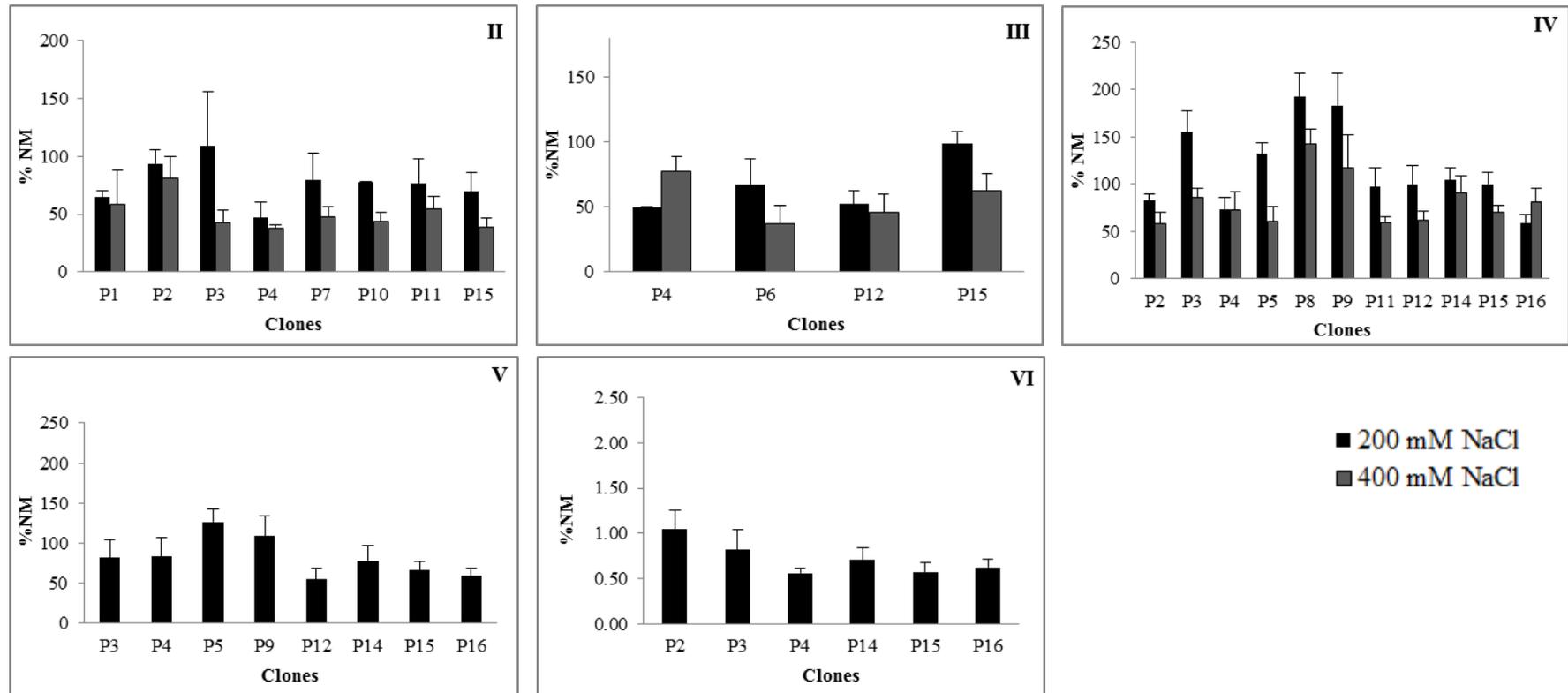


Fig.7. Porcentaje con respecto a la condición no salina sobre el número de macollos (NM) en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* en el ensayo II, III, IV, V Y VI, Las barras indican medias y EE (6). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

