



*Universidad Nacional de Córdoba*

*Facultad de Ciencias Agropecuarias*

**CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS COMO  
ESTRATEGIA PARA EL MEJORAMIENTO  
GENÉTICO DE BUFFELGRASS  
(*Cenchrus ciliaris* L)**

**Edgardo José Carloni**

Propuesta de Tesis

Para optar al Grado Académico de

Doctor en Ciencias Agropecuarias

*Córdoba, 2016*

**CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS COMO  
ESTRATEGIA PARA EL MEJORAMIENTO  
GENÉTICO DE BUFFELGRASS  
(*Cenchrus ciliaris* L)**

**Edgardo José Carloni**

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Dra. Karina A. Grunberg

**Asesores:** Dra. Paula Bima

Dr. Luis R. Conci

**Tribunal Examinador de Tesis**

Dra. María Valeria Moreno .....

Dr. Carlos Alberto Acuña .....

Dr. Luis Rogelio Conci .....

**Presentación formal académica**

11 de Marzo de 2016

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

## Causas y Azares

Cuando Pedro salió a su ventana  
no sabía, mi amor, no sabía  
que la luz de esa clara mañana  
era luz de su último día.

Y las causas lo fueron cercando  
cotidianas, invisibles.

Y el azar se le iba enredando  
poderoso, invencible.

Cuando Juan regresaba a su lecho  
no sabía, oh alma querida  
que en la noche lluviosa y sin techo  
lo esperaba el amor de su vida.

Y las causas lo fueron cercando  
cotidianas, invisibles.

Y el azar se le iba enredando  
poderoso, invencible.

Cuando acabe este verso que canto  
yo no sé, yo no sé, madre mía  
si me espera la paz o el espanto;  
si el ahora o si el todavía.

Pues las causas me andan cercando  
cotidianas, invisibles.

Y el azar se me viene enredando  
poderoso, invencible.

S.R.

## **AGRADECIMIENTOS**

El trabajo de tesis fue posible gracias a la colaboración de las siguientes personas: Karina, Paula Bima, Luis Conci, Andrea, Eliana, Exequiel, Mariana, Sabrina, Jorgito, Leandro, Carlos, Chiche, Franco, Fabiana Guzmán, Gastón, Evangelina, Carmen, Maria Cristina Acosta, Leo, Paula Abadie, Pilar Crespo, Andrea Peña, Mariano, Ingrid, Paola, Daniela, Walter

... a los evaluadores, por enriquecer los párrafos del manuscrito

... al Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por todo lo brindado

... a Jorge Bergese, por acompañar los estudios de cientos de labordenses

... a mamá, hermanos, Vani, Simón y Elena o ?...

... y a tod@s las personas bellas y queridas que compartieron esta historia

...muchas gracias

## RESUMEN

Buffelgrass es una gramínea forrajera que se reproduce principalmente por apomixis. El objetivo del presente trabajo es generar variabilidad genética, mediante cultivo *in vitro*, en caracteres asociados a tolerancia a sequía a partir de germoplasma introducido de buffelgrass, con la finalidad de incorporarla en un programa de mejoramiento genético de esta especie. El estudio se realizó en una colección activa que se encuentra en el IFRGV, perteneciente al CIAP-INTA. Los resultados del presente trabajo demostraron que el germoplasma apomíctico presentaba diferentes niveles de ploidía. La constitución genética está representada por individuos tetraploides ( $2n=4x=36$ ) y aneuploides ( $2n=43,44$  y  $52$ ). Se encontró una correlación entre el número de cromosomas y el contenido de ADN nuclear. Tres genotipos tuvieron la capacidad de generar callos embriogénicos utilizando anteras como explanto. Las plántulas se originaron a partir de embriones somáticos y el proceso morfogénico se indujo del tejido somático. Se determinó que la eficiencia de inducción y regeneración dependía del genotipo y fue afectada por la fecha de recolección de macollas, los pre-tratamientos o la interacción entre ambos factores. Plantas regeneradas *in vitro* con menor y mayor contenido de ADN nuclear fueron identificadas mediante análisis de citometría de flujo. El análisis de regresión lineal indicó que en el primer caso estos materiales perdieron un cromosoma y los estudios citológicos en uno de ellos lo confirmaron, en tanto que en dos plantas, el aumento en el doble del contenido de ADN nuclear indicó una poliploidización *in vitro*. En seis de los materiales regenerados, el empleo de 22 cebadores *ISSRs* detectaron un 12% de polimorfismo y una divergencia del 5 al 24% con respecto al material utilizado como control. Las plantas trasplantadas a una parcela experimental ( $R_1$ ) presentaron características morfológicas diferentes. Adicionalmente, la progenie de algunos de estos materiales ( $S_1$ ) mostró un comportamiento diferencial en un ensayo de estrés hídrico. Los cambios observados en algunas plantas regeneradas *in vitro* demostraron variación somaclonal. En uno de los genotipos, el manitol utilizado como agente osmótico e incorporado en el proceso de selección *in vitro* permitió obtener materiales tolerantes en caracteres asociados al estrés hídrico.

**Palabras claves.** Apomixis, poliploides, embriogénesis somática, variación somaclonal, selección *in vitro*.

## ABSTRACT

Buffelgrass is a forage grass that reproduces mainly by apomixis. The objective of this research was to increase the genetic variation, by *in vitro* culture, in characters associated with drought tolerance from introduced buffelgrass germplasm, in order to incorporate it into a breeding program for this species. The study was conducted in an active germplasm collection that is located in the IFRGV belonging to CIAP-INTA. The results of the present study showed that the apomictic entries had different ploidy levels. The genetic constitution is represented by tetraploid ( $2n = 4x = 36$ ) and aneuploid individuals ( $2n = 43, 44$  and  $52$ ). A correlation between the number of chromosomes and DNA content was found. Three genotypes had capacity to generate embryogenic callus using anthers as explant. Seedlings were originated from somatic embryos and the morphogenic process was induced from somatic tissue. It was determined that the efficiency of induction and regeneration depended on genotype and was affected by the collection date of the tillers, pre-treatments or interaction between both factors. The flow cytometry analysis detected *in vitro* regenerated plants with lower and higher nuclear DNA content. The linear regression analysis indicated that in the first case these materials lost a chromosome and cytology studies in one of them confirmed, while in two plants, increased at double the nuclear DNA content indicated an *in vitro* polyploidization. In six of the regenerated materials, the use of 22 primers ISSRs detected 12% of polymorphism and divergence of 5 to 24% compared to the material used as control. Plants ( $R_1$ ) grown in the field showed different morphological characteristics. Additionally, the progeny of any of these materials ( $S_1$ ) showed differential behavior in an assay of water stress. The changes observed in some *in vitro* regenerated plants showed somaclonal variation. In one of the entries, mannitol as an osmotic agent incorporated in the process of *in vitro* selection allowed to obtain tolerant materials with characters associated to water stress.

**Keywords.** Apomixis, polyploids, somatic embryogenesis, somaclonal variation, *in vitro* selection.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ANTERAS COMO ESTRATEGIA PARA EL     MEJORAMIENTO GENÉTICO DE BUFFELGRASS (<i>Cenchrus ciliaris</i> L) .....</b>	<b>1</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
HIPÓTESIS .....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
BIBLIOGRAFÍA .....	11
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>20</b>
<b>CONTENIDO DE ADN NUCLEAR Y NIVEL DE PLOIDÍA EN GENOTIPOS     A POMÍCTICOS DE BUFFELGRASS.....</b>	<b>20</b>
INTRODUCCIÓN.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
Material vegetal .....	23
Análisis de citometría de flujo .....	23
Análisis citogenético.....	24
Análisis estadístico .....	25
RESULTADOS .....	25
Análisis de citometría de flujo .....	25
Análisis citogenético.....	28
DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIONES .....	35
BIBLIOGRAFÍA .....	36
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>39</b>

<b>EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ANTERAS DE GENOTIPOS APOMÍCTICOS DE BUFFELGRASS .....</b>	<b>39</b>
INTRODUCCIÓN .....	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
Material Vegetal .....	40
Cultivo de anteras .....	41
Regeneración de plantas .....	42
Preparaciones histológicas .....	42
Análisis estadístico. ....	43
RESULTADOS .....	44
DISCUSIÓN .....	49
CONCLUSIONES .....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	53
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>56</b>
<b>ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN PLANTAS REGENERADAS <i>IN VITRO</i> DE BUFFELGRASS MEDIANTE CMF E <i>ISSR</i> ....</b>	<b>56</b>
INTRODUCCIÓN .....	56
MATERIAL Y MÉTODOS.....	58
Material vegetal .....	58
Citometría de flujo .....	58
Secuencias inter-microsatélites ( <i>ISSRs</i> ).....	59
Evaluación fenotípica .....	60
Análisis estadístico .....	61
RESULTADOS .....	63
Citometría de flujo.....	63
Secuencias inter-microsatélites ( <i>ISSRs</i> ).....	67
Evaluación fenotípica .....	71



DISCUSIÓN .....	73
CONCLUSIONES .....	78
BIBLIOGRAFÍA .....	79
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>83</b>
<b>SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> Y CARACTERIZACIÓN EN CONDICIONES DE     ESTRÉS HÍDRICO DE PLANTAS REGENERADAS DE BUFFELGRASS.....</b>	<b>83</b>
INTRODUCCIÓN .....	83
MATERIALES Y MÉTODOS .....	85
Material vegetal .....	85
Selección <i>in vitro</i> .....	86
DL <sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos .....	86
DL <sub>50</sub> en regeneración de plántulas .....	87
DL <sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos y regeneración de plántulas .....	87
Selección a campo por características deseables de plantas tolerantes <i>in vitro</i> a DL <sub>50</sub> en inducción, regeneración y la combinación de ambas etapas.....	88
Evaluación de la tolerancia a estrés hídrico de la progenie (S <sub>1</sub> ) de plantas regeneradas <i>in vitro</i> (R <sub>1</sub> ) .....	89
Análisis estadístico .....	91
RESULTADOS .....	92
Selección <i>in vitro</i> .....	92
DL <sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos .....	94
DL <sub>50</sub> en regeneración de plántulas .....	95
DL <sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos y regeneración de plántulas .....	96
Determinación de DL <sub>50</sub> en función al NPR en un medio con manitol en regeneración y en ambas etapas del proceso (inducción y regeneración) .....	97
Selección a campo por características deseables de plantas tolerantes <i>in vitro</i> a DL <sub>50</sub> .....	98
Evaluación de la tolerancia a estrés hídrico en la progenie (S <sub>1</sub> ) de plantas regeneradas <i>in vitro</i> (R <sub>1</sub> ) .....	103

DISCUSIÓN .....	109
CONCLUSIONES .....	116
BIBLIOGRAFÍA .....	117
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>122</b>
CONCLUSIONES GENERALES .....	122
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>124</b>
ANEXO .....	124

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Genotipos apomícticos de buffelgrass que constituyen la colección activa a campo sita en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV). .....	21
Tabla 2.2. Índice de fluorescencia (ID), contenido de ADN nuclear (valor 2C) y coeficiente de variación (CV) determinado por citometría de flujo en 16 genotipos apomícticos de buffelgrass.....	28
Tabla 3.1. Proporción de callos embriogénicos (PCE) y número de plantas regeneradas (NPR) a partir del cultivo <i>in vitro</i> de anteras en dos genotipos apomícticos de buffelgrass. ....	48
Tabla 4.1. Caracteres de morfología externa en hoja, tallo y panoja analizados en plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass. ....	61
Tabla 4.2. Contenido 2C de ADN nuclear determinado por citometría de flujo de plantas regeneradas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de anteras de dos genotipos apomícticos de buffelgrass.....	64
Tabla 4.3. Nivel de ADN ploidía calculado a partir del contenido de ADN nuclear en plantas regeneradas <i>in vitro</i> a partir del cultivo de anteras de buffelgrass. ....	66
Tabla 4.4. Número de bandas polimórficas (BP), número de bandas monomórficas (BM), número de bandas totales (BT), proporción de bandas polimórficas (PMF(95)), contenido de información polimórfica (PIC) y porcentaje de amplificación (AMP) generados por las secuencias inter-microsatélites ( <i>ISSRs</i> ) utilizadas para la diferenciación molecular en plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass.....	68
Tabla 4.5. Matriz de distancia de seis plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass y el genotipo NR 51 (C), obtenida de la transformación ( $\sqrt{1-S}$ ) del índice de similitud de Jaccard a partir del análisis generado con 22 cebadores <i>ISSRs</i> . ....	69
Tabla 4.6. Caracteres de morfología externa de hoja, tallo y panoja analizados en plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass. ....	72
Tabla 5.1. Caracteres de morfología externa en hoja, tallo y panoja analizados en plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass. ....	89
Tabla 5.2. Peso fresco de callos embriogénicos (PFCE), proporción de callos embriogénicos (PCE) y número de plántulas regeneradas (NPR) correspondientes al cultivo <i>in vitro</i> de anteras en un medio de inducción con diferentes concentraciones de manitol. ....	95
Tabla 5.3. Caracteres de morfología externa de hoja, tallo y panoja analizados en 17 plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass.....	103

Tabla 5.4. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) seleccionados en MI con manitol.....	105
Tabla 5.5. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) selectos en MI con manitol.....	105
Tabla 5.6. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) seleccionados en MR con manitol.....	106
Tabla 5.7. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) seleccionados en MR con manitol.....	106
Tabla 5.8. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) seleccionados en la etapa de inducción y regeneración de callos embriogénicos (MI y MR con manitol).....	107
Tabla 5.9. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) seleccionados en la etapa de inducción y regeneración de callos embriogénicos (MI y MR con manitol).....	108
Tabla 5.10. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) regenerados <i>in vitro</i> .....	109
Tabla 5.11. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) totales evaluados en condiciones control o estrés hídrico (sequía) en progenies (S <sub>1</sub> ) de buffelgrass que provienen de materiales (R <sub>1</sub> ) regenerados <i>in vitro</i> .....	109
Tabla 7.1. Cebadores, secuencias de nucleótidos (Sec. de nucl.), temperaturas de hibridación (Temp.) y tamaño de bandas (Tam. band.) generadas por los cebadores <i>ISSRs</i> utilizados para la diferenciación molecular en plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass.....	125
Tabla 7.2. Análisis de coordenadas principales (EMD) de siete perfiles moleculares generados con veintidós cebadores <i>ISSRs</i> en plantas regeneradas <i>in vitro</i> de buffelgrass, obtenido a partir de la transformación (sqrt(1-S)) del índice de similitud de Jaccard.....	125

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 2.1.** Histogramas de intensidad de fluorescencia relativa obtenidos tras el análisis simultáneo de núcleos aislados de hojas de buffelgrass y *Zea mays* CE-777 ( $2C = 5,43$  pg ADN) como estándar de referencia. (A) NR 64, (B) NR 136 y (C) NR 158. Los picos 1 y 2 corresponden a los núcleos en la fase  $G_0/G_1$  de buffelgrass (1) y *Zea mays* (2). Picos 3 y 4 corresponden a los núcleos en la fase  $G_2$  de buffelgrass (3) y de *Zea mays* (4). .....27

**Fig. 2.2.** Microfotografías de cromosomas somáticos de genotipos apomícticos de buffelgrass con  $2n = 36$  (A) NR 148, (B) NR 64, (C) NR 157, (D) NR 153, (E) NR 66, (F) NR 63, (G) NR 52 y (H) NR 62. Barra =  $5\mu\text{m}$ . .....29

**Fig. 2.3.** (Continuación) Microfotografías de cromosomas somáticos de genotipos apomícticos de buffelgrass con  $2n = 36$  [(I) NR 67 y (J) NR 49],  $2n = 43$  [(K) NR 50, (L) NR 136, (LL) NR 147 y (M) NR 51]  $2n = 44$  [(N) NR 145] y  $2n = 52$  [(Ñ) NR 158] cromosomas. Barra =  $5\mu\text{m}$ . .....30

**Fig. 2.4.** Diagrama de dispersión que demuestra el análisis de regresión lineal entre el número de cromosomas y las estimaciones en el contenido de ADN nuclear en cada genotipo de buffelgrass. La ecuación del modelo ( $y = a + b x$ ) y el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) se observan en el gráfico. ....31

**Fig. 3.1.** Formación de callos y regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de anteras en buffelgrass. a. Corte transversal de antera con micrósporas uninucleadas (barra =  $100\mu\text{m}$ ). b. Macolla con espiga embuchada. c. Anteras al momento del cultivo. d. Callos en la etapa de inducción a los 7 días de iniciado el cultivo de anteras (ICA). e. Callo no embriogénico. f. callo embriogénico a los 60 días de ICA (barra =  $1\text{mm}$ ). g. Primeros brotes de un callo embriogénico. h. plántulas completas obtenidas en el medio de regeneración. i. Planta en invernadero luego del período de rusticación. ....45

**Fig. 3.2.** Embriogénesis somática de callos provenientes del cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass. a. Corte transversal de una antera al momento del cultivo donde se observan el saco de polen (P) con micrósporas uninucleadas (flecha), tejido conectivo (CN) y las células de la pared: epidermis (ep), endodermis (ed), laminilla media (lm) y tapete (t). Divisiones celulares a partir del tejido conectivo (b), pared (c) y filamento de la antera (d) luego de 15 días de iniciado el cultivo *in vitro* (ICA). e. Corte de un callo embriogénico mostrando un típico embrión somático a los 20 días de ICA. f. Nótese la ausencia de células embriogénicas en el corte de un callo no embriogénico. Barra =  $100\mu\text{m}$ . ....46

**Fig. 3.3.** a. Proporción de callos embriogénicos (PCE) y b. número de plántulas regeneradas (NPR) a partir del cultivo *in vitro* de anteras en tres genotipos apomícticos de buffelgrass. Los valores promedio representan tres fechas de recolección de macollas y pre-tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ). .....47

**Fig. 4.1.** Histogramas de intensidad de fluorescencia relativa obtenidos tras el análisis simultáneo de núcleos aislados de hojas de buffelgrass y *Zea mays* CE-777 ( $2C = 5,43$  pg

ADN) como estándar de referencia. (A) Genotipo NR 51, (B) planta 1 “PI” 0.3M5d. Los picos 1 y 2 corresponden a los núcleos en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de buffelgrass (1) y *Zea mays* (2), mientras que los picos 3 y 4 corresponden a los núcleos en la fase G<sub>2</sub> de buffelgrass (3) y de *Zea mays* (4)..... 65

**Fig. 4.2.** (a) Metafase somática del material NR 51 (planta dadora de anteras) demostrando 43 cromosomas. (b) Metafase somática del individuo PI.6 H2O5d (2n = 42) regenerado *vía* embriogénesis somática mediante el cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass. .... 67

**Fig. 4.3.** *Biplot* de seis plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass (R<sub>1-14</sub>, R<sub>1-15</sub>, R<sub>1-16</sub>, R<sub>1-131</sub>, R<sub>1-132</sub> y R<sub>1-133</sub>) y el genotipo NR 51 utilizado como testigo (C), obtenido de la transformación (sqrt(1-S)) del índice de similitud de Jaccard a partir del análisis generado con 22 cebadores *ISSRs*. .... 70

**Fig. 4.4.** Dendrograma de seis plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass (R<sub>1-14</sub>, R<sub>1-15</sub>, R<sub>1-16</sub>, R<sub>1-131</sub>, R<sub>1-132</sub> y R<sub>1-133</sub>) y el genotipo NR 51 utilizado como testigo (C), obtenido por el método UPGMA sobre una matriz de distancia conformada a partir de la transformación (sqrt(1-S)) del índice de similitud de Jaccard. .... 70

**Fig. 4.5.** Parcela experimental de plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. A. Somaclones con fenotipos diferentes al genotipo dador de anteras (NR 51). B y C, detalle de A..... 72

**Fig. 4.6.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de cinco marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclidea como medida de proximidad. Plantas R<sub>1-14</sub>, R<sub>1-15</sub>, R<sub>1-16</sub>, R<sub>1-132</sub> y R<sub>1-133</sub> regeneradas *in vitro* (R<sub>1</sub>) de buffelgrass. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,938. .... 73

**Fig. 5.1.** Diagrama de dispersión que demuestra el análisis de regresión lineal entre el potencial osmótico (MPa) y las diferentes concentraciones de manitol (mM) en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). La ecuación del modelo (y = a + b x) y el coeficiente de regresión (R<sup>2</sup>) se observan dentro del gráfico. El potencial osmótico fue medido en MS sin agar, previo al autoclavado. .... 93

**Fig. 5.2.** Número de plántulas regeneradas (NPR) a partir del cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass. Los callos embriogénicos fueron inducidos en MI sin manitol y colocados en medio de regeneración (MR) con 0, 25, 50, 75 y 100 mM de manitol. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de manitol (P ≤ 0,05). .... 96

**Fig. 5.3.** Número de plántulas regeneradas (NPR) a partir del cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass. Los callos embriogénicos fueron inducidos en medio de inducción y regeneraron plántulas en medio de regeneración (MR), ambos medios con 0, 25, 50, 75 y 100 mM de manitol. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de manitol (P ≤ 0,05)..... 97

**Fig. 5.4.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia

Euclidea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un MI con 100 mM de manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,787. .... 99

**Fig.5.5.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclidea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un MR con 75 mM (R<sub>1-1-75.1</sub>; R<sub>1-70.4</sub>; R<sub>1-72.1</sub>; R<sub>1-64.1</sub>; R<sub>1-61.1</sub>), 100 Mm (R<sub>1-92.1</sub>) o 150 mM (R<sub>1-120.1</sub>) de manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,846. .... 100

**Fig. 5.6.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclidea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un MI y MR con 100 mM de manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,910. .... 101

**Fig. 5.7.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclidea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un medio sin manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,676. .... 102

**Fig. 7.1.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido con los siguientes *ISSRs*: (A) 17899, (B) AE<sub>2</sub>, (C) D12, (D) HB13, (E) HB14 y (F) ISSR1C. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio). .... 126

**Fig. 7.2.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido con los siguientes *ISSRs*: (A) ISSR1E, (B) ISSR4, (C) ISSR8C, (D) ISSR9E, (E) ISSR9C y (F) RAF16. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio). .... 127

**Fig. 7.3.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido con los siguientes *ISSRs*. (A) RAF4, (B) RAF9, (C) UBC816, (D) UBC825, (E) UBC827 y (F) UBC834. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio). .... 128

**Fig. 7.4.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido

con los siguientes *ISSRs*: (A) UBC840A, (B) UBC840B, (C) UBC850, (D) UBC864. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio)..... 129



## LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentaje
°C	grado centígrado
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrómetro
µM	micromolar
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
2C	contenido de ADN (pg)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANA	ácido naftalenacético
ARN	ácido ribonucleico
BAP	6-benzilaminopurina
BSA	albumina de suero bovino
CHS	contenido hídrico del suelo
CIAP	Centro de Investigaciones Agropecuarias
CMF	citometría de flujo
CN	tejido conectivo
CV	coeficiente de variación
D.E.	desvío estándar
DGC	Di Rienzo, Guzmán y Casanoves
DL50	Dosis letal 50
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato
EAO	especies activas del oxígeno
ed	endodermis
EDTA	ácido etildiaminotetraacético
ep	epidermis
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FL	fluorescencia relativa
FRM	Fecha de recolección de macollas
g	gramo
G <sub>0</sub>	fase G <sub>0</sub> del ciclo celular
G <sub>1</sub>	fase G <sub>1</sub> del ciclo celular
G <sub>2</sub>	fase G <sub>2</sub> del ciclo celular
h	hora
HCl	ácido clorhídrico
ICA	inicio del cultivo <i>in vitro</i> de anteras
IF	índice de fluorescencia
IFRGV	Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IP	ioduro de propidio

ISSRs	inter-microsatélites
KCl	cloruro de potasio
lm	laminilla media
LSD	Mínima Diferencia Significativa
M	molar
m <sup>2</sup>	metro cuadrado
MDA	malondialdehído
MI	medio de inducción
min	minutos
MLGM	modelos lineales generalizados mixtos
MLGs	modelos lineales generalizados
MLGyM	modelos lineales generales y mixtos
mM	milimolar
mm	milímetro
mol.	moles
MPa	megapascal
MR	medio de regeneración
MS	Murashige y Skoog
N	normal
nm	nanómetro
NOA	Noroeste argentino
NPR	número de plántulas regeneradas
NR	Número de registro
P	saco de polen
p.m.	post meridiano
PCE	proporción de callos embriogénicos
PFCE	peso fresco de callos embriogénicos
pg	picogramos
R <sub>1</sub>	plantas obtenidas <i>in vitro</i>
R <sup>2</sup>	coeficiente de regresión
ARNasa	ribonucleasa
s	segundo
S <sub>1</sub>	primera generación obtenida a partir de semilla
t	tapete
T	pre-tratamiento
U	unidad
UV	radiación ultravioleta
v	volumen
VS	variación somaclonal

## CAPÍTULO 1

### CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS COMO ESTRATEGIA PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE BUFFELGRASS (*Cenchrus ciliaris* L)

#### INTRODUCCIÓN GENERAL

En Argentina, el mantenimiento del *stock* ganadero ha sido acompañado de un reordenamiento territorial, con el desplazamiento de la actividad desde la Región Pampeana hacia las demás regiones del país (Rearte, 2007). Una de las zonas en donde la actividad ganadera ha demostrado continuo crecimiento es el noroeste argentino (NOA); pasando de 2 millones de cabezas en el año 2002 hasta llegar a 3,26 millones de cabezas en el 2012 (Observatorio Ganadero, 2013). Algunos trabajos plantean que el incremento del *stock* de animales en las regiones extrapampeanas está encontrando su límite, ya que los aumentos de carga animal no son acompañados con la provisión de forraje correspondiente (Chiossone, 2006; Rearte, 2007; Elizalde y Riffel, 2014).

La región del NOA abarca una superficie donde gran parte de ella corresponde a áreas con lluvias estacionales estivales y marcada estación seca (Lorenzini *et al.*, 1995). Debido a esto, muchas de las gramíneas forrajeras que se desarrollan en dichos ambientes, sufren temporalmente de insuficiencia en la disponibilidad de agua (Pérez, 2005). En particular, se observan deficiencias hídricas a medida que se avanza hacia el sector oeste de la región, alcanzando una situación extrema en el sudoeste, donde las precipitaciones no llegan a satisfacer el 70% de las demandas de las plantas (Conti *et al.*, 2009). Una de las estrategias para mejorar la disponibilidad de forraje, y por ende contribuir al desarrollo de la actividad ganadera, es a través de la utilización de gramíneas que se adapten a las condiciones climáticas de esta gran región. Con este fin, se introdujeron varias especies de gramíneas promisorias, entre las cuales se destaca buffelgrass [*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.] (Ayerza, 1981; Biderbost *et al.*, 2008; Guevara *et al.*, 2009; Tessi *et al.*, 2014).

Buffelgrass es una gramínea que se encuentra distribuida naturalmente en el sur, norte y centro de África, extendiéndose al continente Asiático hasta llegar a regiones semiáridas de India occidental (Hanselka *et al.*, 2004). Los trabajos de colección del material botánico demuestran gran diversidad morfológica en estas regiones, lo que sugiere el lugar de origen de la especie (Pengelly *et al.*, 1992). Buffelgrass presenta buena aptitud forrajera y puede desarrollarse y crecer en ambientes con prolongada sequía. Estas cualidades han hecho que buffelgrass fuese introducido como forraje para ganado bovino en muchas regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, principalmente Australia, países del Norte y Sur de América (Lovelace *et al.*, 1972; Silva *et al.*, 1987; Minson y Hacker, 1995; Ramírez *et al.*, 2001; Hacker y Waite 2001). En la actualidad, se encuentra naturalizado en muchos de los países en los cuales fue introducido y se estima que se cultiva en más de 50 millones de hectáreas de todo el mundo (Hanselka *et al.*, 2004).

Los trabajos de mejoramiento genético vegetal han demostrado tener alto impacto en buffelgrass (Hussey y Burson, 2005). Por ejemplo, en Texas (EEUU) la adopción de materiales con mayor tolerancia a sequía han permitido desplazar el área de producción de la especie hacia nuevas regiones del sur de dicho estado y norte de México. Posteriormente, materiales con mayor tolerancia a frío, permitieron ampliar la superficie de adaptación alrededor de 160 km al norte del área de producción de Texas (Bashaw, 1980). En la actualidad, diferentes ecotipos con nuevas características agronómicas han sido liberados como cultivares en varios de los países donde fue introducida la especie (FAO, 2011). En Argentina, la mayoría de los cultivares que se comercializan provienen de colecciones internacionales (Pemán, 2000), razón por la cual, nuestro grupo de trabajo del IFRGV perteneciente al CIAP-INTA ha iniciado un programa de introducción, evaluación y mejoramiento de la especie (Griffa 2002; 2010; Griffa *et al.*, 2006; 2010; Colomba *et al.*, 2006; López Colomba *et al.*, 2011; 2013; Tommasino *et al.*, 2012; Quiroga *et al.*, 2013). Al presente, existe un cultivar desarrollado e inscripto por nuestro grupo de trabajo y varios materiales promisorios en etapa de evaluación (Griffa *et al.*, 2011; López Colomba *et al.*, 2013; Quiroga *et al.*, 2013).

Buffelgrass pertenece a un complejo agámico, poliploide, donde la mayoría de sus miembros se reproducen por apomixis, mediante el mecanismo de aposporia seguido por

pseudogamia (Fisher *et al.*, 1954; Snyder *et al.*, 1955; Jessup *et al.*, 2003; Chemisquy *et al.*, 2010). En este tipo de reproducción, el saco embrionario se origina directamente por mitosis a partir de una célula somática de la nucela (Snyder *et al.*, 1955; Jessup *et al.*, 2003; Ozias-Akins, 2006). Por tal motivo, la meiosis y la fecundación no están involucrados en el desarrollo del embrión y la progenie de las plantas contienen exactamente el mismo genotipo de la planta que lo origina (Ozias-Akins, 2006; Ozias-Akins y van Dijk, 2007; Pessino y Ortiz, 2010). Durante mucho tiempo, se clasificó a buffelgrass como apomítico obligado, sin embargo, la aparición de una planta fuera de tipo condujo a nuevas investigaciones citoembriológicas (Bashaw, 1962). Dicho trabajo determinó que se trataba de un germoplasma sexual, posteriormente, otros estudios reportaron apomixis facultativa en la especie (Bray, 1978; Sherwood *et al.*, 1980).

La apomixis es un carácter utilizable en el mejoramiento de plantas, ya que puede constituir una herramienta para la estabilización de genotipos superiores (Koltunow *et al.*, 1995; Miles, 2007). La ventaja consiste en que la variabilidad genética encontrada puede ser fijada inmediatamente en la progenie por un número ilimitado de generaciones (Hanna y Bashaw, 1987). No obstante, el enfoque de selección de clones impone cierta restricción en la variabilidad dentro de los individuos de una misma población apomítica y, en algunos casos, dificulta los trabajos de mejoramiento. En particular, si no se dispone de materiales botánicos colectados de sus lugares de origen o de un germoplasma sexual, o si en los individuos apomíticos facultativos el grado de hibridación se encuentra influenciado por el ambiente (Sherwood *et al.*, 1980). En este contexto, surge la necesidad de buscar alternativas, con el fin de contribuir a la obtención de individuos con características agronómicas deseables y diferentes a los materiales genéticos apomíticos introducidos.

Diferentes herramientas biotecnológicas y los avances en biología molecular brindan alternativas que contribuyen a los programas de mejoramiento vegetal. Desde los más diversos estudios en células cultivadas *in vitro*, pasando por la variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981), producción de haploides y doblehaploides (Germanà, 2011), hibridación somática y selección *in vitro* (Jain, 2001; Yan *et al.*, 2004), hasta la transformación y obtención de plantas transgénicas (Birch, 1997), son algunos de los tantos

ejemplos. Giri y Praveena (2015) en una revisión sugieren que la implementación de estas herramientas permitirá resolver problemas agronómicos en gramíneas, tales como producción de forraje y tolerancia a estreses abióticos. Asimismo, un requisito básico para utilizar muchas de estas herramientas biotecnológicas es contar con un sistema de regeneración *in vitro*, eficiente y reproducible (Neelakandan y Wang, 2012).

Por lo general, cuando un fragmento vegetal o explanto es colocado *in vitro*, en condiciones asépticas y en un medio de cultivo adecuado, todas las células vegetales tienen la potencialidad de dar origen a una planta completa, capacidad que se conoce como totipotencia (Vasil, 2008). A pesar de ello, algunas especies presentan cierta dificultad para generar plantas mediante los diferentes procedimientos del cultivo *in vitro*, y éstas se consideran recalcitrantes (Bonga *et al.*, 2010). Además, varios son los factores que afectan la capacidad y eficiencia de regeneración, entre los cuales se mencionan al genotipo (Tomes y Smith, 1985), tipo y edad del explanto (Ruaud, 1993), reguladores de crecimientos (Colomba *et al.*, 2006), medio de cultivo (Samson *et al.*, 2006), pre-tratamientos y estado fisiológico de la planta donante (Dunwell, 1976, Takahata *et al.*, 1991).

En buffelgrass, la regeneración *in vitro* de plantas se ha demostrado mediante la embriogénesis somática indirecta y organogénesis directa e indirecta (Kackar y Shekhawat 1991; Murty *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1995; Bhat *et al.*, 2001; Colomba *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2009; Kumar y Bhat 2012; Kumar *et al.*, 2015). La diferencia entre ambos radica en que la embriogénesis somática permite regenerar plantas mediante embriones somáticos; mientras que en organogénesis, las plantas se generan a partir de la formación de yemas o de meristemas, como por ejemplo hojas, tallos o raíces (Yadav *et al.*, 2009; Kumar y Bhat 2012; Kumar *et al.*, 2015). Si bien ambos procesos son importantes en el cultivo *in vitro*, los cultivos embriogénicos han sido asociados a una fuente de mayor uniformidad en general (Vasil, 2005), convirtiéndose en el sistema preferido de células blanco para la transformación y regeneración de plantas en muchos de los cultivos transgénicos (Weeks *et al.*, 1993; Wan y Lemaux 1994).

Al igual que en otras especies, en buffelgrass se menciona que la eficiencia de regeneración de cultivos embriogénicos se encuentra gobernado por el genotipo y el tipo de explanto (Colomba *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2009) e incluso, algunos materiales permanecen recalcitrantes (Colomba *et al.*, 2006). En algunas especies, es posible aumentar la eficiencia en la capacidad de regeneración modificando o manipulando algunos de los factores que influyen en la capacidad de obtener cultivos embriogénicos. Por ejemplo, en maíz o arroz, la descendencia híbrida que surge de los cruzamientos entre parentales con capacidad de regenerar con uno recalcitrante, normalmente producen mayor cantidad de plantas (Bishnoi *et al.*, 2000; Binott *et al.*, 2008). Aunque, debido al tipo de reproducción dicha práctica en buffelgrass se torna dificultosa. Otra estrategia para aumentar la eficiencia de regeneración consiste en cultivar diferentes tipos de explantos (Litz y Gray, 1995).

En buffelgrass, los explantos utilizados como fuente para generar embriogénesis somática son inflorescencias (Kackar y Shekhawat, 1991; Murty *et al.*, 1992), semillas (Ross *et al.*, 1995; Bhat *et al.*, 2001), embriones maduros (Colomba *et al.*, 2006) y brotes apicales (Yadav *et al.*, 2009; Kumar y Bhat, 2012). El empleo de un explanto u otro, depende en gran medida de la factibilidad de utilizarlos y los objetivos del trabajo. Por ejemplo, entre los más empleados se mencionan semillas, embriones maduros o brotes jóvenes recién germinados, posiblemente debido a su buena respuesta en general y a su amplia disponibilidad durante cualquier época del año. Mientras que la utilización de diferentes tejidos juveniles, tales como embriones inmaduros o inflorescencias jóvenes, posiblemente se deba a que son considerados morfológicamente más sensibles y competentes en su respuesta embriogénica. Asimismo, los explantos juveniles son a menudo la única opción práctica para obtener cultivos embriogénicos en algunas plantas leñosas (Litz y Gray 1995; Bonga *et al.*, 2010).

Un tipo de explanto que puede ser utilizado como alternativa para lograr embriogénesis somática y posterior regeneración de plantas son las anteras. Por lo general, este tipo de explanto es utilizado en el mejoramiento vegetal para obtener plantas haploides y doblehaploides (Cistué *et al.*, 1999; Kruczkowska *et al.*, 2002; Labbani *et al.*, 2007; Parra-Vega *et al.*, 2012). No obstante, las anteras poseen células somáticas que rodean a la

microsporas con alta capacidad de proporcionar cultivos embriogénicos (Faure *et al.*, 1996; Niimi *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2006). Esta capacidad hace que el cultivo de anteras sea adoptado también como un sistema de micropropagación de plantas en muchos cultivos frutivinícolas y ornamentales (Chen *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2013; Winarto *et al.*, 2011). Por ejemplo, en diferentes cultivares de *Vitis vinifera* L. se observa que las anteras producen las mejores respuestas embriogénicas en comparación con otros tipos de explantos y otorgan la posibilidad de aumentar la eficiencia de regeneración en algunos materiales recalcitrantes (Mauro *et al.*, 1986; Perrin *et al.*, 2004; López-Pérez *et al.*, 2005). En híbridos de *Lilium* x 'Enchantment' debido a la alta eficiencia de regeneración e inducción de callos embriogénicos, las anteras son utilizadas como explanto para obtener bulbos libres de virus de origen somático (Niimi *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2006).

El cultivo *in vitro* de células o tejidos también ofrece la posibilidad de regenerar plantas con características morfológicas diferentes al material de origen. Larkin y Scowcroft (1981), una de las revisiones más citadas sobre el tema, denominaron a este fenómeno como variación somaclonal (VS). Adicionalmente, proponen el término de somaclones a las plantas con cambios derivados de cualquier forma de cultivo celular. En ciertas situaciones, algunos cambios son debido a variaciones epigenéticas, que suelen ser temporales y no se manifiestan en la progenie de plantas regeneradas (Kaeppler *et al.*, 2000). Sin embargo, existen cambios que conducen a modificaciones permanentes en el genoma vegetal y varios son los trabajos que comprueban la permanencia en la progenie, tanto en plantas propagadas de forma sexual como asexual (Jain, 1997; Taylor *et al.*, 1993; Duncan *et al.*, 1995; Thieme y Griess, 2005; López Colomba *et al.*, 2013). Estos últimos son los explorados para contribuir con el desarrollo de una nueva variedad (Jain, 2001). Cardone *et al.*, (2010) sugiere que la variación somaclonal representa una fuente de variabilidad de fácil acceso, para ser utilizada en los programas de mejoramiento de poblaciones apomícticas.

Cambios relacionados con VS se mencionan en papa, tomate y caña de azúcar; donde los somaclones mostraron, a diferencia del material de origen, resistencia a patógenos causantes de enfermedades (Larkin y Scowcroft, 1983; Shahin y Spivey, 1986; Leal *et al.*, 1996; Thieme y Griess, 2005) o mejoras en rendimiento y en sus características



organolépticas (Rietveld *et al.*, 1991; Evans, 1989; Thieme y Griess, 2005). Tamaño y número de flores, altura y diámetro de plantas, y otros caracteres morfológicos de interés florícola fueron obtenidos en varias especies propagadas *in vitro* de *Begonia*, *Chrysanthemum* y *Anthurium*, entre otras (Khalid *et al.*, 1989; Jain, 1997; Winarto *et al.*, 2011). En numerosas gramíneas se observa variaciones en el ancho o longitud de hojas y entrenudos, o en acumulación de materia fresca y seca (Cai *et al.*, 1990; Maralappanavar *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2006; Baer *et al.*, 2007). También Miller *et al.*, (1992) y Duncan *et al.*, (1995) mencionan líneas de sorgo con comportamiento diferencial en suelos ácidos.

Cambios estrictamente fisiológicos se observan en arroz, donde el mejor comportamiento en condiciones de estrés salino estuvo relacionado con modificaciones en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , estabilidad de membranas y acumulación interna de  $\text{Na}^+$  (Lutts *et al.*, 1999). Bajo las mismas condiciones de estrés, se menciona mayor acumulación de prolina y azúcares solubles como mecanismos principales para contrarrestar efectos nocivos en somaclones de caña de azúcar (Gandonou *et al.*, 2006). Diferentes actividades enzimáticas y no enzimáticas, relacionadas con el estrés oxidativo, se observan en algunos somaclones de *Cynodon* spp. con tolerancia a estrés hídrico (Lu *et al.*, 2007; 2009). Similar a lo observado en buffelgrass, donde además, los somaclones demostraron mejor comportamiento a estrés salino (López Colomba *et al.*, 2013). Algunos de los tantos trabajos mencionados ilustran la amplia variabilidad observada y el potencial de uso que otorga la VS.

Por lo general, factores relacionados al entorno que se genera alrededor del cultivo *in vitro* se encuentran asociados a los mecanismos por los cuales ocurre VS. Diferentes trabajos sugieren que la frecuencia de variación depende de la especie o incluso del genotipo dentro de una misma especie (Rietveld *et al.*, 1993; Tremblay *et al.*, 1999). En frutilla y arroz, variaciones morfológicas, fisiológicas y alteraciones cromosómicas también estuvieron relacionadas con la edad del cultivo (Müller *et al.*, 1990; Nehra *et al.*, 1992). Plantas regeneradas a partir de explantos de hipocótilo exhiben mayor frecuencia de somaclones poliploides en comparación con plantas regeneradas de hojas y cotiledones (van den Bulk *et al.*, 1990). Estos autores, entre otros, sugieren que el origen del explanto predispone a la capacidad de obtener mayor o menor VS (Breiman y Rotem-Abarbanell,

1990). También deben incluirse como agentes de variación reguladores de crecimiento, constituyentes esenciales de un medio de cultivo (Clarindo *et al.*, 2008; Barow y Jovtchev, 2007). Larkin y Scowcroft (1981) sugieren que lo deseable es tratar de entender los diferentes procesos y factores involucrados en la VS, de manera tal que pueda ser utilizada cuando sea requerida o suprimida cuando el objetivo de la misma es la micropropagación.

Como se menciona en los párrafos anteriores, se observa una amplia gama de cambios o modificaciones en las plantas regeneradas *in vitro*, muchos de los cuales se encuentran asociados con alteraciones en el ADN nuclear. Entre ellos se mencionan somaclones aneuploides o poliploides, donde en el primero de los casos las plantas sufren ganancias o pérdidas de cromosomas; mientras que en los poliploides, las ganancias suelen ser de uno, dos o varios juegos completos de cromosomas (Leal *et al.*, 2006; Clarindo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2010; Currais *et al.*, 2013). Cambios estructurales, tales como translocaciones, deleciones, duplicaciones o inversiones, se suscitan en regiones específicas del cromosoma (Lapitan *et al.*, 1984; Creissen y Karp 1985; Kaeppler *et al.*, 1998). También se mencionan mutaciones puntuales, donde el simple hecho del cambio en una base es suficiente para alterar la síntesis proteica de la planta (Dennis *et al.*, 1987). La activación de elementos genéticos transponibles es otro de los fenómenos que se relaciona con VS (Lee y Phillips, 1988). Algunos de los cambios mencionados son tan bruscos que actúan como deletéreos en las plantas regeneradas *in vitro* (Creissen y Karp, 1985). No obstante, se ha sugerido que modificaciones de genes o pérdida de cromosomas se toleran más fácilmente en especies poliploides que en los diploides (Breiman y Rotem-Abarbanell, 1990). Karp (1986) sugiere que las especies poliploides, en comparación a sus congéneres diploides, al presentar dos o más juegos completos de cromosomas pueden soportar mejor la pérdida completa o parte de un cromosoma.

De lo antes expuesto, puede considerarse que el nivel de variación en los somaclones se manifiesta a distintos niveles (fenotipo, cromosomas, ADN nuclear, entre otros). Esto hace prever que para poder analizar la ocurrencia de VS y tratar de comprender algunas de sus causas, es necesario tener en cuenta todos estos factores. En este contexto, se plantea realizar estudios para identificar la VS mediante la implementación de diferentes

marcadores, categorizados como morfológicos, fisiológicos y moleculares o de análisis de ADN nuclear (Bairu *et al.*, 2011).

Otra alternativa que ofrece el cultivo de células o tejidos es la posibilidad de realizar una selección *in vitro*. La técnica utiliza el proceso de regeneración, donde se le incorpora al medio de cultivo compuestos que actúan como agentes selectivos, generando presión de selección (Tantau *et al.*, 2004; Gandonou *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007). El agente debe adecuarse y dirigirse a una característica específica y deseada por el mejorador (Lu *et al.*, 2009; López Colomba *et al.*, 2011). Por ejemplo, si el objetivo es seleccionar materiales tolerantes al estrés hídrico, se pueden utilizar diferentes compuestos que disminuyen el potencial osmótico del medio (Gulati y Jaiwal, 1993; Gangopadhyay *et al.*, 1997; Hemon y Sudarsono, 2010). Muchos de estos trabajos de selección se basan en VS (Jain, 2001), es decir, durante el proceso de regeneración *in vitro* pueden ocurrir cambios genéticamente estables en las plantas, los materiales que toleran y sobreviven el proceso de selección son analizados para determinar si expresan el carácter deseado en condiciones *ex vitro* (Remotti, 1998). El sistema tiene la ventaja de eliminar aquellos materiales que sufren cambios que actúan como deletéreos en las plantas regeneradas, además de permitir analizar una amplia población de células totipotentes en menor espacio y tiempo (Evans, 1989).

## **HIPÓTESIS**

.- El empleo de técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de anteras promueve la expresión de variabilidad genética seleccionable en caracteres asociados con tolerancia a estrés hídrico a partir de germoplasma introducido de buffelgrass.

## **OBJETIVO GENERAL**

.- Generar variabilidad genética, mediante cultivo *in vitro*, en caracteres asociados a tolerancia a sequía a partir de germoplasma introducido de buffelgrass, con la finalidad de incorporarla en un programa de mejoramiento genético de esta especie.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

.- Determinar el contenido de ADN nuclear y nivel de ploidía en genotipos apomícticos de buffelgrass.

.- Desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de plantas de buffelgrass y determinar el proceso morfogenético utilizando anteras como explanto.

.- Evaluar la estabilidad genética en plantas regeneradas *in vitro* a diferentes niveles: nuclear (contenido de ADN), citogenético, molecular y fenotípico.

.- Desarrollar un protocolo con manitol para la selección *in vitro* y evaluación de las progenies de plantas regeneradas en condiciones de estrés hídrico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ayerza R. 1981. Pasturas tropicales en el noroeste Argentino. *Rangelands* 3(4): 149-150.
- Baer G. Y., Yemets A. I., Stadnichuk N. A., Rakhmetov D. B., and Blume Y. B. 2007. Somaclonal variability as a source for creation of new varieties of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.). *Cytology and Genetics* 41(4): 204-208.
- Bairu M. W., Aremu A. O. and Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63(2): 147-173.
- Barow M. and Jovtchev G. 2007. Endopolyploidy in plants and its analysis by flow cytometry. In: Dolezel J., Greilhuber J., Suda J. (eds) *Flow cytometry with plant cells*. Wiley, Weinheim, pp 349-372.
- Bashaw E. C. 1962. Apomixis and Sexuality in Buffelgrass. *Crop Science* 21: 412-415.
- Bashaw E. C. 1980. Registration of Nueces and Llano Buffelgrass (Reg. Nos. 58 and 59). *Crop Science* 20: 112.
- Bhat V, Dalton SJ, Kumar S, Bhat BV, Gupta MG, Morris P. 2001. Particle-inflow-gun-mediated genetic transformation of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.): optimizing biological and physical parameters. *Journal of Applied Genetics* 42: 405-412
- Biderbost E., Perez H., Taleisnik E., Griffa S. M., Grunberg K., Luna C., Ribotta A., Tomás A., Berone G., Pisani M., Cuatrín A., Borrajo C., Andrés A., Prina A. y Díaz D. 2008. Avances en el mejoramiento genético de especies forrajeras megatérmicas. En *Planteos ganaderos en siembra directa*. Revista Técnica de la Asociación Argentina de Productores. Siembra Directa, pp 45-48.
- Binott J. J., Songa J. M., Ininda J., Njagi E. M. and Machuka J. 2008. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology* 7(8): 981-987.
- Birch R. G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Biology* 48(1): 297-326.
- Bishnoi U., Jain R. K., Rohilla J. S., Chowdhury V. K., Gupta K. R. and Chowdhury J. B. 2000. Anther culture of recalcitrant indica × Basmati rice hybrids. *Euphytica* 114(2): 93-101.
- Bonga J. M., Klimaszewska K. K. and Von Aderkas P. 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100(3): 241-254.
- Bray R. A. 1978. Evidence for facultative apomixis in *Cenchrus ciliaris*. *Euphytica* 27: 801-804.
- Breiman A. and Rotem-Abarbanell D. 1990. Somaclonal variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). In *Somaclonal Variation in Crop Improvement I*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 352-375.
- Cai T., Ejeta G., Axtell J. D. and Butler L. G. 1990. Somaclonal variation in high tannin sorghums. *Theoretical and Applied Genetics* 79(6): 737-747.
- Cardone S., Olmos S. y Echenique V. 2010. Variación somaclonal. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. y Mroginski L., (ed.). INTA, pp 229-242.
- Chemisquy M. A., Giussani L. M., Scataglini M. A., Kellogg E. A. and Morrone O. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and

- Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of Botany* 106(1): 107-130.
- Chen L. J., Zhu X. Y., Gu L. and Wu J. 2005. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem). *Plant Cell Reports* 24: 401-407.
- Chiossone G. 2006. Sistemas de producción ganaderos del noreste argentino; Situación actual propuestas tecnológicas para mejorar la productividad. X Seminario de Pastos y Forrajes, pp. 120-137.
- Cistué L., Ramos A. and Castillo A. M. 1999. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 159-166.
- Clarindo W. R., de Carvalho C. R., Araújo F. S., de Abreu I. S. and Otoni W. C. 2008. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 207-214.
- Colomba E., Grunberg K., Griffa S., Ribotta A., Mroginski L. and Biderbost E. 2006. The effect of genotype and culture medium on somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryos of fourteen apomictic cultivars of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Grass and Forage Science* 61: 2-8.
- Conti H., Cazenave G. y Giagnoni R. 2009. Características climáticas de las provincias de Santiago del Estero, Chaco y Formosa. En: Flora Chaqueña-Argentina (Santiago del Estero, Chaco y Formosa). Freire S. E. y Molina A. M. (ed.). INTA, pp. 9-26.
- Creissen G. P. and Karp A. 1985. Karyotypic changes in potato plants regenerated from protoplasts. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 4(2): 171-182.
- Currais L., Loureiro J., Santos C. and Canhoto J. M. 2013. Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114(2): 149-159.
- Dennis E. S., Brettell R. I. S. and Peacock W. J. 1987. A tissue culture induced *Adh1* null mutant of maize results from a single base change. *Molecular and General Genetics* 210(1): 181-183.
- Duncan R. R., Waskom R. M. and Nabors M. W. 1995. In vitro screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for soil stress tolerance. *Euphytica* 85: 373-380.
- Dunwell J. M. 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana Tabacum*. *Environmental and Experimental Botany* 16: 109-118.
- Elizalde A. J. C y Riffel S. L. 2014. Hacia una ganadería competitiva y sustentable. Una visión desde la cría y la recria como motor del sistema. Publicado en Internet, disponible en <http://www.elizalderiffel.com.ar/detalle.php?id=VmtkMFUyRnNRbEpRVkRBOStH&pag=publicaciones.php> Activo Julio de 2015.
- Evans D. A. 1989. Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics* 5: 46-50.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Publicado en Internet, disponible en <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/DATA/Pf000196.htm> Activo junio de 2015.

- Faure O., Aarouf J., Nougarede A. 1996. Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): proembryogenesis. *Ann. Bot.* 78: 23-28.
- Fisher W. D., Bashaw E. C. and Holt E. C. 1954. Evidence for apomixis in *Pennisetum ciliare* and *Cenchrus setigerus*. *Agronomy Journal* 46: 401-404.
- Gandonou C. B., Errabii T., Abrini J., Idaomar M. and Senhaji N. S. 2006. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. *Plant cell, tissue and organ culture* 87(1): 9-16.
- Gangopadhyay G., Basu S. and Gupta S. 1997. In vitro selection and physiological characterization of NaCl- and mannitol-adapted callus lines in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 161-169.
- Germanà M. A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104(3): 283-300.
- Giri C. C. and Praveena M. 2015. In vitro regeneration, somatic hybridization and genetic transformation studies: an appraisal on biotechnological interventions in grasses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120(3): 843-860.
- Griffa S. M. 2002. Caracterización de una estirpe sexual y cultivares apomíticos de "buffel grass" (*Cenchrus ciliaris* L.). Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC, Córdoba, Argentina 163 pp.
- Griffa S. M. 2010. "Caracterización bioquímica y molecular de germoplasma, evaluación de tolerancia a la salinidad y obtención de híbridos en Buffel grass". Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC, Córdoba, Argentina 137 pp.
- Griffa S., Díaz D., Ribotta A., Lanza Castelli S., Muñoz N., López Colomba E., Luna C., Grunberg K. and Biderbost E. 2006. Molecular genetic discrimination of Buffel grass genotypes and F1 hybrids for breeding purposes using amplified fragment length polymorphism analyses. *Grass and Forage Science* 61: 454-458.
- Griffa S., Ribotta A., López Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Luna C. and Grunberg K. 2010. Evaluation seedling biomass and its components as selection criteria for improving salt tolerance in Buffel grass genotypes. *Grass and Forage Science* 65: 358-361.
- Griffa S.; Ribotta A.; Luna C.; Bollati G.; López Colomba E.; Tommasino E.; Carloni E.; Quiroga M. y Grunberg K. 2011. Evaluación morfológica del cultivar de Buffelgrass "Lucero INTA PEMAN" en condiciones de sequía. *RIA*. 37 ,1. 86-91.
- Guevara J. C., Grunwaldt E. G., Estevez O. R., Bisigato A. J., Blanco L. J., Biurrun F. N., Ferrando C. A., Chirino C. C., Morici E., Fernandez B., Allegretti L. I. and Passera C. B. 2009. Range and livestock production in the Monte Desert, Argentina. *Journal of Arid Environments* 73: 228-237.
- Gulati A. and Jaiwal P. K. 1993. Selection and characterization of mannitol-tolerant callus lines of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 35-41.
- Hacker J. B. and Waite R. B. 2001. Selecting buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) with improved spring yield in subtropical Australia. *Tropical Grasslands* 35(4): 205-210.
- Han D. S., Niimi Y. and Kimura S. 2006. Localization of lily symptomless virus and cucumber mosaic virus in anther-and filament-derived calluses and effect of callus culture duration on virus-free bulblet production in *Lilium* × 'Enchantment'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87(2): 211-217.

- Hanna W. W. and Bashaw E. C. 1987. Apomixis: Its Identification and Use in Plant Breeding. *Crop Science* 27: 1136-1139.
- Hanselka C. W., Hussey M. A. and Ibarra F. 2004. Buffelgrass. En: Warm-season (C4) grasses. Moser L. E., Burson B. L. and Sollenberger L. E. (eds) Madison, Wisconsin, pp. 477-502.
- Hemon A.F. and Sudarsono. 2010. Evaluation of Somaclones Peanut Plants Regenerated from Repeat Cycles of In Vitro Selection Against Drought Stress. *Jurnal Agronomi Indonesia* 38(1): 36-42.
- Hussey M.A. and Burson B.L. 2005. Registration of 'Frio' Buffelgrass. *Crop Science* 45: 411-412.
- Jain S. M. 1997. Micropropagation of selected somaclones of *Begonia* and *Saintpaulia*. *Journal of Biosciences* 22(5): 585-592.
- Jain S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
- Jessup R. W., Burson B. L., Burrow G., Wang Y. W., Chang C., Li Z., Paterson A. H. and Hussey M. A. 2003. Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (*Pennisetum ciliare* (L) Link. Syn. *Cenchrus ciliaris* L.) as revealed by genome. *Genome*. 46: 304-313.
- Jin S., Mushke R., Zhu H., Tu L., Lin Z., Zhang Y. and Zhang X. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports* 27: 1303-1316.
- Kackar A. and Shekhawat N.S. 1991. Plant regeneration from culture immature inflorescences of *Cenchrus setigerus* and *Cenchrus ciliaris*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 29: 62-64.
- Kaeppler S. M., Phillips R. L. and Olhoft P. 1998. Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. In *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. (ed). Springer Netherlands, pp. 465-484.
- Kaeppler S. M., Kaeppler H. F and Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188.
- Karp A. 1986. Chromosome variation in plants regenerated from protoplasts and cultured plant tissues. In *Somaclonal Variations and Crop Improvement*. (ed) Springer Netherlands, pp. 28-34.
- Khalid N., Davey M. R., and Power J. B. 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potential commercial value. *Scientia Horticulturae* 38(3): 287-294.
- Koltunow A. M., Bicknell R. A. and Chaudhury A. M. 1995. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology*. 108:1345-52.
- Kruczkowska H., Pawłowska H. and Skucińska B. 2002. Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *Journal of Applied Genetics*. 43: 287-296.
- Kumar S. and Bhat V. 2012. High-frequency direct plant regeneration via multiple shoot induction in the apomictic forage grass *Cenchrus ciliaris* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48: 241-248.
- Kumar S., Sahu N. and Singh A. 2015. High-frequency in vitro plant regeneration via callus induction in a rare sexual plant of *Cenchrus ciliaris* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 51(1): 28-34.



- Labrani Z., Buyser J and Picard E. 2007. Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. 'Jennah Khetifa'. *Plant Breeding* 126: 565-568.
- Lapitan N. L. V., Sears R. G. and Gill B. S. 1984. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* 68(6): 547-554.
- Larkin P. J. and Scowcroft W. R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197-214.
- Larkin P. J., and Scowcroft W. R. 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2(2): 111-121.
- Leal M. R., Maribona R. H., Ruiz A., Korneva S., Canales E., Dinkova T. D and Rizo D. 1996. Somaclonal variation as a source of resistance to eyespot disease of sugarcane. *Plant Breeding* 115(1): 37-42.
- Leal F., Loureiro J., Rodriguez E., Pais M. S., Santos C. and Pinto-Carnide O. 2006. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Reports* 25: 978-985.
- Lee M. and Phillips R. L. 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39(1): 413-437.
- Litz R. E. and Gray D. J. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(4): 416-425.
- López Colomba E., Prina A., Griffa S., Ribotta A. N., Carloni E., Tommasino E., Luna C., Biderbost E. and Grunberg K. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and in vitro selection. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 80: 59-64.
- López Colomba E., Tommasino E., Luna C., Griffa S., Carloni E., Ribotta A., Quiroga M. and Grunberg K. 2013. Differential salt-stress response during germination and vegetative growth in in vitro selected somaclonal mutants of *Cenchrus ciliaris* L. *South African Journal of Botany* 87: 157-163.
- López-Pérez A. J., Carreño J., Martínez-Cutillas A. and Dabauza M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis* 44: 79-85.
- Lorenzini H., R. Balmaceda y Echeverría M. 1995. *Geografía de la Argentina*. Ed. A-Z Editora. Buenos Aires Argentina.
- Lovelace D. A., Holt E. C., Ellis W. C. and Bashaw E. C. 1972. Nutritive value estimates in apomictic lines of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Agronomy Journal* 64(4): 453-456.
- Lu S., Wang Z., Peng X., Guo Z., Zhang G. and Han L. 2006. An efficient callus suspension culture system for triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *C. dactylon*) and somaclonal variations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87(1): 77-84.
- Lu S., Peng X., Guo Z., Zhang G., Wang Z., Wang C., Pang C., Fan Z and Wang, J. 2007. In vitro selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant cell reports* 26(8): 1413-1420.