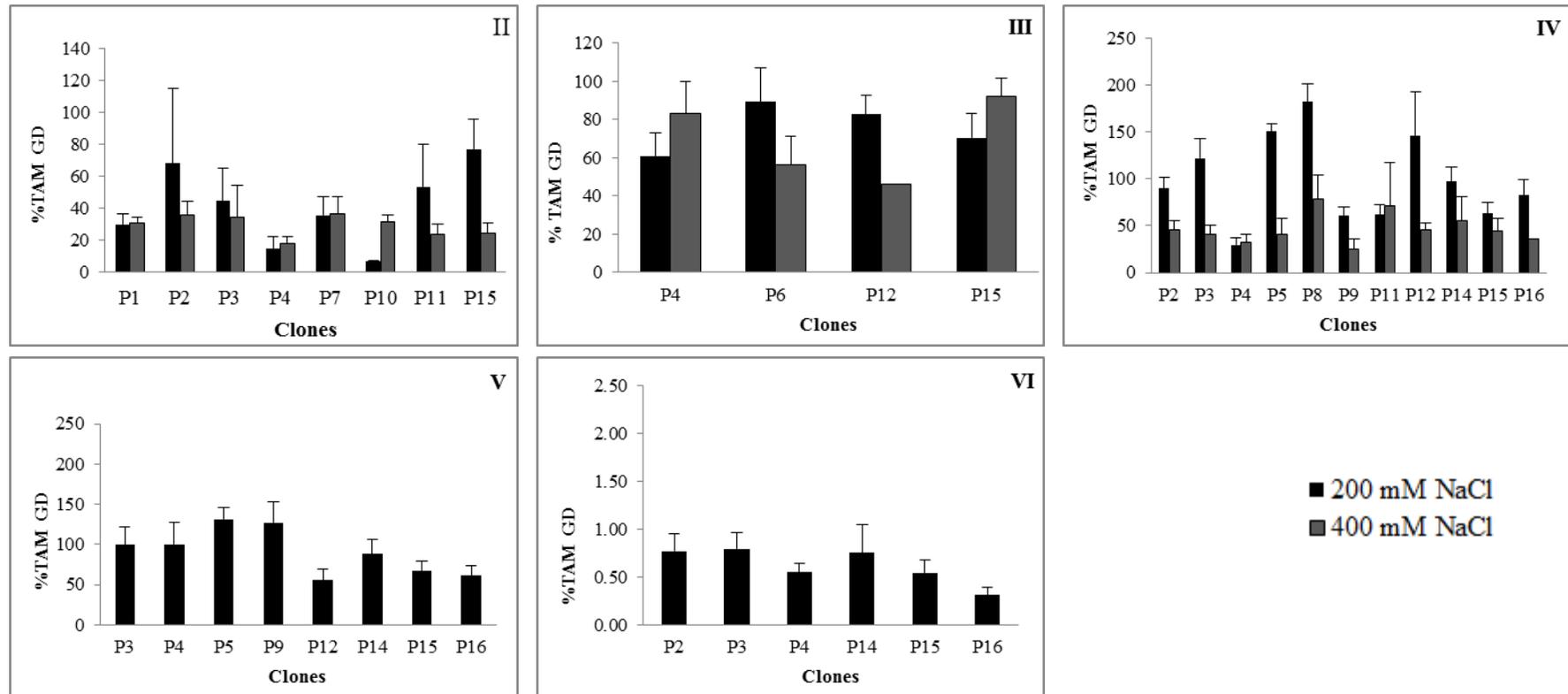


Fig.8. Porcentaje con respecto a la condición no salina sobre la tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) $((NM/ GD)/ (control)) * 100$ en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* en el ensayo II, III, IV, V Y VI, Las barras indican medias y EE (6). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

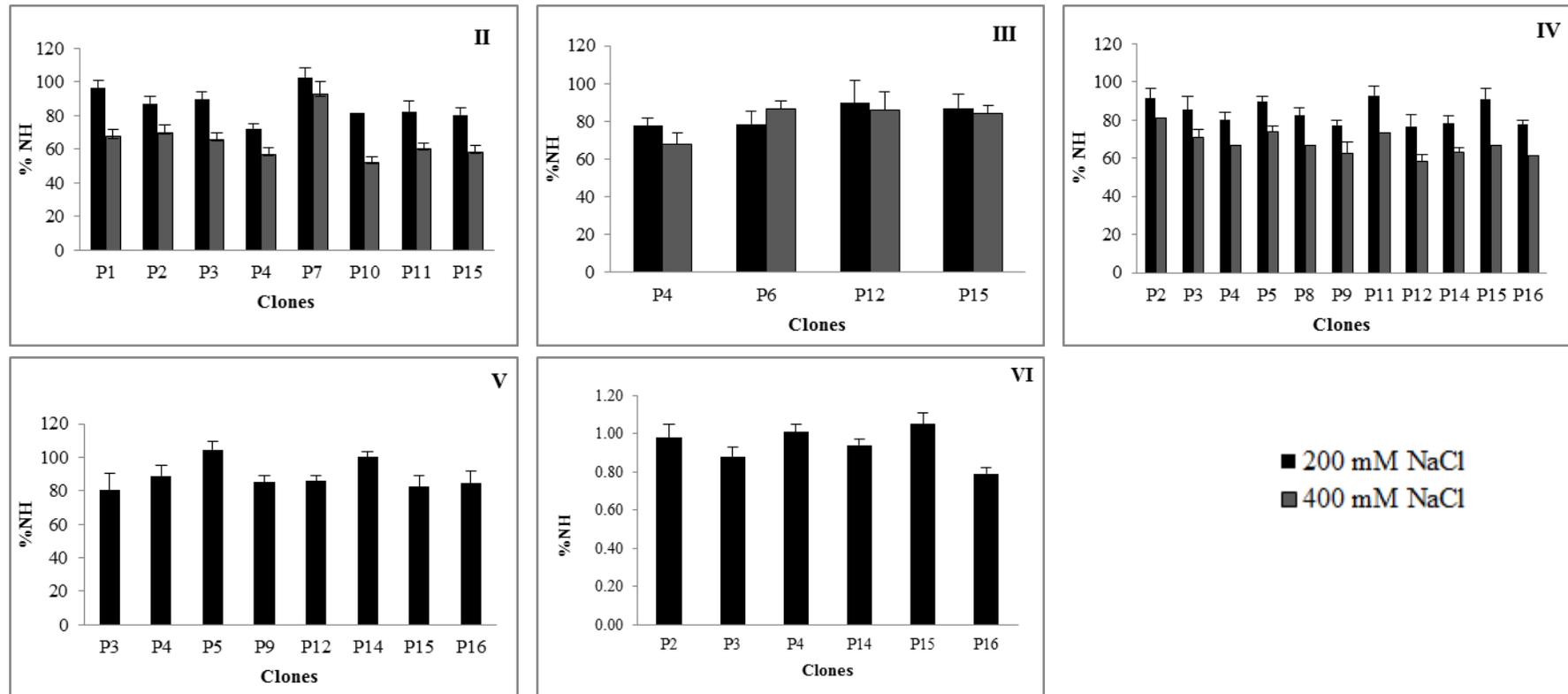


Fig. 9. Porcentaje con respecto a la condición no salina sobre el número de hojas (NH) en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* en el ensayo II, III, IV, V Y VI, Las barras indican medias y EE (6). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

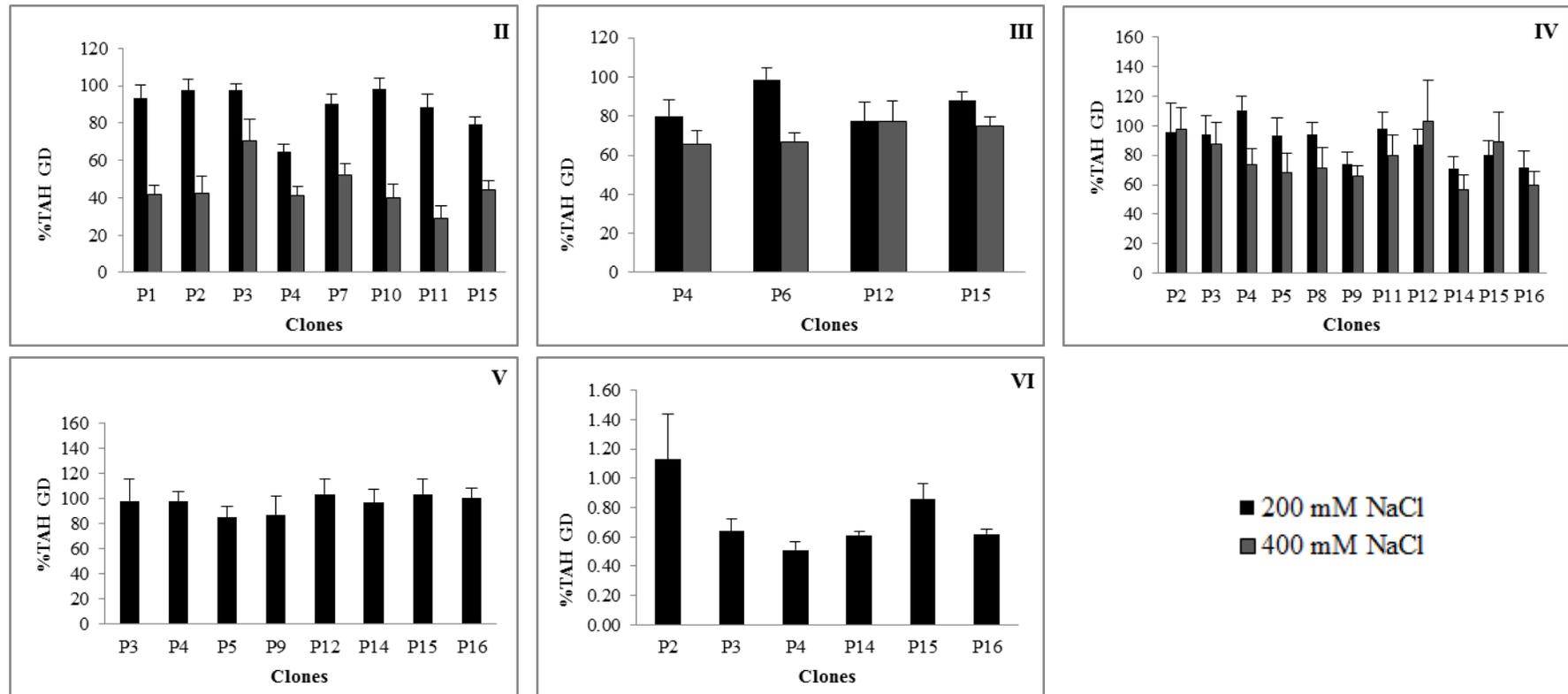


Fig.10. Porcentaje con respecto a la condición no salina sobre la tasa de aparición de hojas GD, (TAH GD) $((NH/ GD)/ (control) *100)$ en clones de *P. coloratum* var. *coloratum* en el ensayo II, III, IV, V Y VI, Las barras indican medias y EE (6). En el cuadrante superior derecho se indica el ensayo.