- Lu S., Chen C., Wang Z., Guo Z. and Li H. 2009. Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *Cynodon dactylon*) to drought stress. *Plant cell reports* 28(3): 517-526.
- Lutts S., Bouharmont J. and Kinet J. M. 1999. Physiological characterisation of salt-resistant rice (*Oryza sativa*) somaclones. *Australian Journal of Botany* 47(6): 835-849.
- Maralappanavar M. S., Kuruvinashetti M. S. and Harti C. C. 2000. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Euphytica* 115(3): 173-180.
- Mauro M. C., Nef C. and Fallot J. 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Reports* 5(5): 377-380.
- Miles J. W. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Science*. 47: 238-249.
- Miller D. R., Waskom R. R., Timm D. A., Nabors M. W., Duncan R. R., Chapman P. L., Brick M. A. and Hanning G. E. 1992. Acid soil stress tolerance in tissue culture-derived sorghum lines. *Crop science* 32(2): 324-327.
- Minson D. J. and Hacker J. B. 1995. Production by sheep grazing six *Cenchrus ciliaris* accessions. *Tropical Grasslands* 29: 34-34.
- Müller E., Brown P. T. H., Hartke S. and Lörz, H. 1990. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. *Theoretical and Applied Genetics* 80(5): 673-679.
- Murty U.R., Bharathi M., Visadara M. and Annapurna A. 1992. Embryogenic callus formation and plant regeneration in *Cenchrus ciliaris* (L). *Cereal Research. Communications* 20: 7-12.
- Neelakandan A. K. and Wang K. 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports* 31(4): 597-620.
- Nehra N. S., Kartha K. K., Stushnott C. and Giles K. L. 1992. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29(3): 257-268.
- Niimi Y., Dong-Sheng H. and Makoto F. 2001. Production of virus-free plantlets by anther culture of *Lilium* × 'Enchantment'. *Science Horticulture* 90: 325-334.
- Observatorio Ganadero. 2013. Caracterización regional: Noroeste argentino. Observatorio de la Cadena de la Carne Bovina de Argentina, informe N°3. Buenos Aires, Argentina. 14 pág. Publicado en Internet, disponible en <http://observatoriobovino.org.ar/pdf/ObservatorioGanadero-InformeN3.pdf> Activo Junio 2015.
- Ozias-Akins P. 2006. Apomixis: developmental characteristics and genetics. *Critical Reviews Plant Sciences* 25: 199-214.
- Ozias-Akins P. and van Dijk P. J. 2007. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants. *Annual Review of Genetics* 41:509-37.
- Parra-Vega V., Renau-Morata B., Sifres A. and Seguí-Simarro J. M. 2012. Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 112: 353-360.
- Pemán R. 2000. Buffel, aliado de los criadores para subir la carga en el árido. En: *Revista de la Sociedad Rural de Jesús María* 117: 1-7.

- Pengelly B. C., Hacker J. B., and Eagles D. A. 1992. The classification of a collection of buffel grasses and related. *Tropical Grasslands* 26: 1-6.
- Peréz H. 2005. "Características de las especies forrajeras adaptadas a las condiciones del noroeste del país. En: "Potenciando el desarrollo ganadero sustentable del subtrópico argentino". Producciones Gráficas S.A. Capital Federal, Argentina, pp. 33-41.
- Perrin M., Gertz C., Masson J. E. 2004. High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science* 167: 1343-1349.
- Pessino S. C. y Ortiz J. P. 2010. Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. y Mroginski L., (ed.). INTA, pp. 403-420.
- Prado M. J., Rodríguez E., Rey L., González M. V., Santos C. and Rey M. 2010. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 49-59.
- Qi Y., Ye Y. and Bao M. 2013. Establishment of plant regeneration system from anther culture of *Tagetes patula*. *African Journal of Biotechnology* 10(75): 17332-17338.
- Quiroga M., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Carloni E., Tommasino E., Luna C. and Griffa S. 2013. Obtaining sexual genotypes for breeding in buffel grass. *South African Journal of Botany* 88: 118-123.
- Ramírez R. G., Foroughbackhch R., Hauad L., Alba-Avila J., García-Castillo C. G. and Espinosa-Vázquez M. 2001. Seasonal Variation of in situ Digestibility of Dry Matter, Crude Protein and Cell Wall of Total Plant Leaves and Stems of Nueces Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Journal of Applied Animal Research* 20(1): 73-82.
- Rearte D. 2007. Situación de la ganadería argentina en el contexto mundial. Publicado en Internet, disponible en <http://www.inta.gov.ar/balcarce/carnes/SituacGanad2007.pdf>. Activo Diciembre 2008.
- Remotti P. C. 1998. Somaclonal variation and in-vitro selection for crop improvement. In *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Jain S. M, Brar D. S. and Ahloowali B. S. Dordrecht, The Netherlands. pp 169-201.
- Rietveld R. C., Hasegawa P. M. and Bressan R. A. 1991. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. *Theoretical and Applied Genetics* 82(4): 430-440.
- Rietveld R. C., Bressan R. A. and Hasegawa P. M. 1993. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. II. Differential effect of genotype. *Theoretical and applied genetics*. 87(3): 305-313.
- Ross A. H., Manners J.M. and Birch R.G. 1995. Embryogenic callus production, plant regeneration and transient gene expression following particle bombardment in the pasture grass, *Cenchrus ciliaris* (Gramineae). *Australian Journal of Botany*. 43: 193-199.
- Ruauad J. N. 1993. Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7-56-day-old *Picea abies*. *Plant Science*, 92(2), 213-220.
- Samson N. P., Campa C., Le Gal L., Noirot M., Thomas G., Lokeswari T. S. and De Kochko A. 2006. Effect of primary culture medium composition on high frequency

- somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86(1): 37-45.
- Shahin E. A. and Spivey R. 1986. A single dominant gene for Fusarium wilt resistance in protoplast-derived tomato plants. *Theoretical and Applied Genetics* 73(2): 164-169.
- Sherwood R. T., Young B. A. and Bashaw E. C. 1980. Facultative Apomixis in Buffelgrass. *Crop Science* 20: 375-379.
- Silva C. M. M. D. S., de Oliveira M. C. and Severino G. 1987. Avaliação da produtividade de treze cultivares de capim buffel, na região semi-árida de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 22(5): 513-520.
- Snyder L. A., Hernandez A. R. and Warmnke H. E. 1955. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. *Botanical Gazette* 116: 209-221.
- Takahata Y., Brown D. C. W. and Keller W. A. 1991. Effect of donor plant age and infloescense age on microspore culture of *Brassica napus* L. *Euphytica* 58: 51-55.
- Tantau H., Balko C., Brettschneider B., Melz G., Dörffling K. 2004. Improved frost tolerance and winter survival in winter barley (*Hordeum vulgare* L.) by in vitro selection of proline overaccumulating lines. *Euphytica* 139: 19-32.
- Taylor R. J., Secor G. A., Ruby C. L. and Orr P. H. 1993. Tuber yield, soft rot resistance, bruising resistance and processing quality in a population of potato (cv. Crystal) somaclones. *American Potato Journal* 70(2) 117-130.
- Tessi N. P., Avila J. M., Edith R., Armando R. H. y Ferrando C. A. 2014. Buffel grass Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. (ed) INTA, Chamental, La Rioja, pp 1-20.
- Thieme R. and Griess H. 2005. Somaclonal variation in tuber traits of potato. *Potato Research* 48(3-4): 153-165.
- Tomes D. T. and Smith O. S. 1985. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 70(5): 505-509.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Carloni E., Quiroga M. and Luna C. M. 2012. Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. *Grass and Forage Science* 67: 456-459.
- Tremblay L., Lévasseur C. and Tremblay F. M. 1999. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany* 86(10): 1373-1381.
- van den Bulk R. W., Löffler H. J. M., Lindhout W. H. and Koornneef M. 1990. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theoretical and Applied Genetics* 80(6): 817-825.
- Vasil I. K. 2005. The story of transgenic cereals: the challenge, the debate, and the solution—a historical perspective. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41(5): 577-583.
- Vasil I. K. 2008. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27(9): 1423-1440.
- Wan Y. and Lemaux P. G. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104(1): 37-48.
- Weeks J. T., Anderson O. D. and Blechl, A. E. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology* 102(4): 1077-1084.

- Winarto B., Rachmawati F., Pramanik D., Teixeira da Silva J. A. 2011. Morphological and cytological diversity of regenerants derived from half-anther cultures of anthurium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 363-374.
- Yadav C.B., Jhap P., Mahlakshmi C., V. Anjaiah and Bhat V. 2009. Somatic embryogenesis and regeneration of *Cenchrus ciliaris* genotypes from immature inflorescence explants. *Biologia Plantarum* 53(4): 603-609.
- Yan C. Q., Qian K. X., Yan Q. S., Zhang X. Q., Xue G. P., Huangfu W. G. and Wu P. 2004. Use of asymmetric somatic hybridization for transfer of the bacterial blight resistance trait from *Oryza meyeriana* L. to *O. sativa* L. ssp. japonica. *Plant Cell Reports* 22(8): 569-575.

## CAPÍTULO 2

### CONTENIDO DE ADN NUCLEAR Y NIVEL DE PLOIDÍA EN GENOTIPOS APOMÍCTICOS DE BUFFELGRASS

#### INTRODUCCIÓN

Buffelgrass [*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.] es una gramínea distribuida naturalmente en áreas subtropicales y semiáridas de África e India (Hanselka *et al.*, 2004). Debido a su tolerancia a sequía, combinada con su aptitud forrajera, ha sido introducida en programas de mejoramiento genético en muchas regiones subtropicales del mundo, incluida Argentina. La especie se reproduce principalmente por apomixis (Fisher *et al.*, 1954; Snyder *et al.*, 1955), razón por la cual, muchos cultivares son fruto de la selección de ecotipos naturales de su lugar de origen (FAO, 2011). Sin embargo, el hallazgo de una fuente de sexualidad (Bashaw, 1962) y la utilización de herramientas biotecnológicas (López Colomba *et al.*, 2011; 2013), han permitido articular diferentes estrategias en los programas de mejoramiento.

En nuestro país, una colección activa a campo de buffelgrass se encuentra en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Esta colección cuenta con cuatro genotipos provenientes de Australia, once provenientes de colecciones nacionales y una de origen desconocido (Tabla 2.1). Al presente, estos recursos genéticos de buffelgrass han sido base para el desarrollo de nuevos materiales con mayor tolerancia a estrés hídrico, salino y/o con mejor productividad de materia seca (Griffa *et al.*, 2006; 2011; López Colomba *et al.*, 2011; 2013; Quiroga *et al.*, 2013). Además, la elaboración e implementación de un conjunto de descriptores morfológicos, bioquímicos y moleculares han permitido demostrar diferencias entre los materiales de la colección, principalmente en caracteres agronómicos de interés (Griffa, 2002; 2010; Tommasino *et al.*, 2012; López Colomba *et al.*, 2013).

Tabla 2.1. Genotipos apomícticos de buffelgrass que constituyen la colección activa a campo sita en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV).

Nº de Registro	Procedencia	Año	Registro en origen
NR 49	Australia	1989	-
NR 50	Australia	1989	-
NR 51	Australia	1989	-
NR 52	Australia	1989	-
NR 62	INTA - Chamical, La Rioja, Argentina	-	11
NR 63	INTA - Chamical, La Rioja, Argentina	-	6
NR 64	INTA - Chamical, La Rioja, Argentina	-	16
NR 66	INTA - Chamical, La Rioja, Argentina	-	5
NR 136	INTA - Deán Funes, Córdoba,	-	33
NR 145	INTA - Deán Funes, Córdoba,	-	35
NR 148	INTA - Deán Funes, Córdoba,	-	70
NR 153	-	-	-
NR 157	INTA - Deán Funes, Córdoba,	-	31
NR 67	INTA - Deán Funes, Córdoba,	-	-
NR 147	INTA - Leales, Tucumán, Argentina	2010	-
NR 158	INTA - Córdoba, Argentina	2010	-

Nº de registro: Actual número de identificación del germoplasma en la colección activa del IFRGV. Registro en origen: Número de registro con el cual ingresaron a la colección activa del IFRGV. (-) Sin datos

Buffelgrass pertenece a un complejo agámico, poliploide, con el número básico de cromosomas  $x = 9$ , mencionándose en la especie citotipos tetraploides ( $2n = 4x = 36$ ), pentaploides ( $2n = 5x = 45$ ), hexaploides ( $2n = 6x = 54$ ) y septaploides ( $2n = 7x = 63$ ) (Fisher *et al.*, 1954; Snyder *et al.*, 1955; Hignight *et al.*, 1991; Chemisquy *et al.*, 2010; Burson *et al.*, 2012). Si bien la mayor cantidad de individuos se caracterizan por ser euploides, existen individuos aneuploides con diferentes números de cromosomas ( $2n = 32, 40, 43, 48$ ) que no coinciden con un múltiplo exacto del número básico (Fisher *et al.*, 1954; Snyder *et al.*, 1955; Burson *et al.*, 2012). La amplia diversidad genómica y citológica existente en la especie hace prever que individuos con diferentes ploidías podrían ser parte de la colección de buffelgrass. En este contexto, previo a establecer una estrategia de mejoramiento, surge la necesidad de conocer el nivel de ploidía de los diferentes materiales introducidos.

En la actualidad, numerosos trabajos han demostrado la utilidad de la citometría de flujo (CMF) en estudios taxonómicos (Lysák y Doležěl, 1998; Marie y Brown, 1993). La técnica permite cuantificar el contenido de ADN nuclear de una planta (valor 2C) y, a partir de ello inferir el nivel de ploidía (Greilhuber *et al.*, 2005; Doležěl *et al.*, 2007). Una de las principales ventajas de la CMF, con respecto al método tradicional del conteo de cromosomas en metafase, es que no necesita células en división del material vegetal (Doležěl *et al.*, 2007). Además, los protocolos utilizados para el aislamiento de los núcleos vegetales son sencillos y rápidos, lo que permite el análisis de numerosas muestras por día (Otto, 1990; Loureiro *et al.*, 2006; Doležěl y Bartos, 2005). La interpretación de los resultados, en términos de ploidía, se realiza a partir del estudio del contenido de ADN nuclear (valor 2C) obtenido del análisis conjunto de la muestra incógnita con un estándar de referencia (Galbraith *et al.*, 2002). Cuando el nivel de ploidía es inferido sólo mediante CMF, los resultados deben distinguirse de los estudios cariológicos, para lo cual se utiliza el prefijo “ADN” antes de ploidía (Suda *et al.*, 2006).

En buffelgrass la implementación de la técnica de CMF ha permitido la identificación de seis grupos diferentes de ploidía, cuatro correspondientes a citotipos euploides y dos a citotipos aneuploides (Burson *et al.*, 2012; Kharrat-Souissi *et al.*, 2012). En el caso particular de los individuos aneuploides, Burson *et al.*, (2012) establecieron un rango de 3,43 a 3,78 pg de ADN nuclear para individuos con 37 y 44 cromosomas, respectivamente. Sin embargo, análisis llevados a cabo por Kharrat-Souissi *et al.* (2012), permitieron observar que individuos pentaploides ( $2n = 5x = 45$ ) presentaban similares valores 2C (3,63 - 3,74 pg). Por lo tanto, surge la necesidad de determinar el contenido de ADN nuclear de la colección activa de buffelgrass y correlacionar estos valores con el número de cromosomas de cada individuo.

Los objetivos del presente capítulo fueron: determinar el contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidía en genotipos apomícticos de buffelgrass.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los genotipos apomícticos provienen de una colección activa a campo de buffelgrass sita en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba – Argentina (Tabla 2.1).

### Análisis de citometría de flujo

Los análisis de CMF se realizaron a partir de hojas frescas provenientes de la colección activa de buffelgrass. Las muestras se procesaron utilizando el protocolo de Doležel *et al.*, (2007) con pequeñas modificaciones. Segmentos de hojas de 4 - 6 cm<sup>2</sup> de buffelgrass y del estándar de referencia [*Zea mays* CE-777 (2C = 5,43 pg ADN)] (Lysák y Doležel 1998) fueron picados en forma conjunta en 1 ml de solución tampón Otto I (0,1 M ácido cítrico monohidratado, 0,5% Tween 20) (Otto 1990). Luego de filtrar las muestras por una malla de 30 µm, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min y el sobrenadante fue eliminado teniendo la precaución de dejar 100 µl en cada tubo de 1,5 ml. Las muestras se resuspendieron en 100 µl de solución tampón Otto I con agitación suave y se incubaron en cámara fría (4°C) durante 24h. Posteriormente, se agregó 1 ml de solución tampón Otto II (0.4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O), 50 µg/ml de yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 µg/ml de ARNasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El IP y la ARNasa se utilizaron para marcar el ADN nuclear y evitar fluorescencia del ARN de doble cadena, respectivamente. Las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, para luego ser corridas en un CMF BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San Jose, California, USA).

Los histogramas de intensidad de fluorescencia relativa (FL) fueron evaluados con el programa Flowing Software ver. 2.5.1. (Perttu Terho), descargado de la siguiente página: <http://www.flowingsoftware.com/index.php?page=31>. Los núcleos obtenidos en

los histogramas de FL en la fase lineal fueron encerrados en una región y ambos picos  $G_0/G_1$  del estándar y de la muestra, fueron evaluados.

Para cada genotipo se realizaron como mínimo 6 repeticiones, obtenidas en tres días diferentes (dos repeticiones por individuo por día). Esta metodología es recomendada (Doležel y Bartos, 2005) y se realiza para evitar posibles diferencias en los análisis efectuados en diferentes días (Loureiro *et al.*, 2006). El contenido de ADN nuclear relativo de las plantas se expresó mediante un índice de fluorescencia (ID) teniendo en cuenta al estándar de referencia ( $ID = 2C_{\text{buffelgrass}} / 2C_{Z. mays}$ ).

El tamaño del genoma de cada individuo en pg (2C, revisado por Greilhuber *et al.*, 2005) fue estimado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido 2C de buffelgrass (pg)} = \frac{\text{posición media del pico } G_0/G_1 \text{ de buffelgrass}}{\text{posición media del pico } G_0/G_1 \text{ de } Z. mays \text{ L.}} \times 5.43$$

donde 5,43 es el contenido de ADN nuclear en pg de *Zea mays* CE-777 (Lysák y Doležel, 1998).

### **Análisis citogenético**

El recuento de cromosomas mitóticos fue realizado en células aplastadas (*squash*) del tejido meristemático radical, adaptando el protocolo descrito por Negritto *et al.*, (2008). Las raíces fueron colectadas de semillas germinadas en caja de Petri, ubicadas en cámara de germinación. Las condiciones de cultivo fueron 27°C y 25°C de temperatura, con un fotoperíodo de 16h luz y 8h oscuridad, respectivamente. La luz de la cámara se enciende a las 06:00 p.m. Con dichas condiciones en la cámara de germinación, es posible encontrar células mitóticas colectando raíces entre las 10:30 y 11:00 p.m. Para inhibir la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico, las raíces fueron tratadas con 8-

hidroxiquinolina (2 mM) durante 3h a temperatura ambiente y 3h a 4°C. Luego de este período, se descartó el inhibidor de los microtúbulos y el material vegetal fue sumergido en fijador [1: 3 - ácido acético glacial: alcohol etílico absoluto (v/v)] durante 48h como mínimo. Previo al *squash*, las raíces fueron tratadas con una solución de pectinasa – celulasa al 2% de acuerdo a Schwarzacher *et al.*, (1980). Los ápices radicales se extrajeron con agujas histológicas bajo la lente de una lupa y se colocaron en un portaobjeto. El *squash* fue realizado con una gota de ácido acético al 60% y el cubre-objeto se removió luego de congelar el preparado con aire líquido. Los preparados se secaron en estufa durante 72h. Finalmente, el material vegetal fue teñido con una solución de GIESMA al 2% (Guerra y Souza, 2002) y se montó con Entellan. Los cromosomas se observaron y fotografiaron con una lente 60 x 1.5 en un microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti).

### **Análisis estadístico**

Un análisis de regresión lineal simple se llevó a cabo para estudiar la relación entre el número de cromosomas con el contenido de ADN nuclear en buffelgrass. Para ello, el número de cromosomas de cada individuo se tomó como variable dependiente mientras que el contenido de ADN nuclear (pg) como variable regresora.

El análisis se realizó utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

## **RESULTADOS**

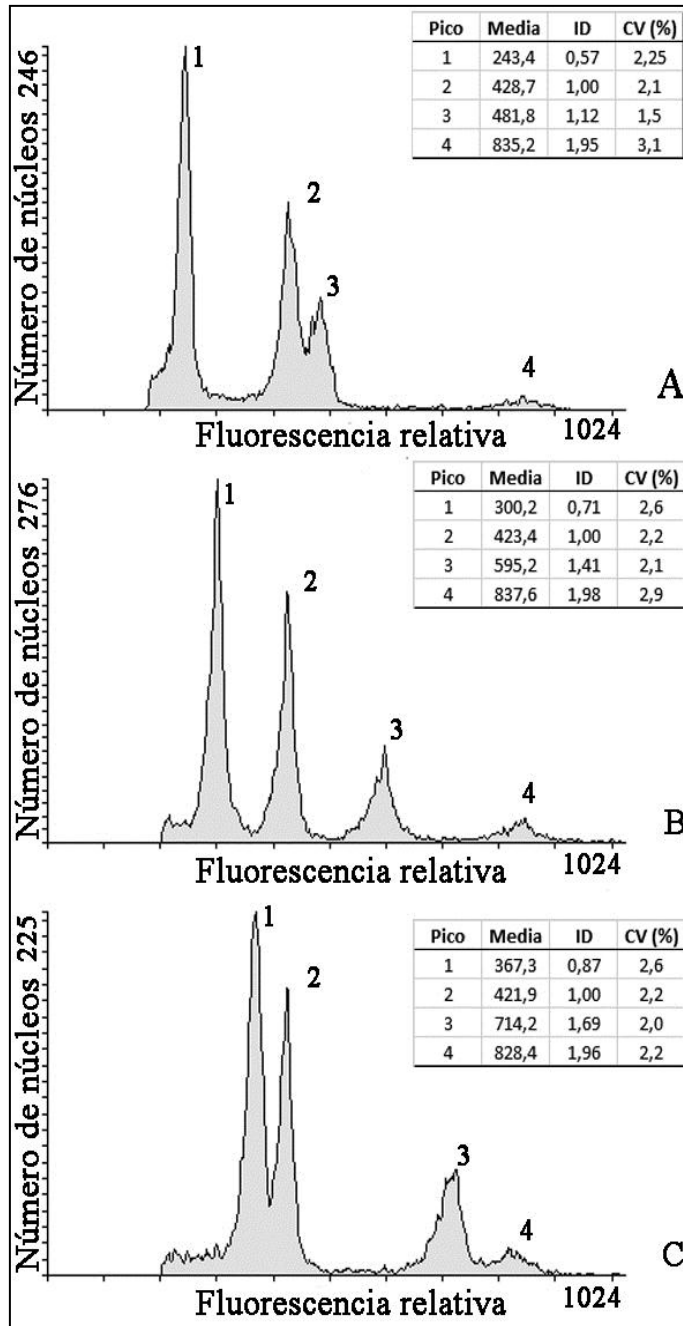
### **Análisis de citometría de flujo**

En la Fig. 2.1 se observan los histogramas de intensidad de fluorescencia relativa (FL) de tres materiales de buffelgrass analizados en conjunto con *Z. mays* L. como estándar de referencia. Los análisis de las muestras vegetales mostraron cuatro picos, dos

representando el contenido relativo de ADN nuclear de buffelgrass y los otros dos del maíz. Los picos dominantes corresponden a los núcleos en la fase  $G_0/G_1$  (contenido de ADN nuclear, 2C), mientras que los picos menores corresponden a los núcleos en la fase  $G_2$  del ciclo celular (contenido de ADN nuclear, 4C). La ausencia de solapamiento de los picos generados indica que el estándar interno fue adecuado.

Por lo general, el coeficiente de variación (CV) de los picos generados en la fase  $G_0/G_1$  fueron menores al 3%. En maíz, la media del CV fue de  $2,26 \pm 0,42$  ( $n = 143$ ) y en sólo cuatro mediciones (2,8% del total) los coeficientes de variaciones (CVs) presentaron valores entre 3 y 4%. En buffelgrass, teniendo en cuenta todas las mediciones de los diferentes genotipos ( $n = 143$ ), la media de los valores del CV fue de  $2,72 \pm 0,58$ . El 76% de las mediciones presentaron valores de CVs  $\leq 3\%$  y el 26% mostraron CVs entre 3 y 4%. Cuando se analizó la media en cada una de los genotipos por separado, en solo dos genotipos las estimaciones del CV fueron del 3,04% (NR 153) y 3,13% (NR 62) (Tabla 2.2).

El valor medio estimado de ID ( $2C_{\text{buffelgrass}}/2C_{\text{Z. mays}}$ ) fue variable, con valores que oscilaron entre 0,559 (NR 148) a 0,862 (NR 158). Con estos índices se calculó el contenido de ADN nuclear (valor 2C) para cada una de los genotipos (Tabla 2.2).



**Fig. 2.1.** Histogramas de intensidad de fluorescencia relativa obtenidos tras el análisis simultáneo de núcleos aislados de hojas de buffelgrass y *Zea mays* CE-777 ( $2C = 5,43$  pg ADN) como estándar de referencia. (A) NR 64, (B) NR 136 y (C) NR 158. Los picos 1 y 2 corresponden a los núcleos en la fase  $G_0/G_1$  de buffelgrass (1) y *Zea mays* (2). Picos 3 y 4 corresponden a los núcleos en la fase  $G_2$  de buffelgrass (3) y de *Zea mays* (4).

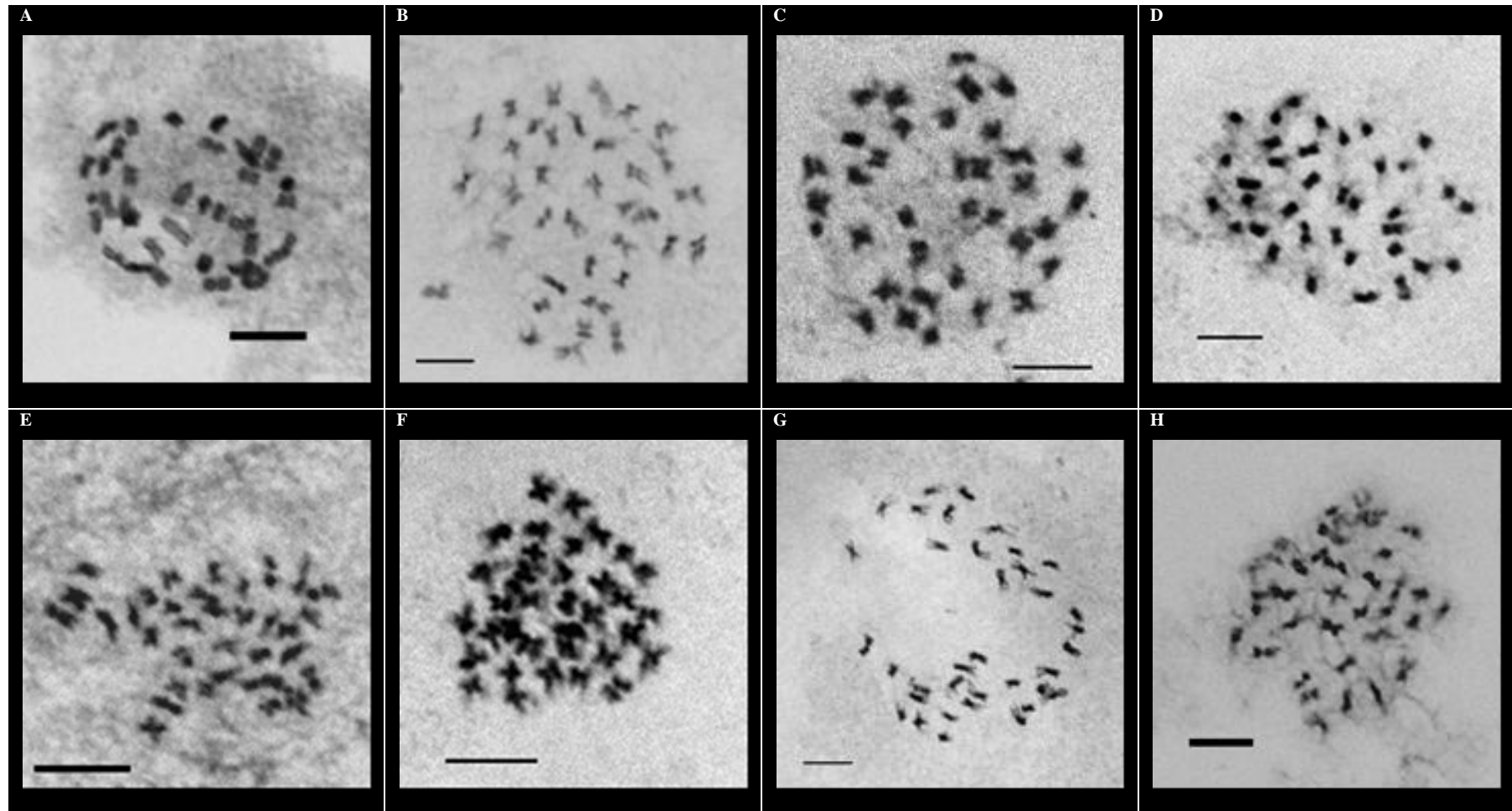
Tabla 2.2. Índice de fluorescencia (ID), contenido de ADN nuclear (valor 2C) y coeficiente de variación (CV) determinado por citometría de flujo en 16 genotipos apomíticos de buffelgrass.