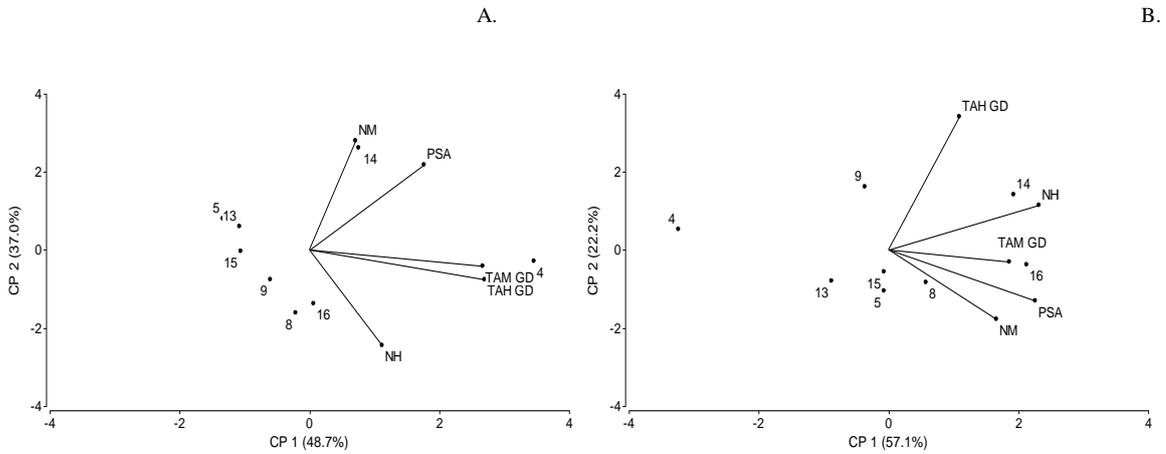


Fig.11. *Biplots* de análisis multivariado de componentes principales (ACP), en ensayo I. Variables: peso seco aéreo (PSA) (g/planta); tasa de aparición de hojas GD (TAH GD) (NH/GD); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) (NM/GD); número de macollos (NM) y numero de hojas (NH). A. En condiciones de ausencia de estrés (0 mM NaCl). B. Presencia de estrés por salinidad de 200 mM NaCl.

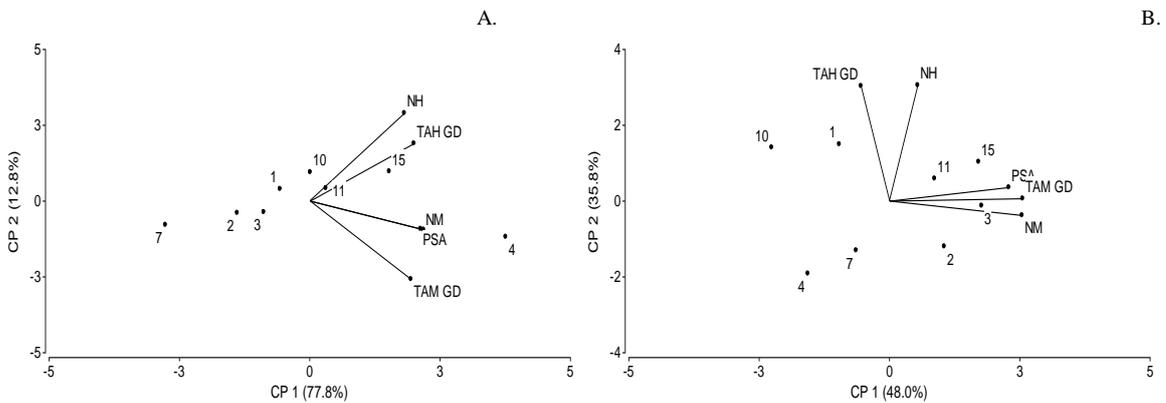


Fig.12. *Biplots* de análisis multivariado de componentes principales (ACP), en ensayo II. Variables: peso seco aéreo (PSA) (g/planta); tasa de aparición de hojas GD (TAH GD) (NH/GD); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) (NM/GD); número de macollos (NM) y numero de hojas (NH). A. En condiciones de ausencia de estrés (0 mM NaCl). B. Presencia de estrés por salinidad de 200 mM NaCl.

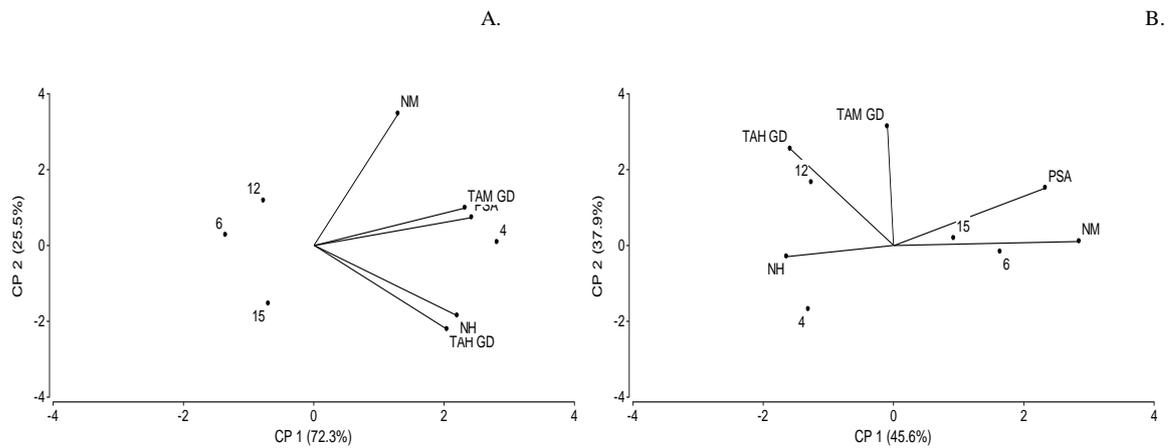


Fig.13. *Biplots* de análisis multivariado de componentes principales (ACP), en ensayo III. Variables: peso seco aéreo (PSA) (g/planta); tasa de aparición de hojas GD, (TAH GD) (NH/GD); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) (NM/GD); número de macollos (NM) y numero de hojas (NH). A. En condiciones de ausencia de estrés (0 mM NaCl). B. Presencia de estrés por salinidad de 200 mM NaCl.

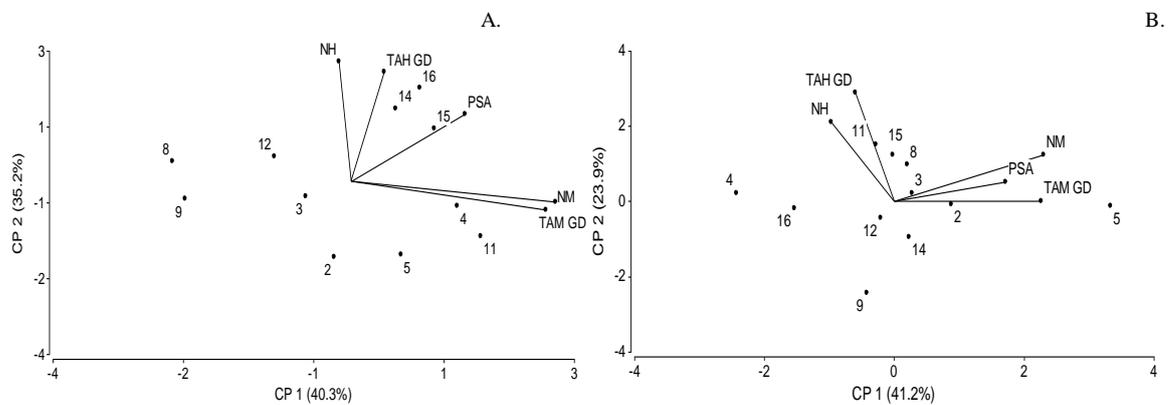


Fig.14. *Biplots* de análisis multivariado de componentes principales (ACP), en ensayo IV. Variables: peso seco aéreo (PSA) (g/planta); tasa de aparición de hojas GD (TAH GD) (NH/GD); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) (NM/GD); número de macollos (NM) y numero de hojas (NH). A. En condiciones de ausencia de estrés (0 mM NaCl). B. Presencia de estrés por salinidad de 200 mM NaCl.

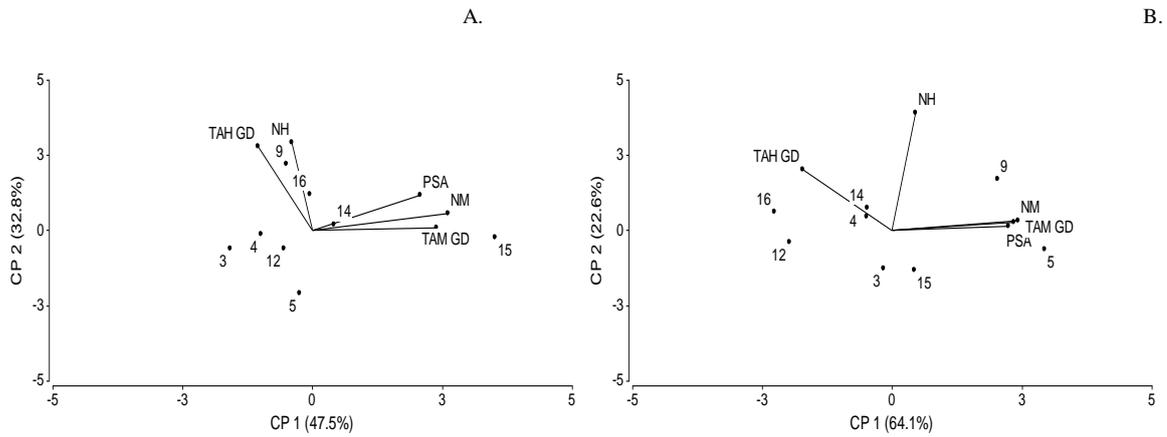


Fig.15. *Biplots* de análisis multivariado de componentes principales (ACP), en ensayo V. Variables: peso seco aéreo (PSA) (g/planta); tasa de aparición de hojas GD (TAH GD) (NH/GD); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) (NM/GD); número de macollos (NM) y numero de hojas (NH). A. En condiciones de ausencia de estrés (0 mM NaCl). B. Presencia de estrés por salinidad de 200 mM NaCl.