Genotipo	n	ID $\pm$ D.E	2C (pg) $\pm$ D.E <sup>a</sup>	CV (%) $\pm$ D.E <sup>b</sup>
NR 148	6	0,559 $\pm$ 0,006	3,04 $\pm$ 0,03	2,51 $\pm$ 0,58
NR 64	8	0,564 $\pm$ 0,005	3,06 $\pm$ 0,03	2,71 $\pm$ 0,12
NR 157	8	0,564 $\pm$ 0,005	3,06 $\pm$ 0,03	2,97 $\pm$ 0,25
NR 153	8	0,564 $\pm$ 0,006	3,07 $\pm$ 0,03	3,04 $\pm$ 0,37
NR 66	8	0,567 $\pm$ 0,004	3,08 $\pm$ 0,02	2,85 $\pm$ 0,22
NR 63	7	0,571 $\pm$ 0,006	3,10 $\pm$ 0,03	2,88 $\pm$ 0,31
NR 52	8	0,572 $\pm$ 0,011	3,10 $\pm$ 0,06	2,84 $\pm$ 0,65
NR 62	8	0,580 $\pm$ 0,004	3,15 $\pm$ 0,02	3,13 $\pm$ 0,42
NR 67	8	0,583 $\pm$ 0,006	3,16 $\pm$ 0,03	2,94 $\pm$ 0,32
NR 49	8	0,584 $\pm$ 0,005	3,17 $\pm$ 0,02	2,91 $\pm$ 0,35
NR 50	8	0,705 $\pm$ 0,004	3,83 $\pm$ 0,02	2,66 $\pm$ 0,39
NR 136	6	0,707 $\pm$ 0,004	3,84 $\pm$ 0,02	2,74 $\pm$ 0,34
NR 147	11	0,708 $\pm$ 0,007	3,84 $\pm$ 0,04	2,32 $\pm$ 0,46
NR 51	11	0,711 $\pm$ 0,004	3,86 $\pm$ 0,02	1,72 $\pm$ 0,77
NR 145	6	0,726 $\pm$ 0,003	3,94 $\pm$ 0,02	2,64 $\pm$ 0,38
NR 158	6	0,862 $\pm$ 0,011	4,68 $\pm$ 0,06	2,89 $\pm$ 0,53

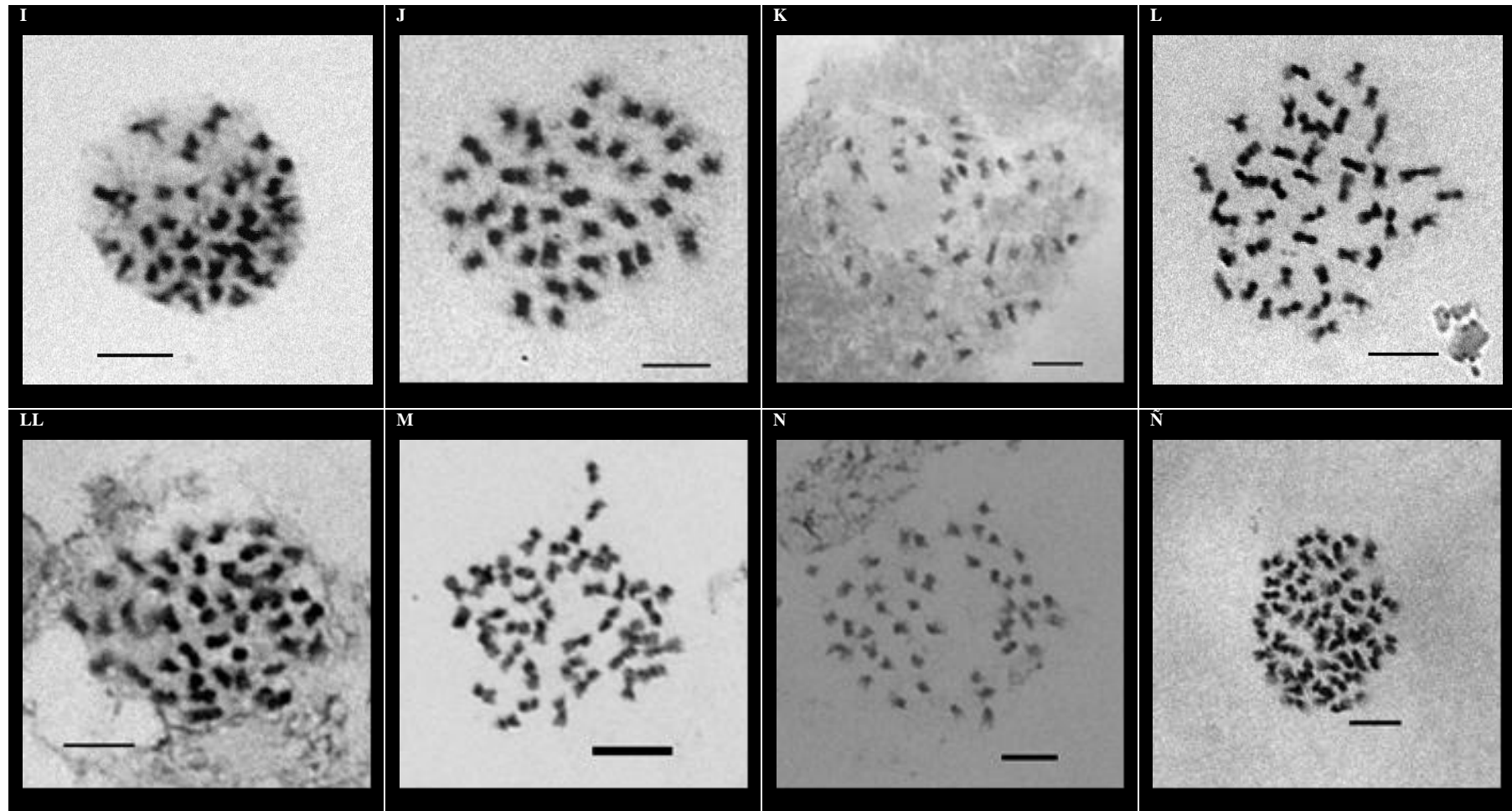
a. El valor 2C es el promedio del número de veces que se analizó la muestra (n), expresado en picogramos (pg). Los valores fueron obtenidos por el análisis conjunto de núcleos aislados de buffelgrass y *Zea mays* CE-777 (2C = 5.43 pg ADN) como estándar de referencia. b. Media del coeficiente de variación y el desvío estándar (CV  $\pm$  D.E) de la intensidad de fluorescencia de los núcleos en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de buffelgrass. D.E = Desviación estándar.

### Análisis citogenético

El número de cromosomas determinado en los genotipos apomíticos de buffelgrass se puede observar en las figuras 2.2 y 2.3. Todos los genotipos fueron poliploides, 10 de ellos tetraploides ( $2n = 4x = 36$ ) y seis aneuploides ( $2n = 43, 44$  y  $52$  cromosomas) (Fig. 2.2 y Fig. 2.3). Estos resultados confirman que los diferentes valores 2C determinados por CMF corresponden a individuos con distintas ploídías. Los 10 materiales que presentaron valores 2C comprendidos en un rango entre 3,04 a 3,17 pg fueron considerados citotipos tetraploides. Los cuatro materiales aneuploides con 43 cromosomas tuvieron valores que oscilan entre 3,83 a 3,86 pg, mientras que los individuos aneuploides con 44 y 52 cromosomas tienen valores 2C de 3,94 y 4,68 pg, respectivamente.



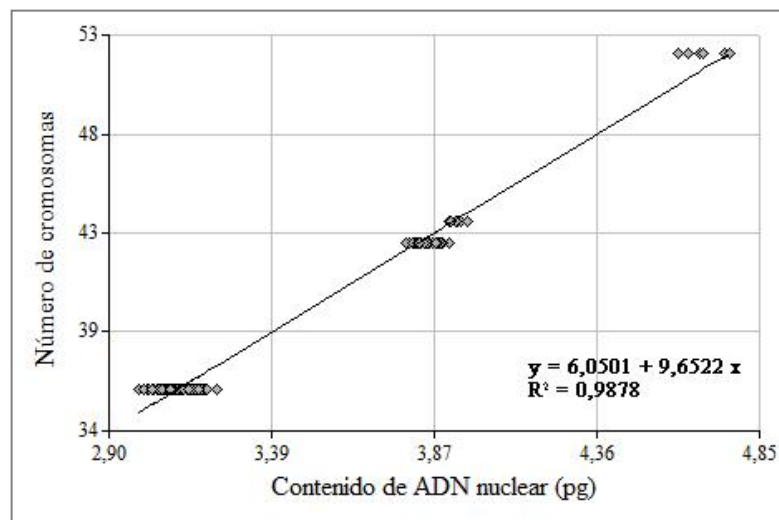
**Fig. 2.2.** Microfotografías de cromosomas somáticos de genotipos apomícticos de buffelgrass con  $2n = 36$  (A) NR 148, (B) NR 64, (C) NR 157, (D) NR 153, (E) NR 66, (F) NR 63, (G) NR 52 y (H) NR 62. Barra =  $5\mu\text{m}$ .



**Fig. 2.3.** (Continuación) Microfotografías de cromosomas somáticos de genotipos apomícticos de buffelgrass con  $2n = 36$  [(I) NR 67 y (J) NR 49],  $2n = 43$  [(K) NR 50, (L) NR 136, (LL) NR 147 y (M) NR 51]  $2n = 44$  [(N) NR 145] y  $2n = 52$  [(Ñ) NR 158] cromosomas. Barra =  $5\mu\text{m}$ .



El diagrama de dispersión indica que hay relación positiva entre el número de cromosomas observado en cada individuo y las estimaciones en el contenido de ADN nuclear (Fig. 2.4). Además, el análisis de regresión lineal reportó que hay correlación lineal entre el número de cromosomas (variable dependiente) y el contenido de ADN nuclear (variable regresora) ( $P < 0,0001$ ) con un  $R^2 = 0,9878$ . En base a ello y tomando la información sobre los coeficientes de regresión se puede escribir la siguiente ecuación del modelo:  $y = 6,0501 + 9,6522 x$ .



**Fig. 2.4.** Diagrama de dispersión que demuestra el análisis de regresión lineal entre el número de cromosomas y las estimaciones en el contenido de ADN nuclear en cada genotipo de buffelgrass. La ecuación del modelo ( $y = a + b x$ ) y el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) se observan en el gráfico.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los materiales apomícticos que se encuentran en la colección activa de buffelgrass presentan diferentes niveles de ploidía. La constitución genética de dicha colección perteneciente al IFRGV está representada por individuos tetraploides ( $2n = 4x = 36$ ) y aneuploides ( $2n = 43, 44$  y  $52$ ), siendo éstos citotipos ya mencionados en la especie (Fisher *et al.*, 1954, Hignight *et al.*, 1991; Burson *et al.*, 2012; Kharrat-Souissi *et al.*, 2012). Los citotipos con  $2n = 4x = 36$

son los más frecuentes y el número de cromosomas coincide con el más común observado en buffelgrass (Fisher *et al.*, 1954; Hignight *et al.*, 1991). Estudios citológicos y moleculares demostraron que los citotipos con 36 cromosomas son alotetraploides segmentales (Fisher *et al.*, 1954, Snyder *et al.*, 1955, Jessup *et al.*, 2003). Los citotipos aneuploides con 43, 44 y 52 cromosomas podrían originarse por la fertilización de un genotipo sexual con polen desequilibrado o por la hibridación de un gameto no reducido (híbridos B<sub>III</sub>, 2n + n) (Bashaw y Hignight 1990; Hignight *et al.*, 1991; Burson *et al.*, 2002; Burson *et al.*, 2012). Estos eventos, sea cual fuere su origen, podrían incrementar el nivel de ploidía de la especie en el hábitat nativo (Hignight *et al.*, 1991; Burson *et al.*, 2012), mantenido por el tipo de reproducción que se observa en buffelgrass (Hanna y Bashaw, 1987).

El rango en el contenido de ADN nuclear de los individuos tetraploides (3,04 - 3,18 pg) coincide con los valores mencionados en trabajos previos (Burson *et al.*, 2012; Kharrat-Souissi *et al.*, 2012). Sin embargo, los valores 2C obtenidos en individuos con 2n = 43, 44 y 52 cromosomas difieren de sus congéneres aneuploides de otras colecciones internacionales. Al respecto, Burson *et al.*, (2012) determinaron el contenido de ADN nuclear de 568 materiales y realizaron el recuento cromosómico en 39 de ellos, observando que los materiales con 37 a 44 cromosomas poseen valores que se encuentran en un rango de 3,43 a 3,78 pg. En este trabajo, los valores 2C fueron superiores y oscilaron entre 3,83 a 3,94 pg en los individuos con 43 y 44 cromosomas, respectivamente. También se pudo observar valores superiores en el individuo con 52 cromosomas (4,68 pg), a diferencia del trabajo realizado por Burson *et al.*, (2012), en el que sugieren que los materiales con 2n = 52 se encuentran en un rango de ADN nuclear que oscila entre 4,11 a 4,37 pg (Tabla 2.2). Cabe señalar que en el presente trabajo el contenido de ADN nuclear de cada individuo fue confirmado con el análisis citológico.

Es posible que las pequeñas diferencias en los valores obtenidos mediante el empleo de la CMF se deban a las diferentes metodologías aplicadas entre los laboratorios (Dolezěl *et al.*, 1998). Al respecto, cuando se determina el contenido de ADN nuclear se realiza una estandarización interna con un material vegetal (estándar) de genoma conocido

(Doležěl y Bartos, 2005). Por lo general, se recomienda que el pico generado por el estándar se ubique tan cerca como sea posible del pico de la planta incógnita (Johnston *et al.*, 1999). De no ser posible y para evitar eventuales errores de linealidad (Doležěl *et al.*, 2007), se debe elegir un estándar cuyo genoma no difiera más del doble de tamaño respecto a la muestra de estudio. Burson *et al.*, (2012) utilizaron buffel común (T-4464) como estándar interno y cuantificaron el contenido de ADN nuclear mediante ioduro de propidio (IP), determinando un contenido de ADN en buffel común de 3,08 pg (Burson *et al.*, 2002). En este trabajo en cambio, se utilizó como estándar interno al maíz (*Zea mays* CE-777) (Lysák y Doležěl 1998), cedido gentilmente por el laboratorio donde trabaja el Dr. Jaroslav Dolezel. El contenido de ADN nuclear del maíz es de 5,43 pg, cumpliendo con el requisito sugerido para evitar posibles errores de linealidad.

Otro parámetro diferente en la metodología aplicada con otros laboratorios es el fluorocromo empleado para estimar el contenido de ADN nuclear. Burson *et al.*, (2012) utilizaron DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y a los valores obtenidos les incorporaron un factor de corrección, que surge del análisis conjunto del estándar interno (buffel común) con *Sorghum bicolor* (L.) Moench línea ATx623, ambos marcados con IP. En este caso, se empleó directamente IP como marcador de ácido nucleico. La diferencia entre ambos es que el DAPI se une preferentemente a regiones del ADN ricas en adenina – timina (Manzini *et al.*, 1983), mientras que el IP es un agente intercalante en la doble cadena de ADN, recomendado en la medición de ADN nuclear (Doležěl *et al.*, 1998).

La solución tampón de aislamiento de núcleos es otro de los parámetros que podría causar alguna divergencia entre laboratorios (Loureiro *et al.*, 2006). Burson *et al.*, (2012) utilizaron una solución de tinte comercial provista por Partec (Münster, Germany), mientras que en este caso, la liberación de los núcleos se produjo con el tampón Otto (Otto, 1990). En el trabajo de Loureiro *et al.*, (2006) el estudio se realizó con cuatro diferentes tampones y siete especies vegetales, observando que no existía un tampón universal. Asimismo, los parámetros de calidad obtenidos con tampón Otto como universal fueron muy buenos. Al respecto, los núcleos tenían buena intensidad de fluorescencia y los coeficientes de variación (CV), uno de los parámetros más importantes, fueron bajos.

El CV en los histogramas de fluorescencia es una medida de integridad nuclear y de variación en el teñido de ADN nuclear (Doležěl y Bartos, 2005). Dicho parámetro es utilizado para evaluar la calidad de la metodología aplicada y debería ser presentado en cada publicación (Loureiro *et al.*, 2007). Por lo general, se consideran como aceptables histogramas con CV por debajo al 3% (Marie y Brown, 1993), mientras que en algunas especies leñosas, son considerados aceptables  $\leq$  al 5% (Galbraith *et al.*, 2002). En los materiales de este trabajo la mayoría de los análisis (76%) presentaron valores de CV menores o iguales al 3%. Solo una pequeña proporción (24%) superaron estos valores y nunca fueron mayores al 3,8%. Además y para evitar posibles diferencias observadas en los CV obtenidos en los distintos días de picado (Loureiro *et al.*, 2006), se realizaron como mínimo seis mediciones independientes (dos corridas por día) como recomiendan algunos autores (Doležěl y Bartos 2005). Con esta metodología, en ningún material aneuploide la media del CV superó el 3% (Tabla 2.2).

Como se discute anteriormente, en este trabajo se ejecutaron varias recomendaciones metodológicas que pretenden reflejar estimaciones exactas y precisas en el contenido de ADN nuclear. En base a ello, se considera que la metodología de trabajo aplicada en el laboratorio del IFRGV-INTA fue adecuada. Además, se cree que, si las diferencias se deben a alguna variable metodológica en particular (estándar de referencia, tampón, fluorocromo o CV), es difícil identificar a una de ellas como único factor.

Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan datos de referencia importantes en el contenido de ADN nuclear de buffelgrass y generan una plataforma para futuros trabajos de CMF. La implementación de la ecuación del modelo ( $y = 6,0501 + 9,6522 x$ ) podría ser usada con fines predictivos (estimar el valor de ADN ploidía para un valor 2C en pg) en nuevos materiales de buffelgrass. Además, aunque la simplicidad de la técnica de CMF es atractiva, es importante realizar un estudio citológico para la evaluación completa de los resultados. Al respecto, si los valores 2C obtenidos en nuestra colección se hubiesen comparado solo con los valores proporcionados por otros laboratorios, la interpretación de los resultados podría haber sido errónea.

## CONCLUSIONES

Se identificó la presencia de individuos con diferentes niveles de ploidia en la colección activa de buffelgrass.

La constitución genética de la colección activa de buffelgrass está representada por individuos tetraploides ( $2n = 4x = 36$ ) y aneuploides ( $2n = 43, 44$  y  $52$ ).

Se determinó una relación lineal y positiva entre el número de cromosomas y las estimaciones del contenido de ADN nuclear.

Se obtuvo una ecuación modelo que podría utilizarse para estimar el valor de ADN ploidía en buffelgrass: “ $y = 6,0501 + 9,6522 x$ ”

## BIBLIOGRAFÍA

- Bashaw E. C. 1962. Apomixis and Sexuality in Buffelgrass. *Crop Science* 21: 412-415.
- Bashaw E. C. and Hignight K. W. 1990. Gene Transfer in Apomictic Buffelgrass through Fertilization of an Unreduced Egg. *Crop Science* 30: 571-575.
- Burson B. L., Hussey M. A., Actkinson J. M. and Shafer G. S. 2002. Effect of pollination time on the frequency of  $2n+n$  fertilization in apomictic buffelgrass. *Crop Science* 42: 1075-1080.
- Burson B. L., Actkinson J. M., Hussey M. A. and Jessup R. W. 2012. Ploidy determination of buffel grass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. *South African Journal of Botany* 79: 91-95.
- Chemisquy M. A., Giussani L. M., Scataglini M. A., Kellogg E. A. and Morrone O. 2010. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of Botany* 106 (1): 107-130.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W. 2012. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A., Nardi L. and Obermayer R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*. 82: 17-26.
- Doležel J. and Bartoš J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99-110.
- Doležel J., Greilhuber J. and Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233-2244.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Publicado en Internet, disponible en <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/DATA/Pf000196.htm> Activo junio de 2015.
- Fisher W. D., Bashaw E. C. and Holt E. C. 1954. Evidence of apomixis in *Pennisetum ciliare* and *Cenchrus setigerus*. *Agronomy Journal* 46: 401-404.
- Galbraith D. W., Lambert G. M., Macas J. and Doležel J. 2002. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: *Current protocols in cytometry*. Robinson J. P., Darzynkiewicz Z., Dean P. N., Dressler L. G., Rabinovitch P. S., Stewart C.V., Tanke H.J., Wheelless L.L. (eds). New York: John Wiley & Sons, 7.6.1-7.6.22.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A. and Bennet M. D. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size", and "C-value" to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95: 255-260.
- Griffa S. M. 2002. Caracterización de una estirpe sexual y cultivares apomícticos de "buffel grass" (*Cenchrus ciliaris* L.). Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC, Córdoba, Argentina 163 pp.
- Griffa S., Díaz D., Ribotta A., Lanza Castelli S., Muñoz N., López Colomba E., Luna C., Grunberg K. and Biderbost E. 2006. Molecular genetic discrimination of Buffel grass genotypes and F1 hybrids for breeding purposes using amplified fragment length polymorphism analyses. *Grass and Forage Science* 61: 454-458.

- Griffa S. M. 2010. "Caracterización bioquímica y molecular de germoplasma, evaluación de tolerancia a la salinidad y obtención de híbridos en Buffel grass". Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC, Córdoba, Argentina 137 pp.
- Griffa S.; Ribotta A.; Luna C.; Bollati G.; López Colomba E.; Tommasino E.; Carloni E.; Quiroga M. y Grunberg K. 2011. Evaluación morfológica del cultivar de Buffelgrass "Lucero INTA PEMA" en condiciones de sequía. RIA. 37 ,1. 86-91.
- Guerra M. and de Souza M. J. 2002. "Como observar cromosomas: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana." Ribeirão Preto: FUNPEC.
- Hanna W. W. and Bashaw E. C. 1987. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Science* 27, 1136–1139.
- Hanselka C. W., Hussey M. A. and Ibarra F. 2004. Buffelgrass. En: Warm-season (C4) grasses. Moser L. E., Burson B. L. and Sollenberger L. E. (eds) Madison, Wisconsin, pp. 477-502.
- Hignight K. W., Bashaw E. C. and Hussey M. A. 1991. Cytological and morphological diversity of native apomictic buffelgrass. *Botanical Gazette* 152: 214-218.
- Jessup R. W., Burson B. L., Burow O., Wang Y. W., Chang C., Li Z., Paterson A. H. and Hussey M. A. 2003. Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.) as revealed by genome mapping. *Genome* 46: 304-313.
- Johnston J. S., Bennett M. D., Rayburn A. L., Galbraith D. W. and Price H. J. 1999. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany* 86: 609-613.
- Kharrat-Souissi A., Siljak-Yakovlev S., Brown S. C. and Chaieb M. 2012. Cytogeography of *Cenchrus ciliaris* (Poaceae) in Tunisia. *Folia Geobotanica* 48: 95-113.
- López Colomba E., Prina A., Griffa S., Ribotta A. N., Carloni E., Tommasino E., Luna C., Biderbost E. and Grunberg K. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and in vitro selection. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 80: 59-64.
- López Colomba E., Tommasino E., Luna C., Griffa S., Carloni E., Ribotta A., Quiroga M. and Grunberg K. 2013. Differential salt-stress response during germination and vegetative growth in in vitro selected somaclonal mutants of *Cenchrus ciliaris* L. *South African Journal of Botany* 87: 157-163.
- Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J. and Santos C. 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry *Annals of Botany* 98: 679-689.
- Loureiro J., Suda J., Doležel J. and Santos C. 2007. Flower: A plant DNA Flow Cytometry Database. En: Dolezel J., Greilhuber J. and Suda J. (eds) *Flow cytometry with plant cells*. Wiley. Weinheim. pp 423-454.
- Lysák M. A. and Doležel J. 1998. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poacea). *Caryologia* 52: 123-132.
- Manzini G., Barcellona M. L., Avitabile M. and Quadrifoglio F. 1983. Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Research* 11: 8861-8876.
- Marie D. and Brown S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* 78: 41-51.
- Negritto M. A., Romanutti A. A., Cristina Acosta M., Moscone E. A., Cocucci A. E. and Anton A. M. 2008. Morphology, reproduction and karyology in the rare Andean *Poa gymnantha*. *Taxon* 57: 171-178.

- Otto F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Methods in cell biology. Crissman H. A. and Darzynkiewicz Z. (eds). Academic Press Inc. New York, pp. 105-110.
- Quiroga M., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Carloni E., Tommasino E., Luna C. and Griffa S. 2013. Obtaining sexual genotypes for breeding in buffel grass. South African Journal of Botany 88: 118-123.
- Schwarzacher T., Ambros P. and Schweizer D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. Plant Systematics and Evolution 134: 293-297.
- Snyder L. A., Hernandez A. R. and Warmke H. E. 1955. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. Botanical Gazette 116: 209-221.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P. and Krahulec F. 2006. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. Taxon 447-450.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Carloni E., Quiroga M. and Luna C. M. 2012. Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. Grass and Forage Science 67: 456-459.



## CAPÍTULO 3

### EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DEL CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE GENOTIPOS APOMÍCTICOS DE BUFFELGRASS

#### INTRODUCCIÓN

Buffelgrass [*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.] es una gramínea forrajera estival, perenne, tolerante a sequía, adaptada a zonas áridas y semiáridas del mundo (Hanselka *et al.*, 2004). Se reproduce principalmente por apomixis y el mecanismo es aposporia seguida por pseudogamia (Fisher *et al.*, 1954; Snyder *et al.*, 1955; Jessup *et al.*, 2003). La progenie de una planta con este tipo de reproducción es idéntica al progenitor femenino, lo que otorga la posibilidad de seleccionar individuos y propagarlos como clones (Hanna y Bashaw, 1987). Sin embargo, diseñar un programa de mejora convencional frente a una especie con este tipo de reproducción es dificultoso. La aparición de técnicas biotecnológicas provee nuevas herramientas de gran utilidad en el mejoramiento vegetal. Una de ellas es el cultivo *in vitro* de tejidos, el cual podría ser potencialmente útil como fuente de transformación (Bhat *et al.*, 2001) o por la promoción de variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981).

En buffelgrass varios trabajos han demostrado el establecimiento del cultivo *in vitro* utilizando diferentes tipos de explantos, tales como inflorescencias (Kackar y Shekhawat, 1991; Murty *et al.*, 1992), semillas (Ross *et al.*, 1995; Bhat *et al.*, 2001), embriones maduros (Colomba *et al.*, 2006) y brotes apicales (Yadav *et al.*, 2009; Kumar y Bhat, 2012). Por lo general, la embriogénesis somática es el proceso morfogénico más frecuente (Ross *et al.*, 1995; Bhat *et al.*, 2001; Colomba *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2009), aunque recientemente se menciona la regeneración de plantas mediante la inducción de brotes múltiples (Kumar y Bhat, 2012; Kumar *et al.*, 2015). En cuanto a la respuesta embriogénica, se observa que algunos cultivares permanecen recalcitrantes y que tanto la inducción de callos embriogénicos como la regeneración de plántulas dependen en gran medida del genotipo o del explanto (Colomba *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2009). Como los

efectos del genotipo son ineludibles, la utilización de diferentes explantos a los mencionados, podría ser una estrategia para mejorar la eficiencia de regeneración o permitir el establecimiento de aquellos genotipos que no mostraron respuesta al cultivo *in vitro*.

Una alternativa disponible para generar embriogénesis somática y posterior regeneración de plántulas es la utilización de anteras como explanto. Si bien, el cultivo *in vitro* de anteras suele ser utilizado en la obtención de plantas doblehaploides (Salas *et al.*, 2011; Parra-Vega *et al.*, 2012), en varios cultivos ornamentales (Niimi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Winarto *et al.*, 2011) y frutivinícolas (Faure *et al.*, 1996; Perrin *et al.*, 2004; López-Pérez *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2006) ha sido empleado eficientemente para obtener plantas de origen somático. Habitualmente, diferentes pre-tratamientos de estrés por frío o manitol, entre otros, son realizados a las anteras para promover la competencia embriogénica (Cistué *et al.*, 1999; Kruczkowska *et al.*, 2002; Labbani *et al.*, 2007; Parra-Vega *et al.*, 2012). En buffelgrass la utilización de anteras para la regeneración de plantas no registra antecedentes.

Los objetivos del presente capítulo fueron: desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de plantas en buffelgrass y determinar el proceso morfogénico utilizando anteras como explanto.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Las plantas dadoras de anteras provinieron de tres genotipos apomícticos (NR 51, NR 147 y NR 158) de la colección activa de buffelgrass asentada en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba – Argentina (Capítulo 2). En la búsqueda de explorar la respuesta al cultivo *in vitro* de anteras, se escogieron estos tres materiales ya que uno de ellos (NR

51) presenta buenos antecedentes en su respuesta embriogénica y regeneración de plantas utilizando embriones somáticos como explanto (Colomba *et al.*, 2006), además de ser unos de los materiales genéticos más difundidos en el NOA (Tessi *et al.*, 2014). En cuanto a los materiales NR 147 y NR 158, fueron escogidos ya que se desconoce su respuesta al cultivo *in vitro*.

### **Cultivo de anteras**

La colecta del material vegetal se realizó temprano por la mañana y en tres fechas diferentes: 28 de enero, 15 de febrero y 2 de marzo de 2010. Se utilizaron anteras con micrósporas en estado uninucleado (Fig. 3.1a), obtenidas de macollas con espigas embuchadas, cuando la distancia entre la lígula de la hoja bandera y la lígula de la penúltima hoja se encontraba entre 1 y 3 cm (Fig. 3.1b). En laboratorio, se descartaron las hojas y se desinfectaron las espigas sumergiéndolas en etanol 70% (v/v) por 1 min, luego en hipoclorito de sodio comercial al 10% (55 g/l) con 3 gotas de Tween 20 y 5 gotas de ácido clorhídrico 1N (HCl) durante 15 min (100 ml de solución v/v). Finalmente, se realizaron 5 enjuagues con agua destilada bajo cámara de flujo laminar. Las anteras se diseccionaron por la base del filamento (Fig. 3.1c) y se cultivaron en medio de inducción (MI), el cual consistió de medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962), 3% de sacarosa (p/v) y 6 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El medio se ajustó a pH 5,8 y se agregó agar (7 g/l) previo al autoclavado (20 min a 116°C). En cada fecha de colecta se cultivaron 30 anteras (10 flores) por caja de Petri (35 mm) con seis repeticiones. Las 3 anteras procedentes de cada flor central (antecio fértil) se mantuvieron en grupo considerándolo un explanto (Fig. 3.1c).

Los explantos cultivados en el mismo día de colecta fueron considerados como grupo control. Por otro lado y para favorecer la respuesta embriogénica, se realizaron pre-tratamientos: macollas colectadas el mismo día que el grupo control se colocaron en frascos de vidrio con los tallos sumergidos en a) agua destilada durante 5 y 7 días (H<sub>2</sub>O5d y H<sub>2</sub>O7d, respectivamente), b) en 0,3 M de manitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 5 y 7 días (0,3M5d y 0,3M7d, respectivamente) en oscuridad a 4°C. Finalizados

los pre-tratamientos, las espigas se desinfectaron y las anteras se cultivaron como se describe anteriormente. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , se repicaron a los 45 días y se mantuvieron en medio de inducción (MI) durante un período de 90 días.