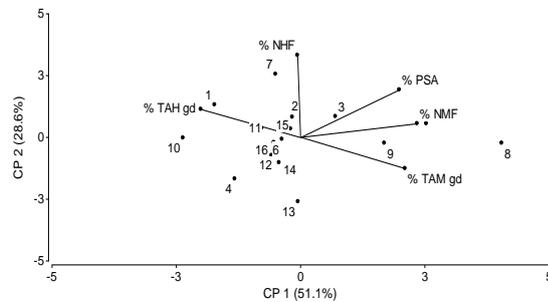


Fig.16. *Biplots* de análisis multivariado de componentes principales (ACP), ensayos I, II, III, IV y V. Variables: peso seco aérea (PSA) (g/planta); tasa de aparición de hojas GD (TAH GD) (NH/GD); tasa de aparición de macollos GD (TAM GD) (NM/GD); número de macollos (NM) y numero de hojas (NH). En presencia de estrés por salinidad de 200 mM NaCl.

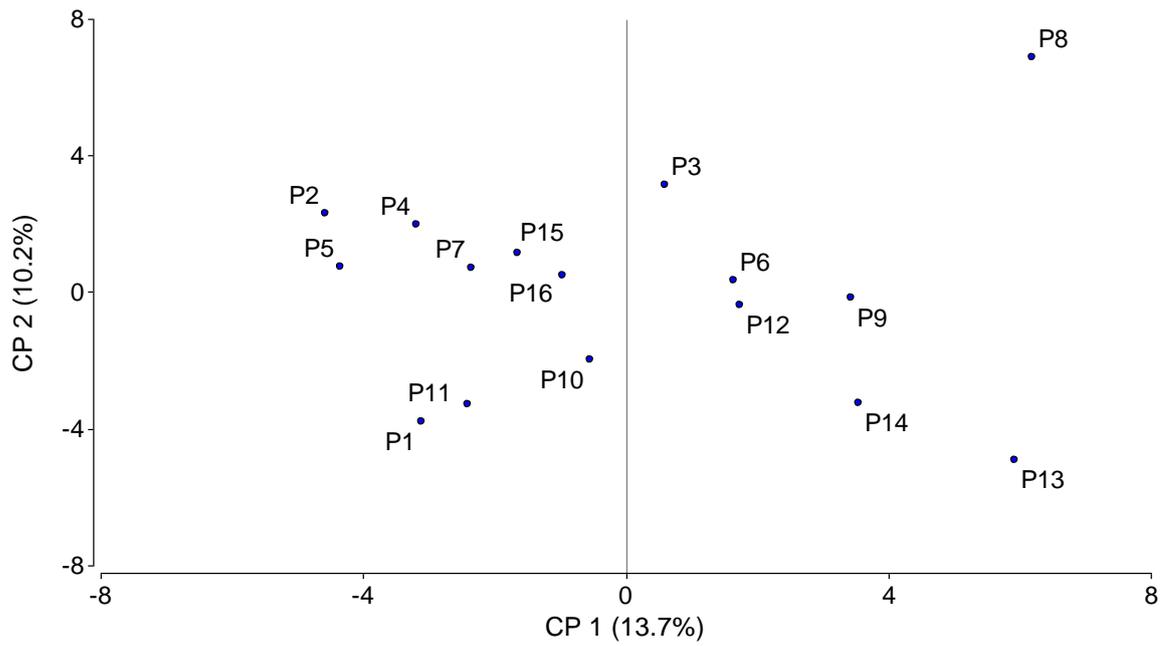


Fig.17. *Biplots* de análisis multivariado de coordenadas principales (ACooP) en ausencia de salinidad usando distancia de Dice. Ordenamiento producido por patrón de bandas de marcadores moleculares ISSR en clones (1 al 16) de *Panicum coloratum* var. *coloratum*.