### **Regeneración de plantas**

Para promover la germinación de los embriones somáticos obtenidos, a los 90 días de iniciado el cultivo de anteras (ICA) los callos fueron individualmente transferidos a tubos de vidrio con medio de regeneración (MR) (MS + 0,5 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) + 1 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP) + 3% de sacarosa). Los mismos se repicaron cada 60 días y se mantuvieron sobre el mismo medio durante 10 meses. Para favorecer el enraizamiento de las plántulas, las mismas se trasladaron individualmente a tubos de vidrio con medio MS, 1,5% de sacarosa y 0,5 mg/l de ANA (medio de enraizamiento). En los medios de regeneración y de enraizamiento se ajustó el pH a 5,8, se agregó agar (7 g/l) para obtener un medio sólido y se autoclavaron durante 20 min a  $116^{\circ}\text{C}$ . Los tubos se colocaron en condiciones controladas de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y fotoperíodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Las plántulas enraizadas se transfirieron a vasos plásticos (50 ml) conteniendo tierra: vermiculita (1:1) y se rusticaron en invernadero (período de aclimatación) en un ambiente saturado de humedad. Luego se trasplantaron a macetas plásticas de 1 kg de capacidad y se llevaron al campo, donde florecieron.

### **Preparaciones histológicas**

La formación de embriones somáticos en callos se corroboró mediante cortes histológicos. Callos de 15 o 20 días de ICA se fijaron en una mezcla de etanol: agua: formol: ácido acético glacial (FAA, 5: 3,5: 1: 0,5) por 48h. Posteriormente se conservaron en etanol 70% (v/v). Las muestras se deshidrataron en una serie de diluciones de etanol (70%, 96%, 100% v/v) y los callos fueron incluidos en parafina utilizando técnicas de rutina (D'Ambrogio de Argüeso 1986). Los cortes ( $10\mu\text{m}$ ) obtenidos con un micrótopo rotativo (Accu-Cut® modelo SRM 200 CW) se colorearon con Safranina - Verde Rápido

(D'Ambrogio de Argüeso 1986) y fueron observados bajo la lente de un microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti).

### **Análisis estadístico.**

El número de callos embriogénicos por caja de Petri se determinó a los 90 días de ICA y se calculó la proporción en relación al número de explantos sembrados (10 explantos). El número de plántulas se registró durante todo el período de regeneración (10 meses) y se expresó como número de plantas regeneradas por caja de Petri.

Para evaluar la eficiencia de inducción y de regeneración en función a la proporción de callos embriogénicos y de plantas regeneradas se ajustaron dos modelos estadísticos denominados modelos lineales generalizados (MLGs), considerando a los genotipos como variable de clasificación. Para la variable proporción de callos embriogénicos (PCE) se utilizó una distribución binomial con función de enlace logit, mientras que para la variable número de plántulas regeneradas (NPR) se utilizó una distribución Poisson con una función de enlace log. En ambos casos se compararon las medias entre genotipos con la prueba LSD *a posteriori*.

Con la finalidad de determinar cuál fue la mejor fecha de recolección de macollas y el mejor tratamiento (control o pre-tratamientos) para cada genotipo se ajustaron los mismos MLG, tanto para la PCE como para el NPR, en los cuales se incorporaron como variables de clasificación el tratamiento, la fecha de recolección de macollas y la interacción entre ambos factores. En ambos análisis, se evaluaron las diferencias para los factores principales y sus interacciones de acuerdo a las comparaciones de medias por el test DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002).

Todos los análisis mencionados anteriormente se realizaron utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

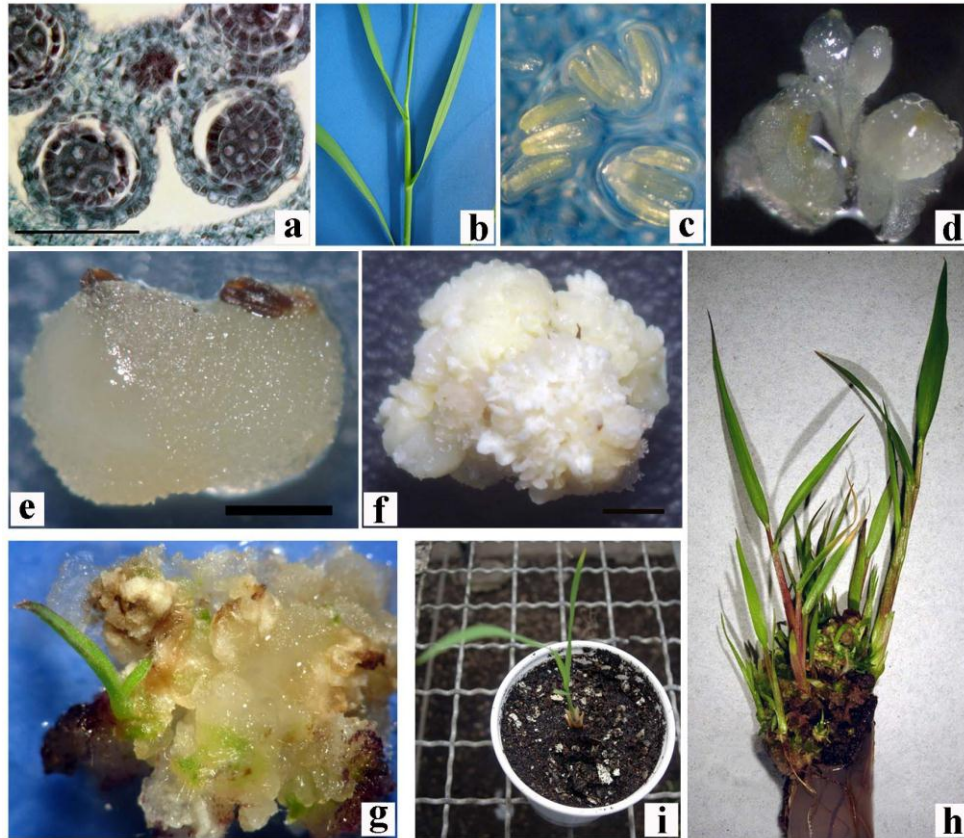
## RESULTADOS

Los tres genotipos apomícticos de buffelgrass utilizados en este trabajo tuvieron la capacidad de regenerar callos en medio MS suplementado con 2,4-D. La formación de los callos comenzó aproximadamente a los 7 días de ICA y se visualizó como una expansión de los tejidos del explanto (Fig. 3.1d). A partir de los 15 días de ICA se comenzó a visualizar pro-embriones y luego de los 30 días, se diferenciaron claramente dos tipos de callos: no embriogénicos y embriogénicos. Los callos no embriogénicos exhibieron una apariencia friable, de color translucido blanquecino (Fig. 3.1e), mientras que los callos embriogénicos mostraron una apariencia compacta, de color blanco, con simples o múltiples ondulaciones (embriones somáticos) (Fig. 3.1f).

La germinación de los callos embriogénicos se evidenció cuando los mismos fueron colocados en el medio de regeneración, en presencia de luz. Al comienzo, los embriones somáticos se tornaron verdes y luego de 20 días aparecieron los primeros brotes (Fig. 3.1g). A las cuatro semanas se observaron plántulas bien desarrolladas. Los repiques realizados a los 60 días estimularon la formación de nuevas plántulas. Si bien este comportamiento se mantuvo aproximadamente hasta los 10 meses del cultivo *in vitro*, la regeneración decayó a medida que aumentó el tiempo transcurrido en condiciones *in vitro*. El número de plántulas regeneradas fue variable, ya que a partir de un callo embriogénico se pudieron regenerar entre 1 y 55 plántulas (Fig. 3.1h). Cada plántula regenerada se trasplantó a una maceta y se rusticó en invernadero (Fig. 3.1i).

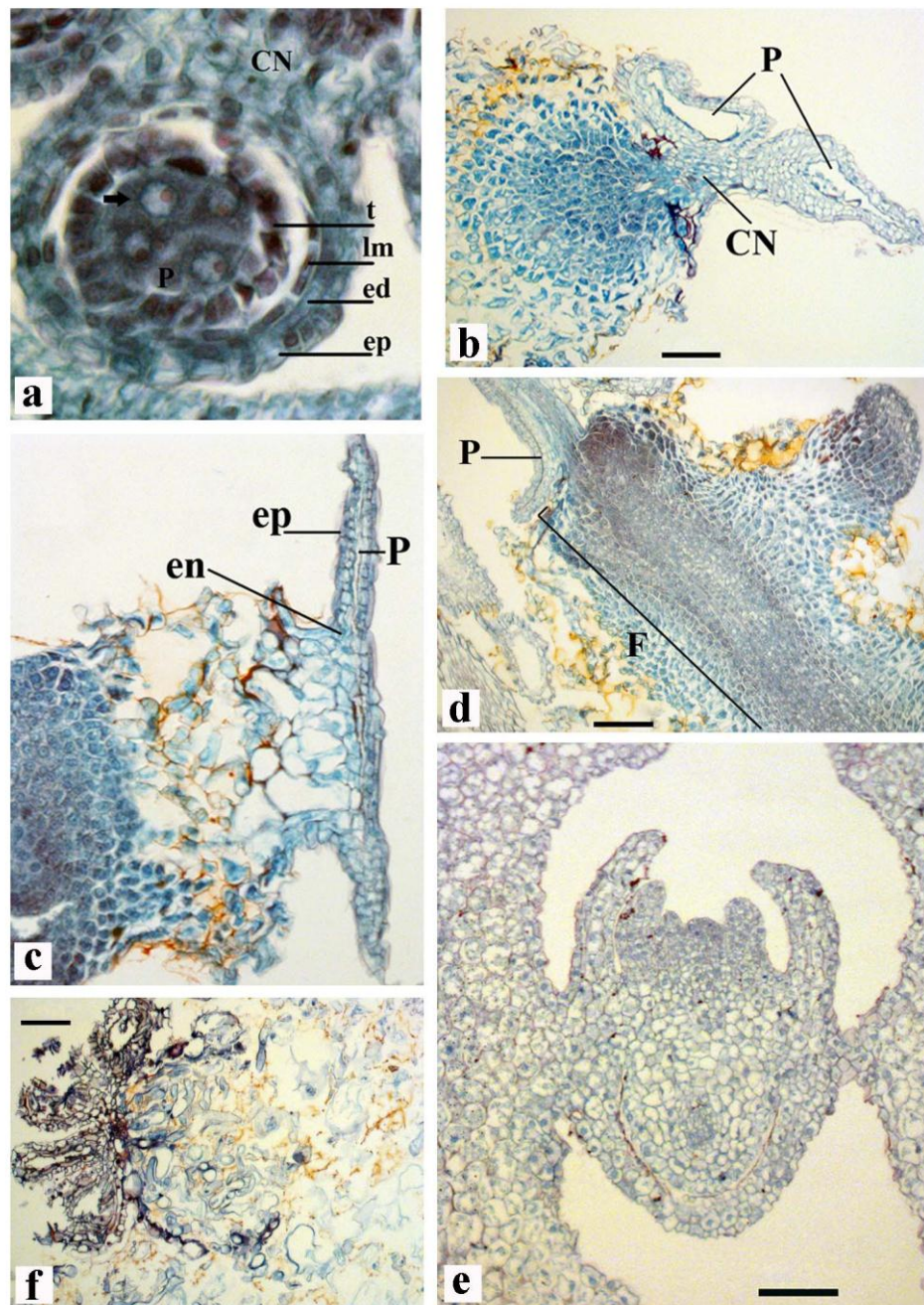
La regeneración de plántulas se produjo sólo de callos embriogénicos. El estudio histológico confirmó que las plántulas se originaron a partir de embriones somáticos y que el proceso morfogénico se indujo formando embriones a partir del tejido somático de los estambres (Fig. 3.2a). Al respecto, los cortes histológicos mostraron áreas con crecimiento celular en el tejido conectivo (Fig. 3.2b), pared (Fig. 3.2c) y filamento de la antera (Fig. 3.2d). Estas áreas están compuestas de células pequeñas, compactas, isodiamétricas, con una alta relación de núcleo/citoplasma. Luego de 20 días en ICA, las secciones de los callos embriogénicos mostraron claramente embriones somáticos, constituidos por una

organización bipolar (ápices radical y caulinar), primordios de hojas y el sistema vascular (Fig. 3.2e). Por otro lado, los callos friables no formaron embriones somáticos ni regeneraron plántulas (Fig. 3.2f).



**Fig. 3.1.** Formación de callos y regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de anteras en buffelgrass. a. Corte transversal de antera con micrósporas uninucleadas (barra = 100  $\mu$ m). b. Macolla con espiga embuchada. c. Anteras al momento del cultivo. d. Callos en la etapa de inducción a los 7 días de iniciado el cultivo de anteras (ICA). e. Callo no embriogénico. f. callo embriogénico a los 60 días de ICA (barra = 1 mm). g. Primeros brotes de un callo embriogénico. h. plántulas completas obtenidas en el medio de regeneración. i. Planta en invernadero luego del período de rusticación.

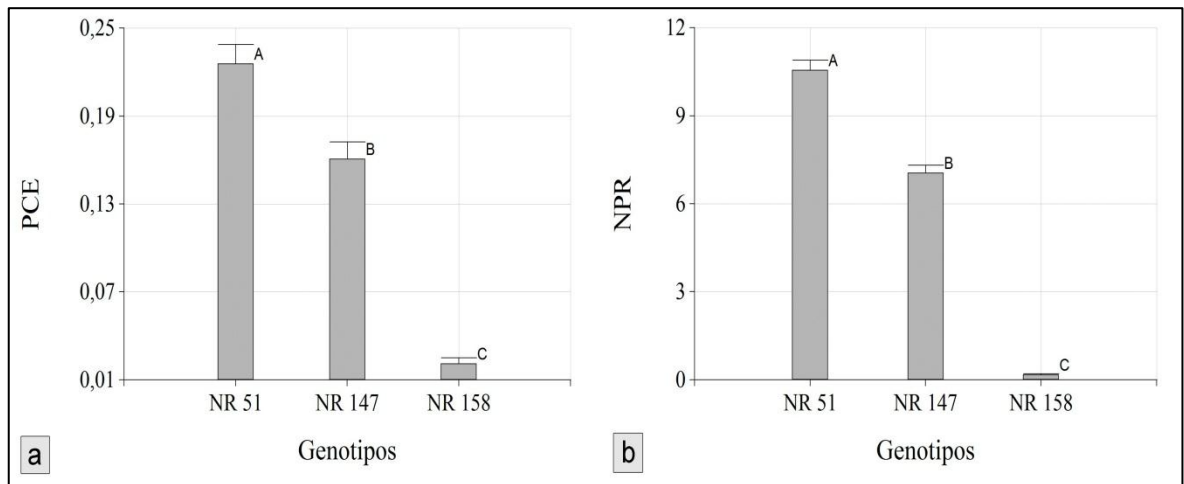




**Fig. 3.2.** Embriogénesis somática de callos provenientes del cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass. a. Corte transversal de una antera al momento del cultivo donde se observan el saco de polen (P) con micrósporas uninucleadas (flecha), tejido conectivo (CN) y las células de la pared: epidermis (ep), endodermis (ed), laminilla media (lm) y tapete (t). Divisiones celulares a partir del tejido conectivo (b), pared (c) y filamento de la antera (d) luego de 15 días de iniciado el cultivo *in vitro* (ICA). e. Corte de un callo embriogénico mostrando un típico embrión somático a los 20 días de ICA. f. Nótese la ausencia de células embriogénicas en el corte de un callo no embriogénico. Barra = 100  $\mu$ m.



Según los resultados obtenidos del análisis de los MLGs se detectaron diferencias altamente significativas entre los tres genotipos evaluados ( $P < 0,0001$ ), tanto para la proporción de callos embriogénicos (PCE) como para el número de plántulas regeneradas (NPR). Para ambas variables, el genotipo NR 51 fue el de mejor respuesta, seguida por NR 147, siendo el genotipo NR 158 el que presentó la menor eficiencia (Fig. 3.3a y b).



**Fig. 3.3.** a. Proporción de callos embriogénicos (PCE) y b. número de plántulas regeneradas (NPR) a partir del cultivo *in vitro* de anteras en tres genotipos apomícticos de buffelgrass. Los valores promedio representan tres fechas de recolección de macollas y pre-tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ).

Los resultados obtenidos de los MLGs para las variables PCE y NPR realizados para cada genotipo mostraron interacción significativa ( $P < 0,05$ ) entre fecha de recolección de macollas\*tratamiento, tanto para NR 51 como para NR 147 (Tabla 3.1). A diferencia de esto, en el genotipo NR 158 dicha interacción no fue significativa para ambas variables ( $P > 0,05$ ).

En NR 51, los pre-tratamientos realizados a las macollas no mejoraron la eficiencia de PCE. Sin embargo, éstos fueron beneficiosos para la variable NPR en la primera fecha de recolección de macollas (Tabla 3.1).

En NR 147, se observó aumento de eficiencia en la PCE al utilizar los pre-tratamientos de manitol en la primera fecha de recolección de macollas (Tabla 3.1). En cuanto al número de plántulas regeneradas, los pre-tratamientos promovieron mayor número de plántulas regeneradas (NPR), tanto para la primera como para la segunda fecha de recolección (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Proporción de callos embriogénicos (PCE) y número de plantas regeneradas (NPR) a partir del cultivo *in vitro* de anteras en dos genotipos apomíticos de buffelgrass.

FRM	T	Días	NR 51				NR 147			
			PCE		NPR		PCE		NPR	
			Media	E.E.	Media	E.E.	Media	E.E.	Media	E.E.
1	Control		0,11	0,04 B	4,63	0,76 C	0,07	0,03 B	1,29	0,43 C
	Agua	5	0,22	0,05 B	18,33	1,75 A	0,13	0,04 B	9,17	1,24 B
	Manitol	5	0,23	0,05 B	4,5	0,87 C	0,18	0,05 A	10,33	1,31 B
	Agua	7	0,2	0,06 B	8,8	1,33 B	0,1	0,04 B	1,67	0,53 C
	Manitol	7	0,13	0,04 B	14,83	1,57 A	0,2	0,06 A	8,6	1,31 B
2	Control		0,44	0,06 A	20,71	1,72 A	0,21	0,05 A	6,38	0,89 B
	Agua	5	0,25	0,06 B	17,33	1,7 A	0,28	0,06 A	14,33	1,55 A
	Manitol	5	0,3	0,06 A	19	1,78 A	0,37	0,06 A	17	1,68 A
	Agua	7	0,12	0,04 B	4,83	0,9 C	0,22	0,05 A	15,5	1,61 A
	Manitol	7	0,35	0,06 A	10,5	1,32 B	0,18	0,05 A	12,17	1,42 A
3	Control		0,36	0,05 A	17,75	1,49 A	0,17	0,05 A	8,43	1,1 B
	Agua	5	0,18	0,05 B	5,83	0,99 C	0,08	0,04 B	0,33	0,24 C
	Manitol	5	0,2	0,05 B	3,17	0,73 C	0,07	0,03 B	0,00	0,00 C
	Agua	7	0,13	0,04 B	0,83	0,37 D	0,12	0,04 B	1,67	0,53 C
	Manitol	7	0,15	0,05 B	4,83	0,9 C	0,03	0,02 B	0,00	0,00 C

Proporción de callos embriogénicos (PCE) y número de plántulas regeneradas (NPR), en función de la fecha de recolección de macollas (FRM) y del pre-tratamiento (T). Control, macollas sin pre-tratamientos. Medias con una letra común dentro de cada columna no son significativamente diferentes ( $P \leq 0,05$ ).

En NR 158, para PCE y NPR, existieron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) con respecto a la fecha de corte, siendo la primera fecha la única en la que se observaron respuestas favorables. En relación a los pre-tratamientos, si bien se diferenciaron entre ellos ( $P < 0,05$ ) no lo hicieron respecto del control. En este genotipo, teniendo en cuenta todas las fechas de recolección de macollas y pre-tratamientos

realizados, se obtuvieron 14 callos embriogénicos y 14 plantas regeneradas, por tal motivo los resultados no fueron incluidos en la Tabla 3.1.

## DISCUSIÓN

En este capítulo se puso a punto un protocolo de regeneración de plantas, *vía* embriogénesis somática, utilizando como explanto anteras con micrósporas en estado uninucleado en tres genotipos apomícticos de buffelgrass. Los embriones somáticos se indujeron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2,4-D, tal como fue mencionado para embriones maduros e inflorescencias (Kackar y Shekhawat, 1991; Colomba *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2009), sus características en tamaño y forma fueron similares a los observados en la especie (Yadav *et al.*, 2009). Asimismo, estos embriones germinaron al ser colocados en presencia de luz y en un medio con bajas concentraciones de auxinas y citoquininas (Colomba *et al.*, 2006). Por lo tanto, al igual que embriones maduros, inflorescencias, semillas (Ross *et al.*, 1995; Bhat *et al.*, 2001) y brotes apicales (Yadav *et al.*, 2009; Kumar y Bhat, 2012), las anteras pueden utilizarse como un explanto alternativo para regenerar plantas por cultivo de tejidos en buffelgrass.

De acuerdo a lo observado en los cortes histológicos realizados, las células somáticas de las anteras son las encargadas de generar embriones somáticos. De hecho, es conocida la gran totipotencia que tienen estas células para inducir embriogénesis somática (Perrin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2005; Salas *et al.*, 2011). Por ejemplo, en los cortes histológicos fueron observados pro-embryones, provenientes de una masa de células que proliferaron del tejido conectivo y del filamento, tal como fue descrito en *V. vinifera* (Faure *et al.*, 1996; Perrin *et al.*, 2004). También se mencionan a las células de la pared de la antera como las encargadas de iniciar el proceso morfogénico (Niimi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2005; Parra-Vega *et al.*, 2012). En los preparados del presente trabajo, se observaron numerosas divisiones celulares en cercanías del endotecio, lo que sugiere que ésta sería la capa de células involucrada en dicho proceso. Por otro lado, no se observaron micrósporas inducidas, lo que coincide con estudios realizados en *V. vinifera* (Faure *et al.*, 1996), donde se menciona que las

micrósporas se reabsorben o degeneran y no participan en la formación de embriones. Por lo tanto, estas observaciones demuestran claramente que los callos embriogénicos, y en consecuencia las plantas regeneradas, son de origen somático.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que, en las mismas condiciones experimentales, los tres genotipos apomícticos de buffelgrass responden al cultivo *in vitro* de anteras, pero con diferentes niveles de eficiencia, tanto para la inducción de callos embriogénicos como para la regeneración de plantas. Estas observaciones confirmarían el efecto del genotipo en el cultivo *in vitro* de diferentes explantos de la especie, ya que las mismas respuestas se observan cuando se utilizan embriones maduros o inflorescencias como explanto (Colomba *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2009).

Las mayores respuestas de inducción de callos embriogénicos se observaron en el genotipo NR 51 (44%) y fueron similares a los reportados para buffelgrass por Ross *et al.*, (1995) para semillas (30%) y por Yadav *et al.*, (2009) para inflorescencias (33,6%). Sin embargo, estos resultados difirieron de los mostrados por Colomba *et al.*, (2006) quienes obtuvieron un 83% de inducción utilizando embriones maduros, no obstante, el número de plantas regeneradas fue menor respecto de lo obtenido con anteras como explanto. Teniendo en cuenta que se trabajó con el mismo genotipo y en las mismas condiciones de inducción (Colomba *et al.*, 2006), las diferencias observadas probablemente se deban al tipo de explanto utilizado. Al respecto, si consideramos la mayor totipotencia que tienen los tejidos jóvenes de inflorescencias (Benkirane *et al.*, 2000; Vikrant y Rashid, 2002; Jha *et al.*, 2009) y que en buffelgrass hay correlación positiva entre el número de embriones somáticos formados con el número de plantas regeneradas (Colomba *et al.* 2006); es probable que con anteras se induzcan más embriones somáticos por callo embriogénico. Otra explicación podría ser una mayor germinación de los embriones somáticos formados, debido a las concentraciones de auxinas incluidas en la etapa de regeneración (Lambé *et al.*, 1999), ya que Colomba *et al.*, (2006) utilizaron 0,1 mg/l de ANA *versus* 0,5 mg/l empleados en el presente estudio.

La información obtenida en este trabajo sugiere que los pre-tratamientos realizados a las macollas estimulan la competencia embriogénica de células somáticas en algunas fechas de recolección de macollas. El estímulo fue similar al observado en el cultivo *in vitro* de anteras para la obtención de doblehaploides en cebada (Cistué *et al.*, 1999; Kruczkowska *et al.*, 2002). El uso de manitol 0,3 M durante 5 o 7 días a 4°C mejoró la respuesta embriogénica en NR 147 (primera fecha de corte), tal como fue mencionado para el cultivo de micrósporas de trigo (Labani *et al.*, 2007). Además, en NR 147 (primera y segunda fecha de corte) y NR 51 (primera fecha de corte) se observó que los pre-tratamientos generaron mayor número de plántulas regeneradas. De esta manera, el efecto del pre-tratamiento estaría relacionado con la etapa de inducción, donde es posible que los diferentes estreses aplicados a las anteras generen mayor número de embriones somáticos por callo embriogénico inducido (Kruczkowska *et al.*, 2002).

Otra similitud observada con el cultivo *in vitro* de anteras para la obtención de doblehaploides es que la fecha de recolección de macollas afecta la respuesta de inducción y de regeneración. En NR 158, las primeras macollas tienen una mayor respuesta embriogénica, mientras que en NR 51 y NR 147 (sin pre-tratamientos), las mejores respuestas se obtienen cuando las plantas alcanzan la floración plena (segunda y tercera fecha de recolección). Este comportamiento puede estar relacionado a las condiciones fisiológicas de la planta donante, ya que se sabe que influyen en la respuesta embriogénica (Dunwell, 1976, Takahata *et al.*, 1991). Ercan *et al.*, (2006) sugieren que se deben recoger inflorescencias de plantas en los mejores estados de desarrollo para el cultivo *in vitro* de anteras. Por lo tanto, como en *Cenchrus* spp. hay patrones de crecimientos diferentes (Hanselka *et al.*, 2004) y que la respuesta embriogénica depende del genotipo, es probable que NR 158 alcance el máximo potencial embriogénico en fechas más tempranas, mientras que NR 51 y NR 147 lo hagan en fechas más tardías. Este comportamiento estaría posibilitando cosechar inflorescencias en fechas diferentes durante la estación de crecimiento, lo que permitiría obtener el máximo potencial embriogénico para cada genotipo.

## CONCLUSIONES

Las anteras en estado uninucleado pueden ser utilizadas como fuente de explanto para obtener plantas *in vitro* en buffelgrass.

Las plantas se originan mediante embriogénesis somática, a partir del tejido somático de las anteras.

La eficiencia de inducción y de regeneración depende del genotipo y es afectada por la fecha de recolección de macollas, los pre-tratamientos o la interacción entre ambos factores.

## BIBLIOGRAFÍA

- Benkirane H., Sabounji K., Chlyah A. and Chlyah H. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 107–113.
- Bhat V., Dalton S. J., Kumar S., Bhat B. V., Gupta M. G. and Morris P. 2001. Particle-inflow-gun-mediated genetic transformation of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.): optimizing biological and physical parameters. *Journal of Applied Genetics* 42: 405-412.
- Chen L. J., Zhu X. Y., Gu L. and Wu J. 2005. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem). *Plant Cell Reports* 24: 401-407.
- Cistué L., Ramos A. and Castillo A. M. 1999. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 159-166
- Colomba E. L., Grunberg K., Griffa S., Ribotta A., Mroginski L. and Biderbost E. 2006. The effect of genotype and culture medium on somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryos of fourteen apomictic cultivars of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Grass and Forage Science* 61: 2-8.
- D'Ambrogio de Argüeso A. 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Hemisferio Sur S.A, Buenos Aires.
- Di Rienzo J. A., Guzmán A.W. and Casanoves F. 2002. A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 7:1–14.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C. W. 2012. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (<http://www.infostat.com.ar>).
- Dunwell J. M. 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana Tabacum*. *Environmental and Experimental Botany* 16: 109-118.
- Ercan N., Sensoy A. F., Sensoy A. S. 2006. Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae* 110: 16-20.
- Faure O., Aarrouf J. and Nougarede A. 1996. Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): proembryogenesis. *Annals of Botany* 78: 23-28.
- Fisher W. D., Bashaw E. C. and Holt E. C. 1954. Evidence of apomixis in *Pennisetum ciliare* and *Cenchrus setigerus*. *Agron J* 46: 401-404.
- Hanna W. W. and Bashaw E. C. 1987. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Science* 27, 1136–1139.
- Hanselka C.W., Hussey M. A. and Ibarra F. 2004. Buffelgrass. In: Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (eds) *Warm-season (C4) grasses*. Madison, Wisconsin, pp 477-502.
- Jha P., Yadav C. B., Anjaiah V. and Bhat V. 2009. In vitro plant regeneration through somatic embryogenesis and direct shoot organogenesis in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45: 145-154.

- Jessup R. W., Burson B. L., Burow O., Wang Y. W., Chang C., Li Z., Paterson A. H., Hussey M. A. 2003. Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.) as revealed by genome mapping. *Genome* 46: 304-313.
- Kackar A. and Shekhawat N.S. 1991. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of *Cenchrus setigerus* and *Cenchrus ciliaris*. *Indian Journal of Experimental Biology* 29:62–64.
- Kruczkowska H., Pawłowska H., Skucińska B. 2002. Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *Journal of Applied Genetics* 43: 287-296.
- Kumar S. and Bhat V. 2012. High-frequency direct plant regeneration via multiple shoot induction in the apomictic forage grass *Cenchrus ciliaris* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48: 241-248.
- Kumar S., Sahu N. and Singh A. 2015. High-frequency in vitro plant regeneration via callus induction in a rare sexual plant of *Cenchrus ciliaris* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 51(1): 28-34.
- Labbani Z., Buyser J. and Picard E. 2007. Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. 'Jennah Khetifa'. *Plant Breeding* 126: 565-568.
- Lambé P., Mutambel H. S. N., Deltour R. and Dinant M. 1999. Somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*): strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 23-29.
- Larkin P.J. and Scowcroft S. C. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197–214.
- Leal F., Loureiro J., Rodriguez E., Pais M. S., Santos C. and Pinto-Carnide O. 2006. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Reports* 25: 978-985.
- López-Pérez A. J., Carreño J., Martínez-Cutillas A. and Dabauza M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis* 44: 79-85.
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murty U. R., Bharathi M., Visadara M. and Annapurna. 1992. Embryogenic callus formation and plant regeneration in *Cenchrus ciliaris* (L). *Cereal Research Communications* 20: 7-12.
- Niimi Y., Dong-Sheng H. and Makoto F. 2001. Production of virus-free plantlets by anther culture of *Lilium*×'Enchantment'. *Scientia horticultrae* 90: 325-334.
- Parra-Vega V., Renau-Morata B., Sifres A. and Seguí-Simarro J. M. 2012. Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 112: 353-360.
- Perrin M., Gertz C. and Masson J. E. 2004. High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science* 167: 1343-1349.
- Rodrigues L. R., Oliveira J. M. S., Mariath J. E. and Bodanese-Zanettini M. H. 2005. Histology of embryogenic responses in soybean anther culture. *Plant cell, tissue and organ culture* 80(2): 129-137.



- Ross A. H., Manners J. M. and Birch R. G. 1995. Embryonic callus production, plant regeneration, and transient gene expression following particle bombardment, in the pasture grass *Cenchrus ciliaris* (Gramineae). *Australian Journal of Botany* 43:193–199.
- Salas P., Prohens J. and Seguí-Simarro J. M. 2011. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica* 182:261–274.
- Snyder L. A., Hernandez A. R. and Warmke H. E. 1955. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. *Botanical Gazette* 116:209-221.
- Tessi N. P., Avila J. M., Edith R., Armando R. H. y Ferrando C. A. 2014. Buffel grass Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. (ed) INTA, Chamental, La Rioja, pp 1-20.
- Takahata Y., Brown D. C. W. and Keller W. A. 1991. Effect of donor plant age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus* L. *Euphytica* 58: 51-55
- Vikrant A. and Rashid A. 2002. Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 71-77.
- Winarto B., Rachmawati F., Pramanik D. and Teixeira da Silva J. A. 2011. Morphological and cytological diversity of regenerants derived from half-anther cultures of anthurium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 363-374.
- Yadav C. B., Jha P., Mahalakshmi C., Anjaiah V. and Bhat V. 2009. Somatic embryogenesis and regeneration of *Cenchrus ciliaris* genotypes from immature inflorescence explants. *Biologia Plantarum* 53:603-609.

## CAPÍTULO 4

### ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN PLANTAS REGENERADAS IN VITRO DE BUFFELGRASS MEDIANTE CMF E ISSR

#### INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de células o tejidos es una herramienta biotecnológica que otorga innumerables beneficios en cualquier especie vegetal. Un fenómeno observable en la utilización de esta tecnología es la aparición espontánea de plantas regeneradas con cambios genéticos respecto del material utilizado como dador de explanto. Este fenómeno, denominado variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981), suele ser poco deseable en algunas especies propagadas *in vitro* (Bhatia *et al.*, 2009; Carra *et al.*, 2012). Sin embargo, en cultivares apomícticos de buffelgrass [*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.], los cambios pueden ser potencialmente útiles como fuente de variabilidad genética utilizable en programas de mejoramiento (López Colomba *et al.*, 2011; 2013).

En varias especies regeneradas *in vitro* se mencionan, entre otras, mutaciones puntuales en el ADN o en el nivel de ploidía (Leroy *et al.*, 2001; Osipova *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006; Clarindo *et al.*, 2008; Currais *et al.*, 2013). Muchos de estos cambios suelen estar asociados a mecanismos predisponentes como el genotipo (Tremblay *et al.*, 1999), los reguladores de crecimiento incorporados en el medio (May y Sink, 1995; Lim y Loh, 2003; Clarindo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008) o el tiempo de permanencia en condiciones *in vitro* (Endemann *et al.*, 2001). Estos cambios, asociados a la variación somaclonal, incluyen un amplio espectro de modificaciones en el ADN nuclear; a diferencia de los resultantes por efectos epigenéticos donde las modificaciones heredables no son debidas a cambios en la secuencia de bases del ADN (Griffiths *et al.*, 1999).

La caracterización fenotípica es uno de los métodos más económicos y sencillos para detectar la variación somaclonal (Tremblay *et al.*, 1999; Winarto *et al.*, 2011). No

obstante, los estudios relacionados con variación somaclonal de plantas regeneradas *in vitro* suelen requerir de un enfoque integrado, incluyendo varias técnicas de análisis de ADN nuclear (Carra *et al.*, 2012; Viehmannova *et al.*, 2014; Bairu *et al.*, 2011).

En las últimas décadas, la medición del contenido de ADN mediante citometría de flujo (CMF) ha sido sugerida como una alternativa para evaluar variación somaclonal en plantas regeneradas *in vitro* (Leal *et al.*, 2006; Doležel *et al.*, 2007). La técnica cumple un rol importante en el análisis de plantas micro-propagadas que sufren cambios en los niveles de ploidía (Leal *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2010), por ejemplo en *Carica papaya* L. permitió detectar individuos diploides, triploides y tetraploides (Clarindo *et al.*, 2008). En *Musa* spp. la metodología puesta a punto permitió identificar individuos aneuploides que pierden uno o dos cromosomas (Roux *et al.*, 2003). Pfosser *et al.*, (1995) demostraron que la CMF es lo suficientemente sensible para detectar cambios en el contenido de ADN nuclear que se producen en los brazos de un cromosoma. Además, tiene la ventaja de poder realizar un análisis a gran escala y en cualquier etapa en que se encuentran las plantas propagadas *in vitro* (Doležel *et al.*, 2007).

Las secuencias inter-microsatélites “ISSRs” (*Inter-Simple Sequence Repeat*, por sus siglas en inglés) son un tipo de marcadores moleculares que también permiten abordar estudios relacionados con cambios genéticos en diferentes especies regeneradas *in vitro* (Leroy *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2006; Bhatia *et al.*, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2010). La técnica se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utiliza un solo “*primer*” o cebador complementario a los microsatélites (Reddy *et al.*, 2002). Una variante consiste en agregar nucleótidos en el extremo 3’ del cebador, denominado “ancla” (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Cada banda que se amplifica es un locus y corresponde a la secuencia de ADN que se encuentra entre dos microsatélites iguales e invertidos. Esta técnica tiene la ventaja que el diseño de los cebadores no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN a amplificar, lo que permite emplearla en varias especies cuyo genoma no está secuenciado (Gupta *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001). Al presente, es escasa la información disponible sobre el uso de este tipo de marcadores moleculares en buffelgrass, excepto por estudios realizados para determinar

diversidad genética en poblaciones silvestres (Al-Soqeer, 2011; Gutierrez-Ozuna *et al.*, 2009).

Los objetivos del presente capítulo fueron: evaluar la estabilidad genética en plantas regeneradas *in vitro* a diferentes niveles: nuclear (contenido de ADN), citogenético, molecular y fenotípico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

El estudio se llevó a cabo en plantas regeneradas *in vitro*, *vía* embriogénesis somática, a partir del cultivo de anteras de buffelgrass (Capítulo 3). Se seleccionaron aproximadamente 50 plantas del genotipo NR 51 y la misma cantidad de la NR 147. Las mismas fueron seleccionadas en la etapa posrusticación, cuando se encontraban en macetas plásticas de 1Kg de capacidad. Las evaluaciones fueron realizadas sobre plantas de la generación R<sub>1</sub> (plantas obtenidas *in vitro*).

Para evaluar si el pre-tratamiento o el genotipo son factores que afectan la estabilidad genética, en ambos materiales se tomaron 10 plantas seleccionadas al azar, del control y de cada uno de los pre-tratamientos: H<sub>2</sub>O5d, H<sub>2</sub>O7d, 0,3M5d y 0,3M7d (Capítulo 3). A su vez, para determinar si el tiempo de permanencia *in vitro* es otro factor predisponente, se registró en cada planta el tiempo que transcurrió en cada una de las etapas: inducción, regeneración y enraizamiento (Capítulo 3).

### **Citometría de flujo**

El contenido de ADN nuclear de las plantas regeneradas *in vitro* se estimó utilizando la metodología desarrollada en el Capítulo 2. Para determinar la estabilidad

genética de las plantas regeneradas se comparó el contenido de ADN nuclear de cada una de ellas respecto al de la planta dadora de anteras. Se realizaron entre cuatro y seis repeticiones por planta regenerada *in vitro*.

El contenido de ADN nuclear relativo de las plantas se expresó mediante un índice de fluorescencia (ID) teniendo en cuenta al estándar de referencia (ID =  $2C_{\text{buffelgrass}}/2C_{\text{Z. mays}}$ ). El contenido de ADN nuclear de cada planta regenerada de buffelgrass fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido 2C de buffelgrass (pg)} = \frac{\text{posición media del pico G}_0/\text{G}_1 \text{ de buffelgrass}}{\text{posición media del pico G}_0/\text{G}_1 \text{ de } Z. \text{ mays L.}} \times 5.43$$

### **Secuencias inter-microsatélites (ISSRs)**

Durante la puesta a punto de los marcadores moleculares *ISSRs*, se trabajó con seis plantas regeneradas *in vitro* del material NR 51, las cuales mostraron inestabilidad genética (cambios en el ADN ploidía) en el contenido de ADN nuclear mediante la técnica CMF.

El ADN genómico de cada planta fue aislado de hojas congeladas (-20°C) utilizando el kit comercial “*Nucleon PhytoPure*” (GE Healthcare) según instrucciones del fabricante. El ADN puro fue resuspendido en un tubo eppendorf con 50 µl de agua destilada. La concentración de ADN en cada muestra se cuantificó mediante lectura de absorbancia (A260/280nm) en un espectrofotómetro *NanoDrop* ND-1000 V3.5 (NanoDrop Technologies, EE.UU.).

Se probaron 26 cebadores universales *ISSRs* diseñados a partir de secuencias publicadas *on line* (University of British Columbia primer set 9) y de trabajos previos en otras especies vegetales (Ray *et al.*, 2006; Vaillancourt *et al.*, 2008; Garayalde *et al.*, 2011) (Anexo: Tabla 7.1).

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo 2 µl de ADN (25 ng/µl), 1X de solución tampón (Tris-HCl 6 mM pH 8,8, KCl 50 mM), 0,8 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 4 µl de cada dNTP (1 mM), 4 µl del cebador (5 µM) y 0,2 U de GoTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Promega, USA). La amplificación se realizó con los siguientes parámetros: 94°C por 3', 35 ciclos de 93°C por 30", 55°C por 1', 72°C por 1' 30", seguido de un período de extensión final de 72°C por 5'. Con el fin de mejorar los patrones de bandas de los cebadores que no amplificaron, se probaron diferentes temperaturas de hibridación (Garayalde *et al.*, 2011) y en algunas reacciones se agregó 0,5 µl (10 mg/ml) de albúmina de suero bovino (BSA). Para aumentar la procesividad del patrón de bandas se realizaron al menos tres reacciones por cebador. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler 5333.

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 2% en solución tampón TBE 0,5 X [Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM (pH 8,3)]. Se sembró un volumen de 12 µl de muestra por calle [10 µl del producto de amplificación + 2 µl de buffer de siembra 5X (0,0125 g de azul de bromofenol + 0,0125 g de xileno + 1,5 ml glicerol + 3,5 ml agua)]. Conjuntamente, se sembró un marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb, *Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific Inc) como marcador de referencia. La corrida se realizó a 100 V durante dos horas en solución tampón TBE 0,5 X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml, GIBCO BRL) y la observación de los fragmentos se realizó bajo luz UV (312 nm). Finalmente, las imágenes de los geles se capturaron mediante BIORAD, Molecular Imager<sup>®</sup> Gel DocTM XR System (USA).

## **Evaluación fenotípica**

El material NR 51 y las seis plantas regeneradas *in vitro* (R<sub>1</sub>) que mostraron inestabilidad genética mediante CMF, fueron llevadas a una parcela experimental. Esta metodología de trabajo fue realizada para determinar si los cambios detectados con las diferentes técnicas de análisis de ADN nuclear generaron también variabilidad en el fenotipo de las plantas regeneradas *in vitro*. Las plantas fueron trasplantadas a campo a una distancia de un metro entre ellas. Se realizaron observaciones fenotípicas y mediciones en

caracteres morfológicos de hoja, tallo y panoja (Tabla: 4.1) (Griffa, 2002; 2010). Las evaluaciones fueron realizadas durante dos campañas agrícolas (2013/14 y 2014/15). En cada planta se evaluaron 5 macollas que presentaban la inflorescencia totalmente emergida en estado inmaduro.

Tabla 4.1. Caracteres de morfología externa en hoja, tallo y panoja analizados en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

Carácter	Criterio de evaluación	Abreviatura
Longitud de lámina de hoja bandera (cm)	Se midió desde la lígula hasta el extremo distal de la lámina de la hoja bandera.	<b>LLHB</b>
Ancho de lámina de hoja bandera (cm)	Se midió a los 2 cm a partir de la base de la lígula.	<b>ALHB</b>
Longitud de vaina (cm)	Se midió desde la base de la lámina hasta el nudo precedente inferior.	<b>LVHB</b>
Altura final de planta (cm)	Se consideró la macolla más alta de la planta, desde la base de la macolla hasta la base de la inflorescencia.	<b>AFP</b>
Longitud de inflorescencia (cm)	Se midió desde la base de la inflorescencia al extremo distal.	<b>LINF</b>
Longitud total del pedúnculo floral (cm)	Se midió desde la base de la inflorescencia hasta el 1 <sup>er</sup> nudo.	<b>LPE</b>
Longitud del pedúnculo excerto (cm)	Se midió desde la base de la inflorescencia hasta la base de la hoja bandera.	<b>LPEE</b>
Longitud inter-nodal (cm)	Se midió la longitud entre el 3 <sup>er</sup> y 4 <sup>to</sup> nudo	<b>LINT</b>
Ancho tallo (mm)	Se midió el diámetro del tallo a los 2 cm por debajo del 3 <sup>er</sup> nudo.	<b>AT</b>
Número de nudos (n°)	Se contaron todos los nudos en el eje primario de la macolla.	<b>NUD</b>
Número de ramas (n°)	Se contaron todas las ramas que emergen del eje primario de la macolla.	<b>RAM</b>
Número de flores/ramas (n°)	Se contaron todas las inflorescencias en las ramas que emergen del eje primario de la macolla.	<b>FL/RA</b>

### Análisis estadístico

Para analizar la estabilidad genética se comparó el contenido de ADN nuclear de cada planta regenerada *in vitro* con el ADN nuclear de la planta dadora de antera mediante

pruebas  $t$  para muestras independientes. Dado el elevado número de contrastes, se procedió a ajustar el valor  $P$  mediante la corrección de Bonferroni.

Para determinar si el genotipo, el pre-tratamiento o los días *in vitro* (inducción – regeneración – enraizamiento) tienen efecto sobre la variación en la cantidad de ADN nuclear, se ajustó un modelo mixto para la diferencia entre la cantidad de ADN nuclear de cada planta regenerada y la planta dadora de anteras (Capítulo 3). Se consideraron como variables de clasificación los genotipos, los pre-tratamientos, los días *in vitro* y sus interacciones (genotipo\*pre-tratamiento, genotipo\*días *in vitro*, pre-tratamiento\*días *in vitro* y genotipo\*pre-tratamiento\*días *in vitro*) y cada planta como efecto aleatorio. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

Para la codificación de los perfiles moleculares obtenidos por *ISSRs* se llevó a cabo una matriz de datos binarios por cebador y por individuo, donde “1” indicó presencia y “0” ausencia de bandas. El perfil molecular de la planta dadora de anteras (NR 51) se utilizó para definir el patrón “testigo”. Las asociaciones genéticas entre individuos se evaluaron mediante el coeficiente de similitud de Jaccard y la transformación ( $\sqrt{1-S}$ ). La matriz de distancia se sometió a un análisis de coordenadas principales (EMD) y al método de agrupamiento jerárquico UPGMA.

A lo fines de corroborar variabilidad fenotípica en los materiales regenerados *in vitro*, se compararon mediante pruebas test  $t$  para muestras independientes las variables morfológicas ( $R_1$ ) con respecto a la planta dadora de antera (NR 51).

Para determinar el grado de agrupamiento en los materiales regenerados *in vitro* ( $R_1$ ) y el material NR 51 se realizó análisis de conglomerados utilizando el método de encadenamiento promedio (UPGMA) aplicando la distancia Euclídea como medida de proximidad. El análisis se realizó utilizando caracteres de morfología externa de hoja, tallo y panoja (Tabla: 4.1).



El dendrograma y todos los análisis efectuados con la matriz de datos binarios fueron realizados con el software estadístico Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2004).

## RESULTADOS

### Citometría de flujo

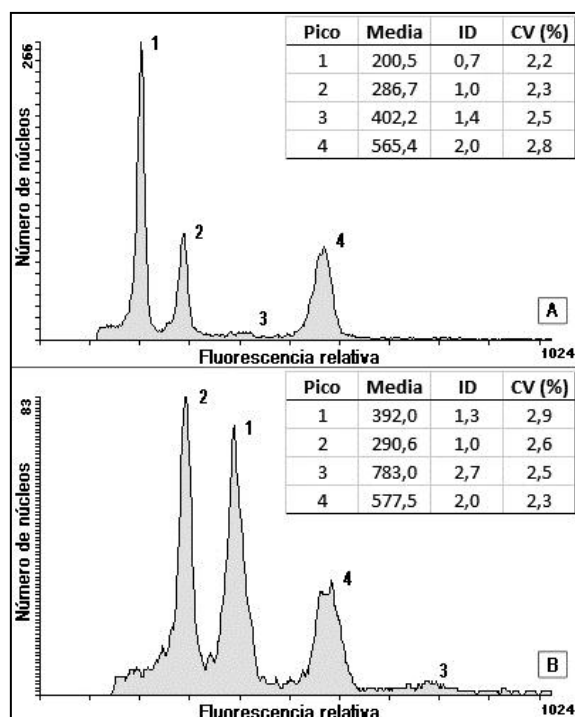
En la Tabla 4.2 se muestra el contenido de ADN nuclear de 93 plantas regeneradas mediante el cultivo *in vitro* de anteras provenientes de los genotipos NR 51 y NR 147. En el pre-tratamiento siete días de agua del genotipo NR 51 fueron analizadas tres plantas, ya que las demás murieron en la etapa postruisticación.

Los resultados del test *t* para muestras independientes realizado para determinar la estabilidad genética mostraron diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en los valores de ADN nuclear (Tabla 4.2). De las comparaciones realizadas ( $n=43$ ) en el genotipo NR 51, en siete de ellas se encontraron plantas diferentes, cinco con un contenido de ADN menor y dos con un contenido de ADN mayor (Tabla 4.2). En las cinco plantas con menor ADN nuclear, el rango de variación en el contenido 2C fue de 3,7291 pg a 3,7959 pg, lo que representa un porcentaje de variación con respecto a la planta dadora de anteras (2C; 3,86 pg) del 3,31% al 1,6%, respectivamente. En las dos plantas con mayor contenido de ADN nuclear (Tabla 4.2), los valores 2C representan aproximadamente el doble del citotipo aneuploide que le dió origen (Fig. 4.2). En las plantas regeneradas de la genotipo NR 147 (2C; 3,84 pg) las comparaciones realizadas ( $n=50$ ) no mostraron aumento en el contenido de ADN nuclear, aunque si se detectaron tres plantas con menor contenido (Tabla 4.2). El porcentaje de variación del contenido de ADN nuclear de estas plantas con respecto al genotipo de origen fue del 3,16% al 2,62%.

Tabla 4.2. Contenido 2C de ADN nuclear determinado por citometría de flujo de plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de anteras de dos genotipos apomíticos de buffelgrass.

NR 51					NR 147				
Planta	T	2C (pg)	n	CV ± d.e.	Planta	T	2C (pg)	n	CV ± d.e.
Pl.1	Control	3,8192	6	2,47 0,34	Pl.1	Control	3,7882	4	3,15 0,44
Pl.2	Control	3,8239	4	2,32 0,48	Pl.2	Control	3,8222	4	2,89 0,31
Pl.3	Control	3,8307	4	1,84 0,85	Pl.3	Control	3,8068	4	2,21 0,31
Pl.4	Control	3,8526	4	2,92 0,17	Pl.4	Control	3,8357	4	3,01 0,27
Pl.5	Control	3,8020	4	2,73 0,15	Pl.5	Control	3,8325	4	2,89 0,06
Pl.6	Control	3,7322*	6	2,03 0,21	Pl.6	Control	3,8337	4	2,10 0,10
Pl.7	Control	3,7625*	6	2,39 0,19	Pl.7	Control	3,8509	4	2,44 0,41
Pl.8	Control	3,8226	4	1,84 1,00	Pl.8	Control	3,8229	4	2,18 0,23
Pl.9	Control	3,7948	4	2,73 0,24	Pl.9	Control	3,8159	4	3,00 0,20
Pl.10	Control	3,8208	4	3,00 0,23	Pl.10	Control	3,8282	4	2,90 0,12
Pl.1	H <sub>2</sub> O5d	3,8096	4	2,90 0,15	Pl.1	H <sub>2</sub> O5d	3,8557	4	2,99 0,31
Pl.2	H <sub>2</sub> O5d	3,8159	4	1,75 0,79	Pl.2	H <sub>2</sub> O5d	3,8094	4	2,11 0,45
Pl.3	H <sub>2</sub> O5d	3,8425	4	1,93 0,99	Pl.3	H <sub>2</sub> O5d	3,8004	4	2,29 0,25
Pl.4	H <sub>2</sub> O5d	3,7291*	6	1,94 0,19	Pl.4	H <sub>2</sub> O5d	3,8289	4	2,57 0,09
Pl.5	H <sub>2</sub> O5d	3,8092	6	2,62 0,09	Pl.5	H <sub>2</sub> O5d	3,8273	4	2,24 0,32
Pl.6	H <sub>2</sub> O5d	3,7322*	6	2,24 0,23	Pl.6	H <sub>2</sub> O5d	3,8619	4	3,14 0,56
Pl.7	H <sub>2</sub> O5d	3,8615	4	2,46 0,33	Pl.7	H <sub>2</sub> O5d	3,8250	4	2,84 0,42
Pl.8	H <sub>2</sub> O5d	3,8107	4	2,90 0,11	Pl.8	H <sub>2</sub> O5d	3,8494	4	2,57 0,05
Pl.9	H <sub>2</sub> O5d	3,8074	4	3,00 0,18	Pl.9	H <sub>2</sub> O5d	3,8124	4	2,63 0,16
Pl.10	H <sub>2</sub> O5d	3,7984	4	2,90 0,09	Pl.10	H <sub>2</sub> O5d	3,8563	4	2,71 0,18
Pl.1	0,3M5d	7,3995*	6	1,69 0,25	Pl.1	0,3M5d	3,8232	4	2,62 0,22
Pl.2	0,3M5d	7,3770*	7	1,87 0,23	Pl.2	0,3M5d	3,8304	4	2,64 0,08
Pl.3	0,3M5d	3,8223	4	3,38 0,64	Pl.3	0,3M5d	3,8344	4	2,79 0,08
Pl.4	0,3M5d	3,7225	4	3,60 0,75	Pl.4	0,3M5d	3,8306	4	2,28 0,21
Pl.5	0,3M5d	3,8029	4	3,50 0,53	Pl.5	0,3M5d	3,7984	4	2,94 0,64
Pl.6	0,3M5d	3,8062	4	3,34 0,47	Pl.6	0,3M5d	3,8225	4	2,77 0,10
Pl.7	0,3M5d	3,8274	4	3,43 0,61	Pl.7	0,3M5d	3,8251	4	2,25 0,05
Pl.8	0,3M5d	3,8139	4	1,80 0,31	Pl.8	0,3M5d	3,8164	4	2,22 0,10
Pl.9	0,3M5d	3,7536*	6	1,78 0,19	Pl.9	0,3M5d	3,8205	4	2,74 0,28
Pl.10	0,3M5d	3,8277	4	2,37 0,32	Pl.10	0,3M5d	3,8199	4	2,18 0,13
Pl.1	H <sub>2</sub> O7d	3,8417	4	3,17 0,20	Pl.1	H <sub>2</sub> O7d	3,8294	4	2,85 0,17
Pl.2	H <sub>2</sub> O7d	3,8130	4	2,94 0,16	Pl.2	H <sub>2</sub> O7d	3,8049	4	1,89 0,24
Pl.3	H <sub>2</sub> O7d	3,8166	4	3,09 0,30	Pl.3	H <sub>2</sub> O7d	3,8001	4	2,39 0,48
Pl.1	0,3M7d	3,8139	4	1,69 1,09	Pl.4	H <sub>2</sub> O7d	3,8155	4	2,05 0,04
Pl.2	0,3M7d	3,8242	4	3,09 0,34	Pl.5	H <sub>2</sub> O7d	3,8636	3	2,57 0,42
Pl.3	0,3M7d	3,7888	4	2,56 0,08	Pl.6	H <sub>2</sub> O7d	3,8394	4	3,22 0,20
Pl.4	0,3M7d	3,8329	4	2,09 0,46	Pl.7	H <sub>2</sub> O7d	3,7420*	6	3,20 0,14
Pl.5	0,3M7d	3,8595	4	2,28 0,38	Pl.8	H <sub>2</sub> O7d	3,7457*	6	3,00 0,14
Pl.6	0,3M7d	3,8528	4	2,93 0,09	Pl.9	H <sub>2</sub> O7d	3,8184	4	2,91 0,10
Pl.7	0,3M7d	3,8256	4	2,59 0,24	Pl.10	H <sub>2</sub> O7d	3,8139	4	2,90 0,13
Pl.8	0,3M7d	3,8103	4	2,60 0,26	Pl.1	0,3M7d	3,7884	4	3,05 0,74
Pl.9	0,3M7d	3,8304	4	2,53 0,17	Pl.2	0,3M7d	3,8363	4	2,37 0,56
Pl.10	0,3M7d	3,8437	4	3,04 0,27	Pl.3	0,3M7d	3,8071	4	2,92 0,38
					Pl.4	0,3M7d	3,8812	4	1,96 0,10
					Pl.5	0,3M7d	3,8390	4	2,12 0,25
					Pl.6	0,3M7d	3,7246*	6	2,84 0,14
					Pl.7	0,3M7d	3,8432	4	2,03 0,15
					Pl.8	0,3M7d	3,8475	6	2,50 0,25
					Pl.9	0,3M7d	3,8339	4	2,44 0,50
					Pl.10	0,3M7d	3,8388	4	2,11 0,28

El valor 2C es la media del número de veces que se analizó la muestra (n) y está expresado en picogramos (pg) los cuales fueron obtenidos por el análisis conjunto de los núcleos aislados de buffelgrass y *Zea mays* CE-777 (2C = 5.43 pg ADN) como estándar de referencia. (\*) Indica diferencia significativas en el contenido 2C entre la planta regenerada *in vitro* respecto de la planta dadora de anteras. Media del coeficiente de variación y el desvío estándar (CV ± d.e) de la intensidad de fluorescencia de los núcleos en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de buffelgrass. (T) pre-tratamiento. Control, macollas sin pre-tratamiento.



**Fig. 4.1.** Histogramas de intensidad de fluorescencia relativa obtenidos tras el análisis simultáneo de núcleos aislados de hojas de buffelgrass y *Zea mays* CE-777 ( $2C = 5,43$  pg ADN) como estándar de referencia. (A) Genotipo NR 51, (B) planta 1 “PI” 0.3M5d. Los picos 1 y 2 corresponden a los núcleos en la fase  $G_0/G_1$  de buffelgrass (1) y *Zea mays* (2), mientras que los picos 3 y 4 corresponden a los núcleos en la fase  $G_2$  de buffelgrass (3) y de *Zea mays* (4).

Los análisis del modelo, con respecto a la influencia del genotipo, el pre-tratamiento o los días de permanencia *in vitro* en la cantidad de ADN nuclear, sugirieron que no hubo efecto significativo para ninguno de los factores principales [genotipo ( $P = 0,4993$ ), pre-tratamiento ( $P = 0,5082$ ), días *in vitro* ( $P = 0,4051$ )] ni para ninguna de sus interacciones [pre-tratamiento\*días *in vitro* ( $P = 0,1926$ ), pre-tratamiento\*genotipo ( $P = 0,2203$ ), genotipo\*días *in vitro* ( $P = 0,3884$ ) y genotipo\*pre-tratamiento\*días *in vitro* ( $P = 0,2203$ )].

Cabe aclarar que los resultados de los análisis realizados mediante CMF revelaron variaciones en el valor  $2C$ , los cuales podrían sugerir cambios en los niveles de ploidía (Roux *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2008; Clarindo *et al.*, 2008; Currais *et al.*, 2013). Para

corroborar esta hipótesis, se calculó el nivel de ADN ploidía en estas plantas a partir del contenido de ADN nuclear, implementando la siguiente fórmula:

$$y = 6.0501 + 9.6522x$$

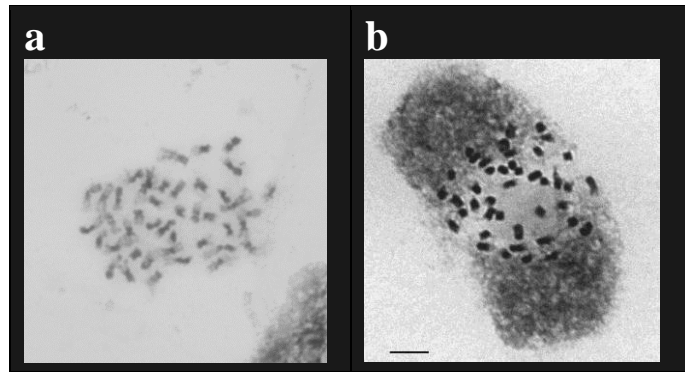
donde  $y$  es el número de cromosomas y  $x$  el contenido de ADN nuclear expresado en picogramos (Capítulo 2).