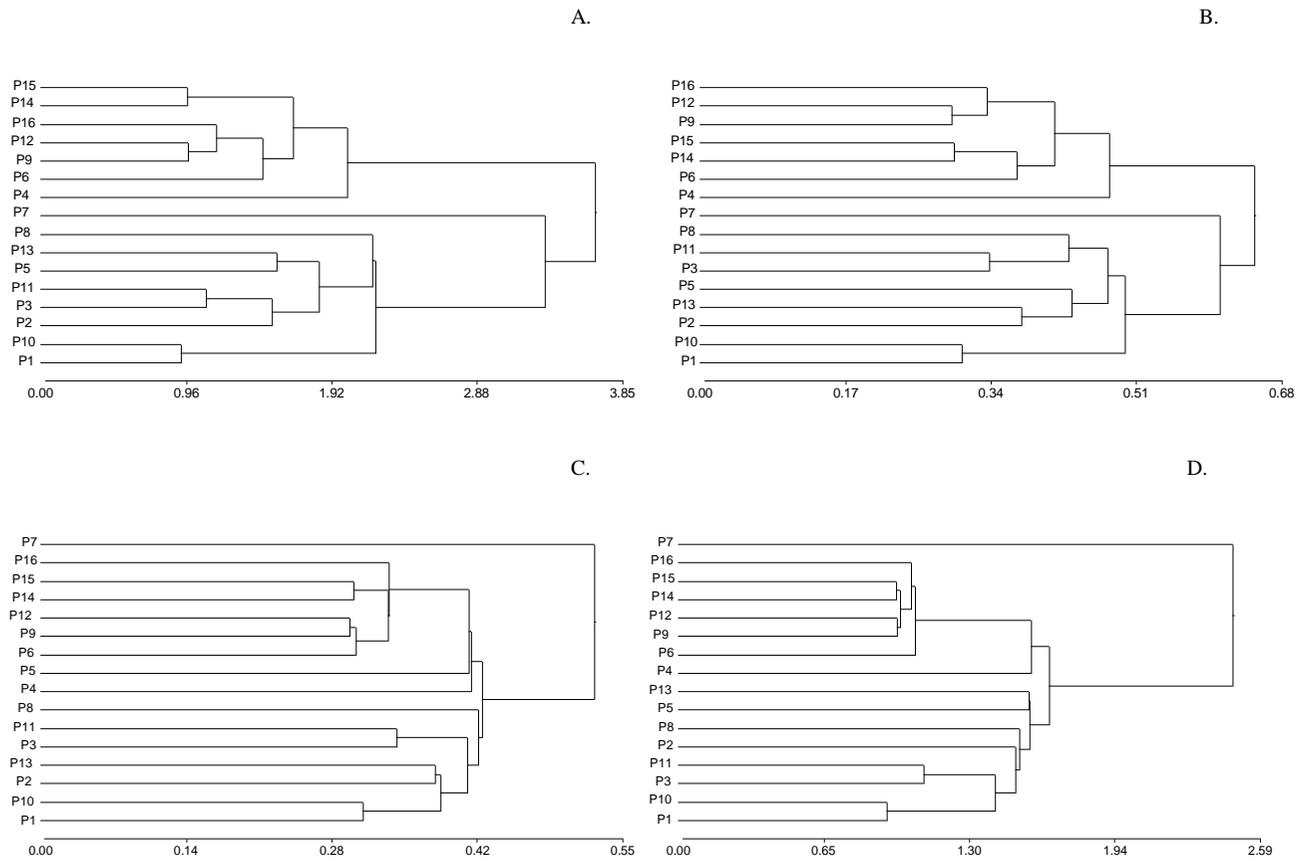


Fig.18. *Dendrogramas* de clones en base a variables de crecimiento vegetativo en ausencia de salinidad, según diversos criterios estadísticos. A. Distancia: Euclidea y método promedio. B. Distancia: Gower y método promedio. C. Distancia: Gower y encadenamiento simple. D. Distancia: Euclidea y encadenamiento simple,

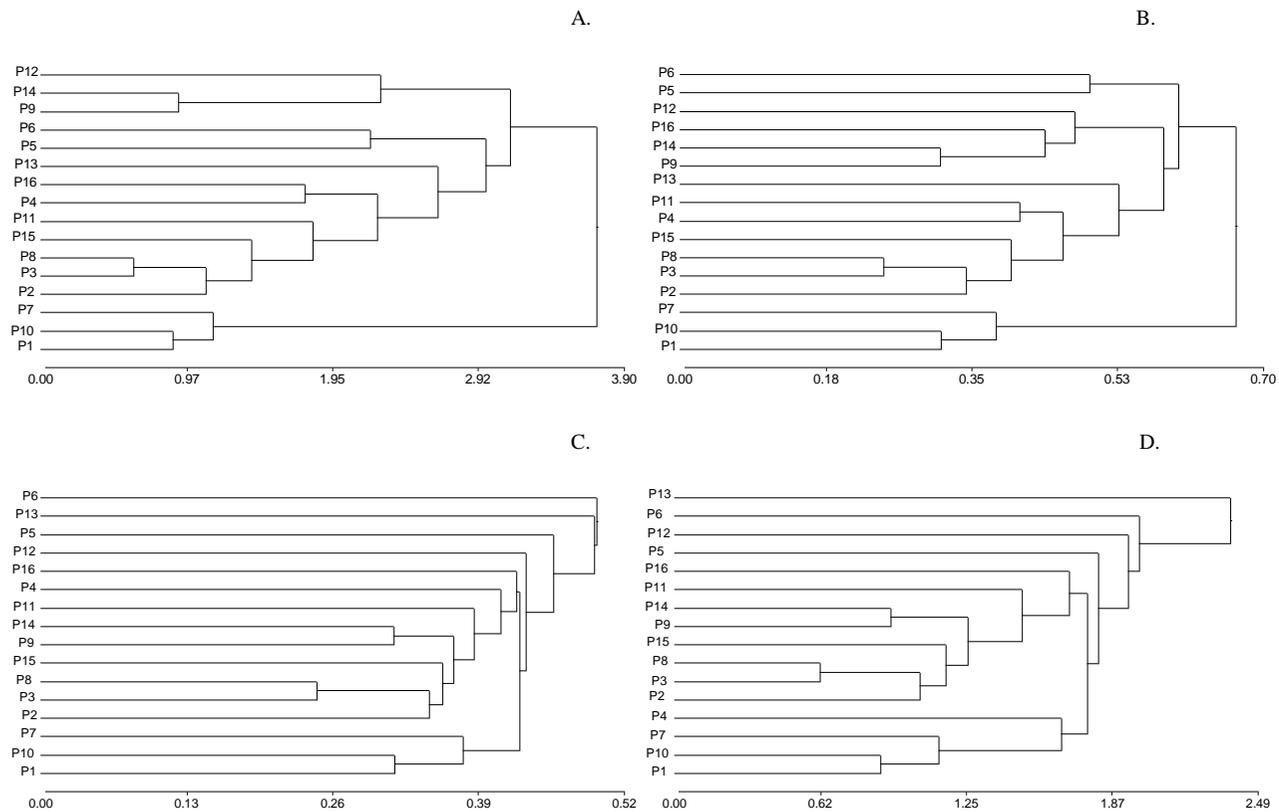


Fig.19. *Dendrograma* de clones en base a variables de crecimiento vegetativo en presencia de 200 mM NaCl según diversos criterios estadísticos. A. Distancia Euclidea y método promedio. B. Distancia Gower y método promedio. C. Distancia Gower y encadenamiento simple. D. Distancia Euclidea y encadenamiento simple.

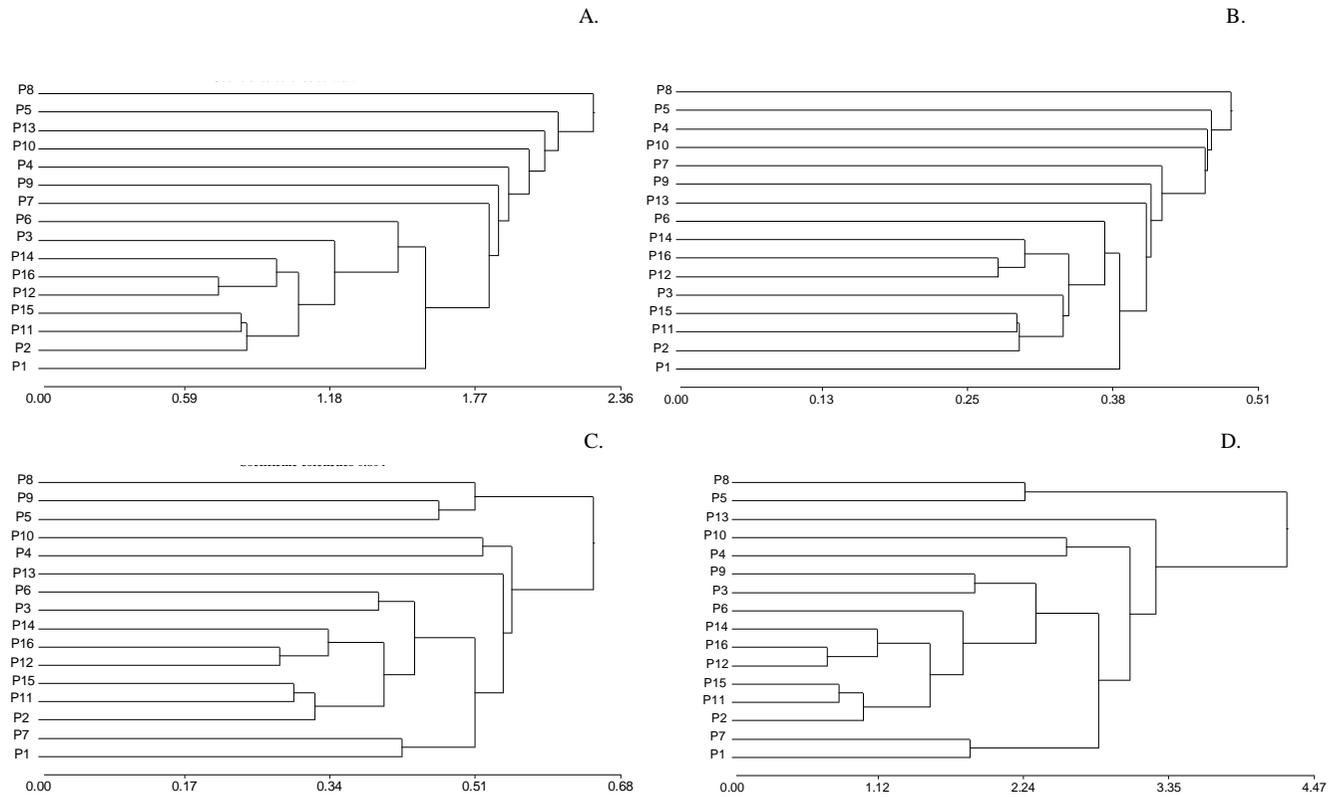


Fig.20. *Dendrograma* de clones en base al porcentaje con respecto a la condición no salina de diversas variables de crecimiento vegetativo según diversos criterios estadísticos A. Distancia Euclídea y método promedio. B. Distancia Gower y método promedio. C. Distancia Gower y método encadenamiento simple. D. Distancia Euclídea y encadenamiento simple.