Los resultados del análisis de regresión lineal indicarían que los materiales que presentaron menor contenido de ADN nuclear perdieron un cromosoma (Tabla 4.3). El recuento cromosómico confirmó la pérdida de un cromosoma en la planta Pl.6 (H<sub>2</sub>O5d), con respecto del genotipo dador de anteras NR 51 (Fig. 4.2a), ya que el material regenerado *in vitro* tuvo  $2n = 42$  (Fig. 4.2b). En los 2 materiales que presentaron un aumento en el contenido de ADN nuclear, los resultados del modelo indicarían que las plantas poseen aproximadamente 77 cromosomas (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Nivel de ADN ploidía calculado a partir del contenido de ADN nuclear en plantas regeneradas *in vitro* a partir del cultivo de anteras de buffelgrass.

NR	Planta	Trat.	2C (pg)	ADN ploidía (*)	R <sub>1</sub>
51	Pl.6	Control	3,7322	42	R <sub>1-t32</sub>
	Pl.7	Control	3,7625	42	R <sub>1-t33</sub>
	Pl.4	H <sub>2</sub> O5d	3,7291	42(**)	R <sub>1-t4</sub>
	Pl.6	H <sub>2</sub> O5d	3,7322	42	-
	Pl.1	0,3M5d	7,3995	77	R <sub>1-t6</sub>
	Pl.2	0,3M5d	7,3770	77	R <sub>1-t5</sub>
	Pl.9	0,3M5d	3,7536	42	R <sub>1-t31</sub>
	Testigo	-	3,8568	43	C
147	Pl.7	H <sub>2</sub> O7d	3,7420	42	-
	Pl.8	H <sub>2</sub> O7d	3,7457	42	-
	Pl.6	0,3M7d	3,7246	42	-
	Testigo	-	3,8462	43	-

(\*) Número de cromosomas estimado a partir de la ecuación del modelo “ $y = 6,0501 + 9,6522 x$ ”, donde  $x$  es el valor de ADN nuclear determinado con el citómetro de flujo expresado en picogramo (pg). Genotipo apomíctico utilizado como dador de anteras (Testigo). (\*\*) El nivel de ploídia fue confirmado mediante el recuento cromosómico. Trat.: pre-tratamiento. Control: macollas sin pre-tratamiento. R<sub>1</sub>, plantas de buffelgrass llevadas a una parcela experimental para realizar las evaluaciones fenotípicas y utilizadas en la puesta a punto de los marcadores *ISSRs*.



**Fig. 4.2.** (a) Metafase somática del material NR 51 (planta dadora de anteras) demostrando 43 cromosomas. (b) Metafase somática del individuo Pl.6 H2O5d ( $2n = 42$ ) regenerado *vía* embriogénesis somática mediante el cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass.

#### **Secuencias inter-microsatélites (*ISSRs*).**

Los marcadores moleculares *ISSRs* generaron productos de amplificación en las muestras de ADN extraídas de plantas de buffelgrass. De un total de 26 cebadores probados, 22 de ellos amplificaron bandas nítidas y reproducibles en seis plantas que mostraron inestabilidad genética mediante la técnica CMF y el material dador de anteras (NR 51). El tamaño de las bandas oscilaron entre 150 y 3000 pb aproximadamente (Anexo: Fig. 7.1, 7.2, 7.3 y 7.4).

En la Tabla 4.4 se muestra un análisis descriptivo de datos de amplificación obtenidos con los cebadores *ISSRs*. En total generaron 460 bandas, de las cuales, 58 fueron polimórficas (12%). Se detectaron 15 cebadores polimórficos (68%), con una proporción del 4 al 40%. Los RAF16 (0,32), ISSR8C (0,24), UBC840A (0,24) e ISSR1C (0,23) fueron los cebadores que produjeron el más alto contenido de información polimórfica. De ellos, el ISSR1C y el UBC840A fueron los que tuvieron mayor proporción de loci polimórficos (0,38 y 0,34, respectivamente). La mayoría de los *ISSRs* polimórficos (RAF4, UBC834, ISSR8C, 17899, UBC827, UBC840A, ISSRC1, UBC816, ISSR4C) generaron los dos tipos de datos esperados (ausencia y presencia de alelo). Sin embargo, algunos cebadores sólo

mostraron ausencia de alelo (AE<sub>2</sub>, UBC864, ISSR4E y RAF16) mientras que ISSR9C mostró presencia de nuevos alelos (Anexo: Fig. 7.1, 7.2, 7.3 y 7.4).

Tabla 4.4. Número de bandas polimórficas (BP), número de bandas monomórficas (BM), número de bandas totales (BT), proporción de bandas polimórficas (PMF(95)), contenido de información polimórfica (PIC) y porcentaje de amplificación (AMP) generados por las secuencias inter-microsatélites (*ISSRs*) utilizadas para la diferenciación molecular en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

<i>ISSRs</i>	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	AMP
17899	2	19	21	0,10	0,21	95
AE <sub>2</sub>	1	25	26	0,04	0,21	99
D 12	0	20	20	0,00	sd	100
HB 14	0	3	3	0,00	sd	100
HB13	0	25	25	0,00	sd	100
ISSR1E	1	9	10	0,10	0,21	99
ISSR4C	6	9	15	0,40	0,21	85
ISSR8C	5	23	28	0,18	0,24	92
ISSR9E	0	21	21	0,00	sd	100
ISSR9C	1	24	25	0,04	0,21	97
ISSR1C	11	18	29	0,38	0,23	84
RAF4	4	11	15	0,27	0,21	91
RAF9	0	11	11	0,00	sd	100
RAF16	1	25	26	0,04	0,32	99
UBC816	3	25	28	0,11	0,21	96
UBC825	0	21	21	0,00	sd	100
UBC827	5	21	26	0,19	0,21	92
UBC834	2	19	21	0,10	0,21	95
UBC840A	11	21	32	0,34	0,24	89
UBC840B	4	22	26	0,15	0,21	92
UBC850A	0	17	17	0,00	sd	100
UBC864	1	13	14	0,07	0,21	99

Para comprender el grado de similitud que hay en los perfiles moleculares de los individuos regenerados *in vitro* (R<sub>1</sub>) respecto al testigo (NR 51), se realizaron estudios de asociación y análisis de distancias a partir de los 22 *ISSRs* que amplificaron. Los resultados obtenidos a partir de la transformación ( $\sqrt{1-S}$ ) del índice de similitud de Jaccard indican que los coeficientes de distancia varían del 0,05 al 0,24 (5 al 24%, respectivamente) entre las plantas regeneradas *in vitro* versus el testigo (Tabla 4.5). Cuando se analiza sólo los coeficientes en las plantas regeneradas *in vitro*, se observa que

los coeficientes varían del 0,11 al 0,29 (11 al 29%, respectivamente). Estos valores indican que no solo existe divergencia con respecto al testigo, sino que además se observan diferencias entre las plantas regeneradas *in vitro*.

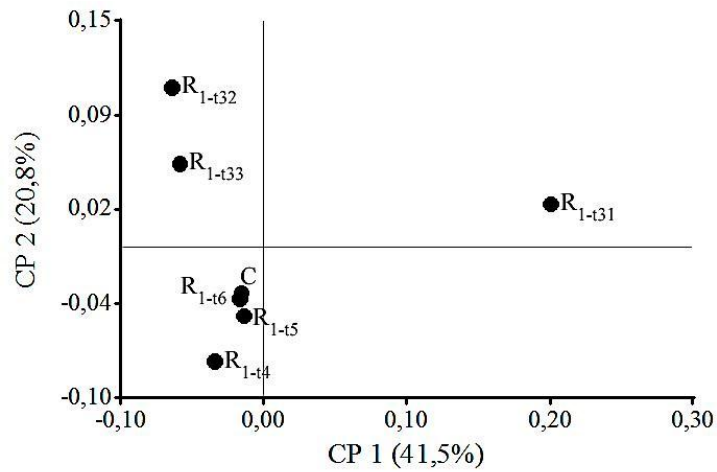
Tabla 4.5. Matriz de distancia de seis plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass y el genotipo NR 51 (C), obtenida de la transformación ( $\sqrt{1-S}$ ) del índice de similitud de Jaccard a partir del análisis generado con 22 cebadores *ISSRs*.

	C	R <sub>1-t31</sub>	R <sub>1-t32</sub>	R <sub>1-t33</sub>	R <sub>1-t4</sub>	R <sub>1-t5</sub>	R <sub>1-t6</sub>
C	0						
R <sub>1-t31</sub>	0,24	0					
R <sub>1-t32</sub>	0,18	0,29	0				
R <sub>1-t33</sub>	0,18	0,29	0,22	0			
R <sub>1-t4</sub>	0,14	0,27	0,21	0,21	0		
R <sub>1-t5</sub>	0,12	0,25	0,19	0,2	0,16	0	
R <sub>1-t6</sub>	0,05	0,23	0,18	0,17	0,13	0,11	0

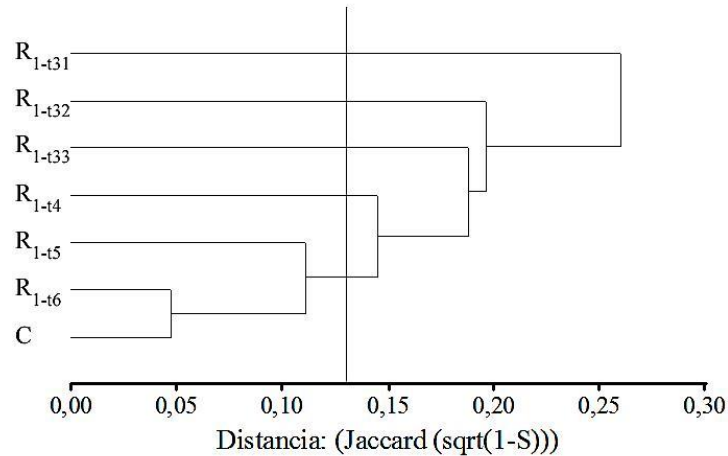
C, Genotipo apomítico utilizado como dador de anteras “control” y plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass (R<sub>1-t4</sub>, R<sub>1-t5</sub>, R<sub>1-t6</sub>, R<sub>1-t31</sub>, R<sub>1-t32</sub> y R<sub>1-t33</sub>).

En cuanto al análisis de coordenadas principales (EMD), los resultados demuestran que los tres primeros componentes (CPs) explican el 82% de la varianza total acumulada (Anexo: Tabla 7.2). La grafica de los componentes principales de mayor peso (CP 1 y CP 2) (Fig. 4.3), los cuales explican casi un 62% de variabilidad total, muestra dos grupos, uno constituido por un único genotipo (R<sub>1-t31</sub>) que resultó ser el más diferente de los materiales regenerados *in vitro* (CP 1). En base a la coordenada CP 2, se distinguen dos grupos, uno de ellos incluye al material usado como dador de anteras o testigo (C), mientras que el otro incluye dos materiales que fueron diferentes del resto (R<sub>1-t32</sub> y R<sub>1-t33</sub>).

Los resultados que presenta el dendrograma generado por el método de agrupamiento UPGMA (Fig. 4.4) fueron similares a lo observado por el EMD. Dicho análisis presentó un coeficiente de correlación cofenética de 0,97. La única diferencia con el EMD es que, considerando como criterio de corte arbitrario una distancia de 0,13 (50% de la distancia máxima), el individuo R<sub>1-t4</sub> se separa del grupo que incluye al testigo (C) y a los individuos R<sub>1-t5</sub> y R<sub>1-t6</sub> (plantas que presentaron aproximadamente el doble del contenido de ADN nuclear).



**Fig. 4.3.** Biplot de seis plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass (R<sub>1-t4</sub>, R<sub>1-t5</sub>, R<sub>1-t6</sub>, R<sub>1-t31</sub>, R<sub>1-t32</sub> y R<sub>1-t33</sub>) y el genotipo NR 51 utilizado como testigo (C), obtenido de la transformación (sqrt(1-S)) del índice de similitud de Jaccard a partir del análisis generado con 22 cebadores *ISSRs*.



**Fig. 4.4.** Dendrograma de seis plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass (R<sub>1-t4</sub>, R<sub>1-t5</sub>, R<sub>1-t6</sub>, R<sub>1-t31</sub>, R<sub>1-t32</sub> y R<sub>1-t33</sub>) y el genotipo NR 51 utilizado como testigo (C), obtenido por el método UPGMA sobre una matriz de distancia conformada a partir de la transformación (sqrt(1-S)) del índice de similitud de Jaccard.



## Evaluación fenotípica

De las seis plantas que fueron trasplantadas a campo ( $R_1$ ), una de ellas no sobrevivió y las cinco restantes, presentaron características morfológicas muy diferentes con respecto al NR 51. Las plantas  $R_{1-15}$  y  $R_{1-16}$ , cuyo contenido de ADN nuclear aumentó, mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en cuatro variables morfológicas, tales como AFP, LINT, AT y RAM (Tabla 4.6). La menor longitud inter-nodal (LINT), sin modificar el número de entrenudos (NUD), hacen que estas plantas sean achaparradas (menor AFP). Además, las plantas poseen una menor cantidad de ramificaciones (RAM). El material  $R_{1-15}$  presenta escasas inflorescencias y en el otro ( $R_{1-16}$ ), una menor longitud de las mismas (LINF) ( $P < 0,05$ ). Ambos materiales producen pocas semillas (resultados no mostrados). El material  $R_{1-16}$  también presentó una disminución en LLHB, ALHB y LVHB ( $P < 0,05$ ).

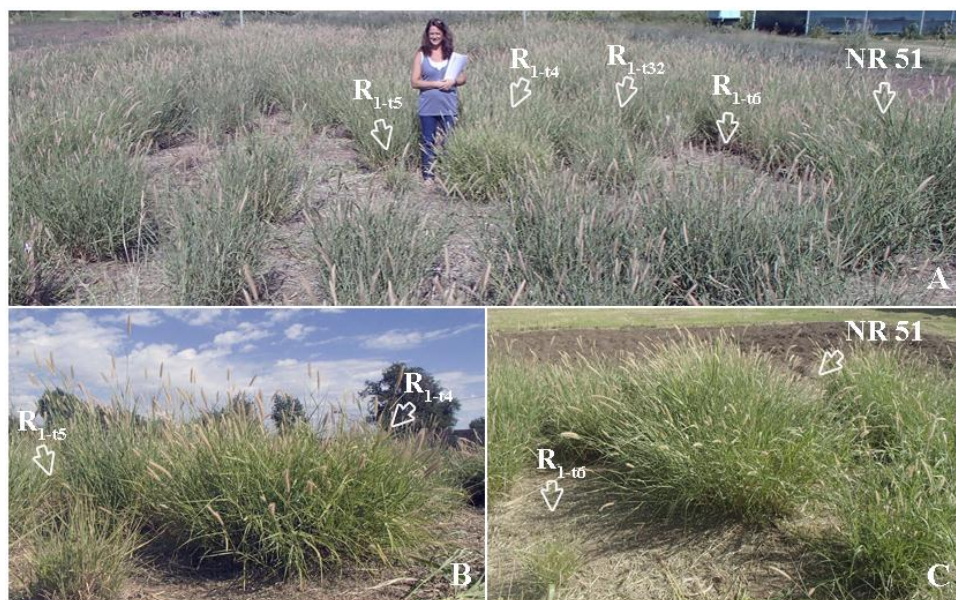
Las plantas que perdieron ADN nuclear ( $R_{1-14}$ ,  $R_{1-132}$  y  $R_{1-133}$ ), también crecieron con características fenotípicas estadísticamente diferentes respecto al testigo ( $P < 0,05$ ) (Tabla 4.6). Todas presentaron una disminución en la AFP. La planta  $R_{1-14}$ , presentó una disminución en el ALHB (hojas más finas), en LINF, LINT, AT. El material  $R_{1-132}$ , también presentó inflorescencias más pequeñas (LINF), menor LPE y LINT. El material  $R_{1-14}$  tiene la particularidad de presentar un color del follaje más claro (Fig. 4.6).

Los materiales  $R_{1-133}$  y  $R_{1-15}$  produjeron escasas inflorescencias, por lo cual no se pudieron analizar las variables relacionadas en morfología de panoja (LLHB, ALHB, LVHB, LINF, LPE, LPEE y FL/RA) y fueron excluidas del análisis de conglomerados (Fig. 4.6). Según los resultados de este análisis, se puede observar que el genotipo NR 51 es fenotípicamente diferente a las plantas regeneradas *in vitro* ( $R_1$ ). En el dendograma se observa que el grupo que incluye los materiales que perdieron un cromosoma ( $R_{1-32}$ ,  $R_{1-14}$  y  $R_{1-133}$ ) son los que más se asemejan al material NR 51 y los más distintos son los materiales  $R_{1-15}$  y  $R_{1-16}$ .

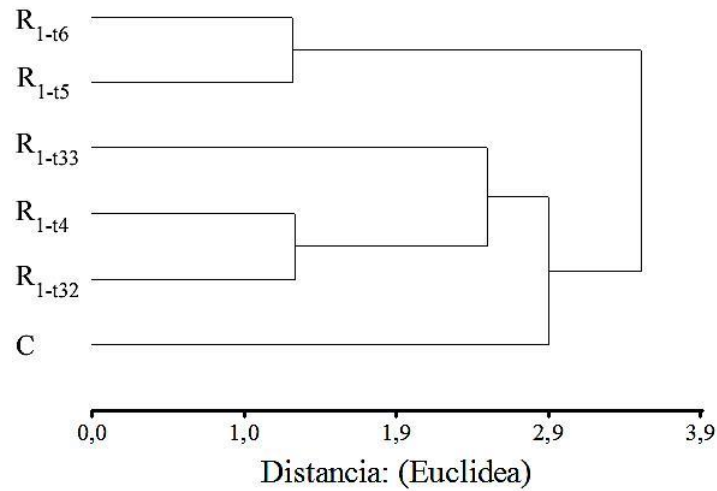
Tabla 4.6. Caracteres de morfología externa de hoja, tallo y panoja analizados en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

Material	LLHB (cm)	ALHB (cm)	LVHB (cm)	AFP (cm)	LINF (cm)	LPE (cm)	LPEE (cm)	LINT (cm)	AT (mm)	NUD (n°)	RAM (n°)	FL/RA (n°)
NR 51	33,3	1,2	7,2	126,8	11,9	19,4	8,3	10,76	3,9	9,8	6,8	2,4
R <sub>1-t32</sub>	31,0	1,3	6,2	102,5*	7,75*	15*	5,6	6,02*	3,2	9,2	6,2	2,8
R <sub>1-t33</sub>	-	-	-	105,75*	-	-	-	6,33*	2,7	12,5	7,7	-
R <sub>1-t4</sub>	28,7	0,87*	6,4	92,8*	8,5*	17,5	8,7	7*	2,41*	9,6	5,6	3,4
R <sub>1-t5</sub>	-	-	-	57,4*	-	-	-	4*	2,06*	10,0	2,8*	-
R <sub>1-t6</sub>	22,4*	0,7*	3,2*	64,2*	6,3*	15,2	6,4	4,5*	2,14*	8,4	3,6*	1,0

(\*) Indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en los caracteres morfológicos analizados de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51). Material, plantas R<sub>1</sub> regeneradas *in vitro*. Variables morfológicas: longitud de lámina de hoja bandera (LLHB), ancho de lámina de hoja bandera (ALHB), longitud de vaina (LVHB), altura final de planta (AFP), longitud de inflorescencia (LINF), longitud total del pedúnculo floral (LPE), longitud del pedúnculo excerto (LPEE), longitud inter-nodal (LINT), ancho tallo (AT), número de nudos (NUD), número de ramas (RAM) y número de flores/ramas (FL/RA).



**Fig. 4.5.** Parcela experimental de plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. A. Somaclones con fenotipos diferentes al genotipo dador de anteras (NR 51). B y C, detalle de A.



**Fig. 4.6.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de cinco marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclídea como medida de proximidad. Plantas  $R_{1-t4}$ ,  $R_{1-t5}$ ,  $R_{1-t6}$ ,  $R_{1-t32}$  y  $R_{1-t33}$  regeneradas *in vitro* ( $R_1$ ) de buffelgrass. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,938.

## DISCUSIÓN

Diferentes técnicas de análisis de ADN nuclear comprobaron variaciones genéticas en un grupo de plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. La detección de plantas con menor contenido de ADN nuclear podría indicar la existencia de plantas ADN aneuploides (Jin *et al.*, 2008). Este supuesto se basa en que muchos de los cambios detectables por CMF están asociados con variaciones en el número de cromosomas (Clarindo *et al.*, 2008; Currais *et al.*, 2013). En este trabajo, se detectó disminución en el contenido de ADN nuclear en plantas regeneradas *in vitro* respecto de plantas dadoras de anteras en los materiales NR 51 (3,31% al 1,6%) y NR 147 (3,16 al 2,6%). Estas variaciones podrían ser suficientes para indicar la pérdida completa o parte de un cromosoma (Pfosser *et al.*, 1995; Roux *et al.*, 2003). De hecho, el recuento cromosómico en una de estas plantas (individuo

R<sub>1-14</sub>) confirmó este supuesto, por lo tanto, es posible que las demás plantas que presentaron menor contenido de ADN nuclear hayan sufrido el mismo cambio.

Adicionalmente, los estudios realizados por CFM permitieron detectar plantas con valores próximos al doble en el contenido de ADN nuclear, lo que sugiere que estos materiales han sufrido un proceso de poliploidización *in vitro* (Barow y Jovtchev, 2007). El aumento en el nivel de ADN ploidía es una variación observada con frecuencia durante el proceso de embriogénesis somática; sin embargo, es difícil aludir la presencia de este fenómeno a un único factor (May y Sink, 1995; Tremblay *et al.*, 1999; Endemann *et al.*, 2001; Lim y Loh, 2003; Clarindo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008). En el presente estudio, el aumento en el contenido de ADN nuclear ocurrió en sólo dos plantas de NR 51 provenientes de macollas que estuvieron durante cinco días con los tallos sumergidos en manitol (Capítulo 3). No obstante, no se detectó este fenómeno en los restantes pre-tratamientos realizados. El porcentaje de poliploidización fue del 4,7% (total de plantas analizadas) lo que concuerda con los valores de poliploidización mencionados *vía* embriogénesis somática en otras especies (Kubaláková *et al.*, 1996; Endemann *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2010). Por estas razones, y considerando que no existió efecto significativo en la modificación del contenido de ADN nuclear con respecto al pre-tratamiento, es posible que los estreses aplicados a las macollas no sean los responsables de la poliploidización.

Si bien el genotipo o los días *in vitro* son factores que se mencionan por predisponer el incremento en la frecuencia de aparición de plantas ADN poliploides o incluso ADN aneuploides (Tremblay *et al.*, 1999; Endemann *et al.*, 2001; Currais *et al.*, 2013), en este trabajo no se observó asociación significativa con dichos factores ni con los pre-tratamientos realizados. Por lo tanto, es posible que los cambios observados en el contenido de ADN nuclear pudieran estar ocasionados por el efecto de los reguladores de crecimiento utilizados en el medio de cultivo. En este sentido, podría estar involucrada la auxina sintética 2,4-D, ya que ha demostrado ser un factor que predispone cambios en el genoma de plantas regeneradas *in vitro* (May y Sink, 1995; Clarindo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008). Serían de utilidad ensayos adicionales para comprobar el posible rol de este

regulador de crecimiento como factor predisponente de las variaciones en el contenido de ADN nuclear, así como ANA o BAP que han sido utilizados y mencionados también como posibles agentes mutagénicos (Lim y Loh, 2003; Mishiba *et al.*, 2006; Barow y Jovtchev, 2007).

El empleo de los marcadores *ISSRs* permitió detectar perfiles moleculares diferentes en las plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass, lo que sugiere algún tipo de variabilidad (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994). La información disponible sobre el uso de este tipo de marcadores en estudios relacionados con variación somaclonal en buffelgrass es escasa. A su vez, los estudios realizados con *ISSRs* en otras especies propagadas *in vitro* reportan niveles polimórficos muy diferentes. Por ejemplo, se mencionan niveles del 50% en variantes de *Camellia sinensis* L. (Thomas *et al.*, 2006) o niveles menores, del 5 al 3,9% en micro-propagaciones de *Musa* spp. y *Dictyospermum ovalifolium*, respectivamente (Ray *et al.*, 2006; Chandrika *et al.*, 2008). En el presente trabajo, se encontró que el total de loci polimórficos fue del 12%, similar al observado en *Codonopsis lanceolata* (15,7%) o en clones de *Camellia* spp. (12,8%) (Devarumath *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2006). Asimismo, el polimorfismo generado permitió detectar un grado de divergencia del 5 al 24% respecto al patrón “testigo”, tal como se observó en somaclones de *Zea mays* L. (Osipova *et al.*, 2003).

Con respecto a los resultados obtenidos con *ISSRs*, se observaron productos de amplificación con los cebadores que contienen secuencias di-, tri- o tetra-nucleótidos, con o sin nucleótidos adicionales en el extremo 3'. Si bien la mayoría de los *ISSRs* produjeron bandas con la metodología implementada en el presente trabajo, algunos de ellos no amplificaron. Estos cebadores fueron probados a temperaturas de hibridación inferiores, ya que se menciona que los patrones moleculares son altamente modificados por este factor (Garayalde *et al.*, 2011). A pesar de ello, algunos de estos *ISSRs* no lograron amplificar. Sería factible utilizar temperaturas inferiores (Gupta *et al.*, 1994) o considerar otros factores adicionales que no fueron objeto de estudio del presente trabajo (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Fang y Roose 1997; Bornet y Branchard 2001).

Los cebadores más informativos fueron aquellos que contenían secuencias (GA)<sub>8</sub> y (GACA)<sub>4</sub>, con el agregado de uno o tres nucleótidos en el extremo 3'. Similares resultados fueron descriptos en un estudio realizado para determinar diversidad genética en poblaciones silvestres de buffelgrass (Gutierrez-Ozuna *et al.*, 2009). Por lo tanto, los resultados de este trabajo confirman que los motivos (GA)<sub>n</sub> y los anclajes en el extremo 3' pueden ser incluidos en los cebadores *ISSRs* empleados para diversos estudios de esta especie.

En cuanto al polimorfismo detectado por los *ISSRs* en las plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass, es posible que se deba a cambios genéticos generados en una porción restringida del genoma. Este supuesto se basa en que los microsatelites y sus bases continuas son el sitio de hibridación del cebador (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Esta porción del genoma suele sufrir cambios durante el proceso de replicación-reparación del ADN (Levinson y Gutman, 1987; Schlötterer, 2000) y algunos autores sugieren que el polimorfismo generado puede deberse a deleciones o inserciones que se producen en el lugar de reconocimiento del cebador (Leroy *et al.*, 2001; Osipova *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006). Independientemente del tipo de mutación que se produzca, éstas pueden generar pérdida o ganancia de alelos (Reddy *et al.*, 2002), tal como se muestra en el presente trabajo. Estas observaciones sugieren que además de los cambios detectados en los niveles de ADN ploídía, las plantas regeneradas *in vitro* también podrían haber sufrido mutaciones puntuales en el genoma. Es posible que estos cambios restringidos a unos pocos nucleótidos no puedan ser detectados con la metodología de CMF empleada en el presente trabajo. Esta sería la razón por la cual tanto los marcadores moleculares *ISSRs* como la técnica CFM deberían ser incluidas para explorar variaciones genéticas en el cultivo *in vitro* de buffelgrass.

Finalmente, las plantas trasplantadas a campo manifestaron características morfológicas muy diferentes entre ellas y con respecto al testigo, confirmando de esta manera cambios en el fenotipo. Estos estudios demuestran claramente que un grupo de plantas de buffelgrass regeneradas *in vitro* (9,3%) presentaron cambios genéticos y

morfológicos respecto al material dador de anteras, lo que sugiere una fuente de variación somaclonal (Larkin y Scowcroft 1981; Jain *et al.*, 2001).

Por lo antes expuesto, se sugiere continuar con los estudios citológicos para corroborar el citotipo de algunas de estas plantas, así como en aquellas que duplicaron el contenido de ADN nuclear. Con respecto a las plantas que sufrieron poliploidización *in vitro*, los resultados obtenidos en el valor 2C sugieren un nuevo nivel de ADN ploidía no mencionado en la especie (Fisher *et al.*, 1954, Hignight *et al.*, 1991; Burson *et al.*, 2012; Kharrat-Souissi *et al.*, 2012). Si bien estas plantas poseen un aspecto muy achaparrado, podrían utilizarse en estudios relacionados con alteraciones fenotípicas asociadas a los cambios en los niveles de ploidía (Chable *et al.*, 2009).

## CONCLUSIONES

La técnica CFM permitió detectar inestabilidad genética en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

El empleo de marcadores moleculares *ISSRs* detectó perfiles moleculares diferentes en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

Los marcadores morfológicos son buenos indicadores de cambios genéticos en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

Un 9,3% de plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass, *vía* embriogénesis somática y utilizando anteras como explanto, presentan variación somaclonal, puesto que tienen cambios genéticos y morfológicos respecto al material dador de anteras.



## BIBLIOGRAFÍA

- Al-Soqeer A. 2011. Genotypic diversity among wild populations of Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L. Link) in Al-Qassim region. *Asian Journal of Biotechnology* 3(3): 262-268.
- Balzarini M. y Di Rienzo J. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Bairu M. W., Aremu A. O. and Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63(2): 147-173.
- Bhatia R., Singh K. P., Jhang T. and Sharma T. R. 2009. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 119(2): 208-211.
- Bhattacharya S., Bandopadhyay T. K., and Ghosh P. D. 2010. Somatic embryogenesis in *Cymbopogon pendulus* and evaluation of clonal fidelity of regenerants using ISSR marker. *Scientia horticulturae* 123(4): 505-513.
- Barow M. and Jovtchev G. 2007. Endopolyploidy in plants and its analysis by flow cytometry. In: Dolezel J., Greilhuber J., Suda J. (eds) *Flow cytometry with plant cells*. Wiley, Weinheim, pp 349-372.
- Bornet B. and Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19(3): 209-215.
- Burson B. L., Actkinson J. M., Hussey M. A. and Jessup R. W. 2012. Ploidy determination of buffelgrass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. *South African Journal of Botany* 79: 91-95.
- Carra A., Sajeve M., Abbate L., Siragusa M., Sottile F. and Carimi F. 2012. In vitro plant regeneration of caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109(2): 373-381.
- Chable V., Rival A., Beulé T., Jahier J., Eber F., Cadot V., Boulineau F., Salmon A., Bellis H. and Manzaneres-Dauleux M. J. 2009. "Aberrant" plants in cauliflower: 2. Aneuploidy and global DNA methylation. *Euphytica* 170(3): 275-287.
- Chandrika M., Rai V. R. and Kini K. R. 2008. Assessment of genetic stability of in vitro grown *Dictyospermum ovalifolium*. *Biologia Plantarum* 52(4): 735-739.
- Clarindo W. R., de Carvalho C. R., Araújo F. S., de Abreu I. S. and Otoni W. C. 2008. Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 207-214.
- Currais L., Loureiro J., Santos C. and Canhoto J. M. 2013. Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114(2): 149-159.
- Devarumath R., Nandy S., Rani V., Marimuthu S., Muraleedharan N. and Raina S. 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Reports* 21(2): 166-173.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C. W. 2012. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (<http://www.infostat.com.ar>).

- Doležel J., Greilhuber J. and Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233-2244.
- Endemann M., Hristoforoglu K., Stauber T. and Wilhelm E. 2001. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. *Biologia Plantarum* 44(3): 339-345.
- Fang D. Q. and Roose M. L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95(3): 408-417.
- Fisher W. D., Bashaw E. C. and Holt E. C. 1954. Evidence of apomixis in *Pennisetum ciliare* and *Cenchrus setigerus*. *Agronomy Journal* 46: 401-404.
- Garayalde A. F., Poverene M., Cantamutto M. and Carrera A. D. 2011. Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. *Annals of Applied Biology* 158(3): 305-317.
- Griffa S. M. 2002. Caracterización de una estirpe sexual y cultivares apomícticos de “buffelgrass” (*Cenchrus ciliaris* L.). M.Sc. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC, Córdoba, Argentina 163 pp.
- Griffa S., Ribotta A., López Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Luna C. and Grunberg K. 2010. Evaluation seedling biomass and its components as selection criteria for improving salt tolerance in Buffelgrass genotypes. *Grass and Forage Science* 65: 358-361.
- Griffiths A. J. F., Gelbart W. M., Miller J. H. 1999. *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman. Glossary. Publicado en Internet, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21325/> Activo Diciembre de 2015.
- Guo W. L., Gong L., Ding Z. F., Li Y. D., Li F. X., Zhao S. P. and Liu B. 2006. Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers. *Plant Cell Reports* 25(9): 896-906.
- Gupta M., Chyi Y. S., Romero-Severson J. and Owen J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89(7-8): 998-1006.
- Gutierrez-Ozuna R., Eguiarte L. E. and Molina-Freaner F. 2009. Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare* L. Link) in north-western Mexico. *Journal of Arid Environments* 73(1):26-32.
- Hignight K. W., Bashaw E. C. and Hussey M. A. 1991. Cytological and morphological diversity of native apomictic buffelgrass. *Botanical Gazette* 152: 214-218.
- Jain S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
- Jin S., Mushke R., Zhu H., Tu L., Lin Z., Zhang Y. and Zhang X. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports* 27: 1303-1316.
- Kaeppler S. M., Kaeppler H. F and Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188.
- Kharrat-Souissi A, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, Chaieb M (2012) Cytogeography of *Cenchrus ciliaris* (Poaceae) in Tunisia. *Folia Geobotanica* 48: 95-113
- Kubaláková M., Dolezel J. and Lebeda A. 1996. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. *Biologia Plantarum* 38: 475-480.

- Larkin P. J. and Scowcroft S. C. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197–214.
- Leal F., Loureiro J., Rodriguez E., Pais M. S., Santos C. and Pinto-Carnide O. 2006. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Reports* 25: 978-985.
- Leroy X. J., Leon K., Hily J. M., Chaumeil P. and Branchard M. 2001. Detection of in vitro culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 102(6-7): 885-891.
- Levinson G., and Gutman G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4(3): 203-221.
- Lim W. L. and Loh C. S. 2003. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist* 159: 279-287.
- López Colomba E., Prina A., Griffa S., Ribotta A. N., Carloni E., Tommasino E., Luna C., Biderbost E. and Grunberg K. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and in vitro selection. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 80: 59-64.
- López Colomba E., Tommasino E., Luna C., Griffa S., Carloni E., Ribotta A., Quiroga M. and Grunberg K. 2013. Differential salt-stress response during germination and vegetative growth in in vitro selected somaclonal mutants of *Cenchrus ciliaris* L. *South African Journal of Botany* 87: 157-163.
- May R. A. and Sink K. C. 1995. Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of *Asparagus officinalis* L. *Plant Science* 108: 71-84.
- Mishiba K., Tawada K. and Mii M. 2006. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 83-88.
- Osipova E. S., Koveza O. V., Troitskij A. V., Dolgikh Y. I., Shamina Z. B. and Gostimskij S. A. 2003. Analysis of specific RAPD and ISSR fragments in maize (*Zea mays* L.) somaclones and development of SCAR markers on their basis. *Russian Journal of Genetics* 39(12): 1412-1419.
- Prado M. J., Rodriguez E., Rey L., González M. V., Santos C. and Rey M. 2010. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103: 49-59.
- Pfossen M., Amon A., Lelley T. and Heberle-Bors E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21: 387-393.
- 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.
- Ray T., Dutta I., Saha P., Das S., and Roy S. C. 2006. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85(1): 11-21.
- Roux N., Toloza A., Radecki Z., Zapata-Arias F. J. and Dolezel J. 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports* 21(5): 483-490.

- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109(6): 365-37.
- Thomas J., Vijayan D., Joshi S. D., Joseph Lopez S., and Raj Kumar R. 2006. Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats. *Journal of Biotechnology* 123(2): 149-154.
- Tremblay L., Levasseur C. and Tremblay F. M. 1999. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany* 86(10): 1373-1381.
- Viehmanna I, Bortlova Z, Vitamvas J, Cepkova P. H. Katerina K. Svobodova E. and Travnickova M. 2014. Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 102-106.
- Vaillancourt A., Nkongolo K. K., Michael P. and Mehes M. 2008. Identification, characterisation, and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes. *Euphytica* 159(3): 297-306.
- Winarto B., Rachmawati F., Pramanik D. and Teixeira da Silva J. A. 2011. Morphological and cytological diversity of regenerants derived from half-anther cultures of anthurium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 363-374.
- 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.

## CAPÍTULO 5

### SELECCIÓN *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO DE PLANTAS REGENERADAS DE BUFFELGRASS

#### INTRODUCCIÓN

Buffelgrass [*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.]. es una gramínea forrajera, distribuida principalmente en el noroeste argentino (NOA) (Tessi *et al.*, 2014). En esta gran región, la sequía es uno de los factores ambientales que limita el potencial de desarrollo de la especie (Conti *et al.*, 2009). Buffelgrass se reproduce principalmente por apomixis, razón por la cual, el procedimiento de hibridación convencional es dificultoso en los programas de mejoramiento (Hanna y Bashaw, 1987). La selección *in vitro* es una alternativa de mejora en la especie y brinda grandes posibilidades de integración en la obtención de nuevos materiales (López Colomba, 2009; López Colomba *et al.*, 2011; 2013). El proceso incluye la aplicación de herramientas biotecnológicas y ofrece la posibilidad de seleccionar materiales con tolerancia en caracteres asociados a diferentes estreses abióticos, tales como sequía.

La selección efectuada sobre los cultivos de células o tejidos se basa en la variación genética preexistente o inducida que se recupera a partir de células somáticas cultivadas *in vitro* (Larkin y Scowcroft, 1981). El método puede ser utilizado para obtener plantas con tolerancia a diferentes estreses; asumiendo que existe una correlación entre la respuesta de los mecanismos de tolerancia a nivel celular y los de plantas enteras (Mohamed *et al.*, 2000, Biswas *et al.*, 2002; Hemon y Sudarsono, 2010). Comúnmente, la metodología consiste en incorporar al medio de cultivo un agente de selección que ocasiona una situación de estrés y las plántulas capaces de sobrevivir son analizadas para determinar si expresan la tolerancia para el rasgo deseado (Jain, 2001).

Por lo general, los explantos pueden estar sometidos a diferentes situaciones de estrés, ya sea en forma directa o de manera gradual; es decir, que el agente selectivo se utilice en una dosis sub-letal o en concentraciones gradualmente incrementadas (Gangopadhyay *et al.*, 1997; Hassan *et al.*, 2004; Hemon y Sudarsono 2010; Mohamed e Ibrahim 2012; Hadi *et al.*, 2014). También, es importante tener en cuenta la etapa en la cual se aplica el agente de selección. Por un lado, se señala la aplicación del mismo durante la fase de inducción de callos (Biswas *et al.*, 2002; Errabii *et al.*, 2007; Aazami *et al.*, 2010; Hemon y Sudarsono 2010). Mientras que en otros trabajos, se menciona que la aplicación se practica en la etapa de regeneración o durante todas las etapas del cultivo *in vitro* de tejidos (Bidabadi *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2013).

Para simular la condición de estrés por sequía comúnmente se utiliza la adición de compuestos como manitol, sorbitol o polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo (Leone *et al.*, 1994; Gopal e Iwama, 2007; Joshi *et al.*, 2011; Mahmood *et al.*, 2012; Hadi *et al.*, 2014). Todos estos compuestos disminuyen el potencial hídrico del medio. Es importante señalar que las respuestas de los diferentes explantos o plantas regeneradas *in vitro* pueden estar influenciadas por efectos secundarios, ya sean morfológicos o fisiológicos, ocasionados por los compuestos que simulan la situación de estrés (Hohl y Schöpfer, 1991; Verslues *et al.*, 1998; Gopal e Iwama, 2007; Cha-um *et al.*, 2012). Es por ello, que además de corroborar si la selección *in vitro* es efectiva, todo proceso de selección debe ser seguido de un ensayo *ex vitro* que proporcione una medida exacta de la tolerancia al agente osmótico observada en el laboratorio (Remotti, 1998).

Las plantas que crecen en condiciones de déficit hídrico exhiben respuestas típicas a dichas situaciones, incluyendo alteraciones en el crecimiento entre otras (Moore *et al.*, 2004; Claeys *et al.*, 2014). Por ende, para medir la tolerancia de la planta en una situación de estrés se realizan mediciones de parámetros relacionados al crecimiento, como por ejemplo altura, peso fresco y peso seco (Verslues *et al.*, 2006). Otro fenómeno de ocurrencia común en plantas que crecen bajo distintos tipos de estreses es el estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004). En situaciones favorables para el crecimiento, se producen cantidades normales de especies activas del oxígeno (EAO), las cuales, son controladas por

un complejo sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático (Foyer *et al.*, 1994; Noctor y Foyer, 1998). El sistema mantiene un equilibrio de óxido-reducción evitando que las EAO se acumulen y produzcan daños sobre estructuras biológicas (Polle, 1997). La sequía es uno de los estreses abióticos que incrementan las EAO (Lascano *et al.*, 2001). Cuando el sistema de defensa antioxidante no logra inactivar el exceso de EAO, se producen daños oxidativos cuantificables, entre otros, a través de la medición del contenido de malondialdehído (MDA); que refleja el producto de la peroxidación de lípidos de membrana (Lanza Castelli *et al.*, 2010; Tommasino *et al.*, 2012; López Colomba *et al.*, 2013). Por otro lado, es posible evaluar el estado redox de la planta mediante la capacidad de reducir el hierro (FRAP) por parte del sistema de defensa antioxidante no enzimático (Benzie and Strain, 1996; Ou *et al.*, 2002). Tanto el MDA como el FRAP, son utilizados para identificar genotipos tolerantes en diferentes estreses (Lanza Castelli *et al.*, 2010; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010; Tommasino *et al.*, 2012; Pérez-Clemente y Gómez-Cadenas, 2012; López Colomba *et al.*, 2013).

Por lo antes expuesto, los objetivos del presente capítulo fueron: desarrollar un protocolo para la selección *in vitro* de buffelgrass en condiciones de sequía utilizando manitol como agente osmótico y evaluar las progenies de las plantas regeneradas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Se trabajó con el genotipo apomíctico NR 51 que se encuentra en la colección activa de buffelgrass asentada en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba - Argentina (Capítulo 2).

## **Selección *in vitro***

El proceso de selección *in vitro* se realizó a partir de anteras como explanto. La metodología utilizada en el sistema de regeneración, *vía* embriogénesis somática, fue descrita en el Capítulo 3. En las etapas de inducción y regeneración se utilizaron medios de cultivo a los cuales se adicionó manitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Esta incorporación fue realizada con la finalidad de modificar el potencial osmótico y a partir de ello, establecer una dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), que corresponde a la dosis a la cual subsiste el 50% de los explantos utilizados (Cubero, 2003).

### **DL<sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos**

Para la determinación de la DL<sub>50</sub> se adicionó al medio de inducción de callos embriogénicos (MI) manitol en concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 150 mM. Se ajustó el pH de cada MI a 5,8 y se les agregó agar (7 g/l) previo al autoclavado (20 min a 116°C). Las tres anteras procedentes de cada flor central (antecio fértil) se mantuvieron en grupo considerándolo un explanto. Las anteras cultivadas en MI sin manitol fueron consideradas como grupo control (0 mM de manitol). Los cultivos se colocaron en oscuridad a 25°C ± 2°C. Se colocaron 30 anteras por cajas de Petri (10 explantos) con siete repeticiones por tratamiento. Los callos se repicaron a los 45 días y se mantuvieron en la etapa de inducción durante un período de 90 días. Al término de este período, se midieron las variables peso fresco de callos embriogénicos (PFCE) y proporción de callos embriogénicos (PCE).

Posteriormente, los callos embriogénicos resultantes fueron individualmente transferidos a tubos de vidrio con medio de regeneración (MR) sin manitol (Capítulo 3), donde se evaluó la variable número de plantas regeneradas (NPR).



### **DL<sub>50</sub> en regeneración de plántulas**

Se utilizaron callos embriogénicos obtenidos a partir de anteras, cultivadas en MI sin manitol (Capítulo 3). A los 90 días de iniciado el período de inducción, los callos embriogénicos fueron transferidos individualmente a tubos de vidrio con medio de regeneración (MR). Al MR se le adicionó manitol en las siguientes concentraciones: 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 300 mM. Del mismo modo que al MI, se le ajustó el pH a 5,8, se solidificó con agar y se autoclavó. Los tubos se colocaron en condiciones controladas de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y fotoperíodo (16 h de luz y 8 h de oscuridad).

En esta etapa, se utilizaron 20 callos embriogénicos por tratamiento. Las plántulas regeneradas en MR sin manitol fueron consideradas como control (0 mM de manitol). Los callos embriogénicos se repicaron cada 60 días y se mantuvieron sobre el mismo medio durante 10 meses. Al término de este período, se evaluó la variable NPR.

### **DL<sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos y regeneración de plántulas**

Para determinar la DL<sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos y en regeneración de plántulas, se llevó a cabo el protocolo descrito anteriormente, con la diferencia que las concentraciones de manitol fueron mantenidas en ambos medios (MI y MR). Se utilizaron concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 150 mM de manitol. Los callos embriogénicos y plántulas regeneradas en sus respectivos medios sin manitol fueron considerados control (0 mM de manitol). Se utilizaron 30 anteras por caja de Petri (10 explantos) con cinco repeticiones por tratamiento. Al término del período de regeneración (10 meses) se evaluó la variable NPR.

## **Selección a campo por características deseables de plantas tolerantes *in vitro* a DL<sub>50</sub> en inducción, regeneración y la combinación de ambas etapas**

Todas las plántulas regeneradas se colocaron en medio de enraizamiento y rusticaron como se describe en el Capítulo 3. Luego, se trasplantaron a una parcela experimental de aproximadamente 400 m<sup>2</sup>. Las mismas, se distribuyeron al azar a una distancia de un metro entre ellas, tanto para filas como para hileras. Esta práctica permitió evaluar el fenotipo, seleccionar plantas (R<sub>1</sub>) y posteriormente cosechar semillas de cada una de ellas (S<sub>1</sub>). Conjuntamente, se introdujeron al azar plantas del genotipo NR 51 obtenidas de semillas (testigo).

Para la selección de las plantas se tuvieron en cuenta diferentes criterios. En primera instancia, se escogieron plantas que regeneraron de la DL<sub>50</sub> establecida en cada una de las etapas que incluye el proceso de selección *in vitro* (inducción, regeneración y en ambas etapas). Esta metodología de trabajo se utilizó para determinar cuál es la etapa más factible para realizar el proceso de selección, es decir, en inducción de callos embriogénicos, en regeneración de plántulas o en ambas etapas del proceso. Luego, se identificaron las plantas (R<sub>1</sub>) que mostraron características morfológicas diferentes al testigo (NR 51). Para ello, se realizaron observaciones fenotípicas y mediciones en caracteres morfológicos de hoja, tallo y panoja (Tabla 5.1) (Griffa, 2002; 2010). Las evaluaciones fueron realizadas durante dos campañas agrícolas (2013/14 y 2014/15). En cada planta se evaluaron 5 macollas que presentaban la inflorescencia totalmente emergida en estado inmaduro. Finalmente, en ambas estaciones de crecimiento se recolectaron semillas (S<sub>1</sub>) de los materiales vegetales seleccionados (R<sub>1</sub>). Las plantas que no produjeron suficiente cantidad de semillas o no rebrotaron luego del receso invernal, fueron excluidas del proceso de selección.

Tabla 5.1. Caracteres de morfología externa en hoja, tallo y panoja analizados en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

Carácter	Criterio de evaluación	Abreviatura
Longitud de lámina de hoja bandera (cm)	Se midió desde la lígula hasta el extremo distal de la lámina de la hoja bandera.	<b>LLHB</b>
Ancho de lámina de hoja bandera (cm)	Se midió a los 2 cm a partir de la base de la lígula.	<b>ALHB</b>
Longitud de vaina (cm)	Se midió desde la base de la lámina hasta el nudo precedente inferior.	<b>LVHB</b>
Altura final de planta (cm)	Se consideró la macolla más alta de la planta, desde la base de la macolla hasta la base de la inflorescencia.	<b>AFP</b>
Longitud de inflorescencia (cm)	Se midió desde la base de la inflorescencia al extremo distal.	<b>LINF</b>
Longitud total del pedúnculo floral (cm)	Se midió desde la base de la inflorescencia hasta el 1 <sup>er</sup> nudo.	<b>LPE</b>
Longitud del pedúnculo excerto (cm)	Se midió desde la base de la inflorescencia hasta la base de la hoja bandera.	<b>LPEE</b>
Longitud inter-nodal (cm)	Se midió la longitud entre el 3 <sup>er</sup> y 4 <sup>to</sup> nudo	<b>LINT</b>
Ancho tallo (mm)	Se midió el diámetro del tallo a los 2 cm por debajo del 3 <sup>er</sup> nudo.	<b>AT</b>
Número de nudos (n°)	Se contaron todos los nudos en el eje primario de la macolla.	<b>NUD</b>
Número de ramas (n°)	Se contaron todas las ramas que emergen del eje primario de la macolla.	<b>RAM</b>
Número de flores/ramas (n°)	Se contaron todas las inflorescencias en las ramas que emergen del eje primario de la macolla.	<b>FL/RA</b>

### **Evaluación de la tolerancia a estrés hídrico de la progenie (S<sub>1</sub>) de plantas regeneradas *in vitro* (R<sub>1</sub>)**

A partir de las semillas recolectadas (S<sub>1</sub>) de los materiales genéticos seleccionados, se realizaron los ensayos de estrés hídrico. Mediante esta práctica es posible distinguir tempranamente a genotipos con mejor comportamiento a dicho estrés (Tommasino, 2013). Para ello, se sembraron aproximadamente 250 semillas en macetas de 17,6L de volumen con 2,760 kg de sustrato (arena: tierra, relación 1:1), previamente secado en estufa por 48h a 90°C. Luego de la siembra, las macetas fueron regadas a saturación donde fue calculado el contenido hídrico del suelo (CHS). Las macetas fueron mantenidas en invernadero y

regadas diariamente hasta alcanzar el 80% del CHS. A los 30 días de la siembra, las macetas fueron llevadas a condiciones controladas de temperatura ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), fotoperiodo (16h de luz y 8h de oscuridad), humedad (40%) y luz ( $500 \text{ mol/m}^2/\text{s}$ ).

Las macetas al 80% de CHS fueron consideradas como control. En cambio, las macetas llevadas por suspensión de riego al 30% de CHS y mantenidas a dicho nivel, fueron consideradas como tratamiento (sequía). Se trabajó con un 30% de CHS ya que se determinó que a esa condición genotipos de buffelgrass manifiestan síntomas de déficit hídrico (Tommasino, 2013).

### **Caracteres de biomasa y fisiológicos**

En cada experimento, fueron realizadas dos repeticiones por material (dos macetas control - dos macetas tratamiento). A los 21 días de alcanzar el 30% de CHS fueron seleccionadas 10 plantas al azar por maceta, donde se evaluaron las siguientes variables: altura de planta, peso fresco (PF) y peso seco (PS) de parte aérea. Al mismo tiempo que fueron tomadas plantas para medir las variables asociadas a la producción de biomasa, se seleccionaron al azar otras diez plantas para evaluar el estado fisiológico de cada progenie ( $S_1$ ). A partir de estas se muestrearon segmentos foliares de 2 cm (aprox.) y se formaron tres grupos (*poles*) por tratamiento (control y sequía). Inmediatamente, los materiales vegetales fueron colocados en nitrógeno líquido y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la evaluación del estado fisiológico.

Para relacionar los cambios de crecimiento (altura, PF y PS de parte aérea) con aspectos fisiológicos asociados al efecto del estrés hídrico; se estimó el daño oxidativo a través del contenido de malondialdehído (MDA) según Heath and Packer (1968) modificado por Hodges *et al.*, (1999). Además, se cuantificó el contenido de antioxidantes no enzimáticos totales mediante la habilidad de reducir al hierro (FRAP) (Benzie y Strain, 1996) y el contenido de proteínas totales según Bradford (1976). Con las variables

evaluadas se calculó un índice del efecto generado por el estrés hídrico (I) respecto a la condición control según la siguiente fórmula:

$$I = \sum (x_i / X_c) / n$$

donde  $X_i$  es el valor de la variable fisiológica de cada individuo en condiciones de estrés hídrico,  $X_c$  es el valor promedio de la variable fisiológica del mismo material en condición control y  $n$  es el número de muestras.

### **Análisis estadístico**

El peso fresco de callos embriogénicos (PFCE) y la proporción de callos embriogénicos (PCE) se determinó a los 90 días de iniciado el cultivo *in vitro* de anteras (ICA). La PCE se calculó en relación al número de explantos sembrados por caja de Petri (10 explantos). El número de plántulas regeneradas (NPR) se registró durante todo el período de regeneración (10 meses) y se expresó por caja de Petri. Con la excepción de la etapa de selección *in vitro* en regeneración de plántulas (MI sin Manitol), donde el NPR se expresó como valor promedio (20 callos embriogénicos por tratamiento).

Para evaluar la eficiencia de inducción en función al peso fresco de callos embriogénicos (PFCE), se ajustaron modelos lineales generales y mixtos (MLGyM) considerando a los tratamientos como variable de clasificación.

Para evaluar la eficiencia de inducción y de regeneración, en función a la proporción de callos embriogénicos y de plantas regeneradas, respectivamente, se ajustaron dos modelos lineales generalizados mixtos (MLGM), considerando a los tratamientos como variable de clasificación. Para la variable PCE se utilizó distribución binomial con función de enlace logit, mientras que para la variable NPR se utilizó distribución Poisson con función de enlace log. En ambos casos se evaluaron las diferencias entre medias para

los tratamientos por el *test* Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) (Di Rienzo *et al.*, 2002).

Para determinar el grado de agrupamiento en los materiales regenerados *in vitro* ( $R_1$ ) y el material NR 51 se realizó análisis de conglomerados utilizando el método de encadenamiento promedio (UPGMA) aplicando la distancia Euclidea como medida de proximidad. El análisis se realizó utilizando caracteres de morfología externa de hoja, tallo y panoja (Tabla: 5.1).

A lo fines de corroborar variabilidad fenotípica en los materiales regenerados *in vitro* y seleccionados para el ensayo de estrés hídrico, se compararon mediante pruebas test *t* para muestras independientes las variables morfológicas ( $R_1$ ) con respecto a la planta dadora de antera (NR 51). Finalmente, para detectar diferencias en sus respuestas al crecimiento en el ensayo de estrés hídrico se evaluaron mediante pruebas test *t* las variables de biomasa (altura, PF y PS) y fisiológicas (MDA, FRAP y proteínas) de las progenies ( $S_1$ ) con respecto al testigo (NR 51).

Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

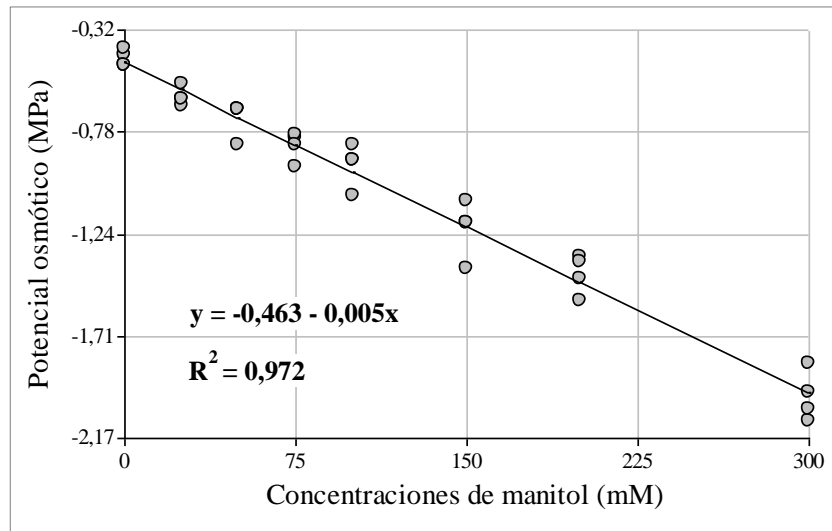
## **RESULTADOS**

### **Selección *in vitro***

En la figura 5.1 se presentan los diferentes niveles de potenciales osmóticos generados con siete concentraciones de manitol (Fig. 5.1). El medio Murashige y Skoog (MS) utilizado como control (0 mM de manitol), con 30 g/l de sacarosa, presentó un potencial osmótico de  $-0,45 \pm 0,04$ MPa. Mientras que la concentración más alta de manitol utilizada en el trabajo (300 mM) mostró un potencial de  $-1,98 \pm 0,11$  MPa.

Adicionalmente, se puede observar en la figura el impacto del manitol sobre el potencial osmótico alcanzado con las demás concentraciones empleadas (Fig. 5.1).

El genotipo NR 51 de buffelgrass tuvo capacidad de inducir callos embriogénicos en medio de inducción con o sin manitol. Los embriones somáticos fueron similares en forma y en capacidad de regeneración a lo descrito anteriormente (Capítulo 3), lo que valida el protocolo de embriogénesis somática desarrollado en la presente tesis. Sin embargo, el agregado del agente osmótico al medio produjo diferentes respuestas en las variables peso fresco de callos embriogénicos (PFCE), proporción de callos embriogénicos (PCE) y número de plantas regeneradas (NPR).



**Fig. 5.1.** Diagrama de dispersión que demuestra el análisis de regresión lineal entre el potencial osmótico (MPa) y las diferentes concentraciones de manitol (mM) en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). La ecuación del modelo ( $y = a + b x$ ) y el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) se observan dentro del gráfico. El potencial osmótico fue medido en MS sin agar, previo al autoclavado.

## **DL<sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos**

El análisis incluyó la transformación al logaritmo natural de los valores observados en el peso fresco de cada callo embriogénico (PFCE), debido al mejor ajuste del modelo. Para la dicha variable, los valores más altos se obtuvieron con una dosis de 25 mM de manitol (Tabla 5.2) y de acuerdo al análisis del MLGyM ( $P < 0,001$ ), éstos no se diferencian del control (0 mM de manitol). Las demás concentraciones de manitol tuvieron un efecto negativo, ya que se observó disminución en dicha variable. Con respecto a la PCE (Tabla 5.2), es interesante notar que la dosis más baja de manitol (25 mM) en el MI estimuló la respuesta de inducción de callos embriogénicos respecto del control ( $P < 0,001$ ). Para la variable NPR, la mayor cantidad de plántulas se obtuvo con una concentración de 25 mM, aunque los valores solo se diferenciaron estadísticamente del tratamiento que contiene 150 mM de manitol ( $P < 0,001$ ) (Tabla 5.2).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en PFCE, PCE y NPR, los valores más altos en las tres variables se obtuvieron con el tratamiento de 25 mM de manitol (Tabla 5.2). Según esta concentración, la DL<sub>50</sub> en inducción debería permitir obtener un PFCE de 0,0764g, una PCE de 0,26% y un NPR de 3, es decir, una reducción del 50% de los parámetros evaluados (DL<sub>50</sub>). El tratamiento que generó los valores más cercanos al requerido para alcanzar la DL<sub>50</sub> es el tratamiento con 100 mM de manitol. Dicho tratamiento produjo un valor de PFCE de  $0,0890 \pm 0,0137$ g, lo que representa un 57% del total alcanzado con el tratamiento de 25 mM de manitol. En cuanto a la variable PCE, los  $0,34\% \pm 0,04$  representan una reducción del 65%, mientras que en la concentración precedente (75 mM) o subsiguiente (150 mM), los niveles aumentan al 73% o se reducen al 19%, respectivamente. En cuanto a la variable NPR, los valores más cercanos a la DL<sub>50</sub> también se generan con 100 mM de manitol (58% del total). Si bien estos valores no se diferencian estadísticamente del tratamiento con 25 mM (Tabla 5.2), la concentración siguiente (150 mM) regeneró sólo una planta.

En función a las respuestas obtenidas para las variables PFCE, PCE y NPR, una concentración de 100 mM se aproxima a lo requerido para alcanzar la DL<sub>50</sub> en el medio de



inducción. Por lo tanto, la concentración de 100 mM de manitol en inducción se consideró como adecuada para la selección de plantas regeneradas *in vitro* (R<sub>1</sub>) en buffelgrass.

Tabla 5.2. Peso fresco de callos embriogénicos (PFCE), proporción de callos embriogénicos (PCE) y número de plántulas regeneradas (NPR) correspondientes al cultivo *in vitro* de anteras en un medio de inducción con diferentes concentraciones de manitol.

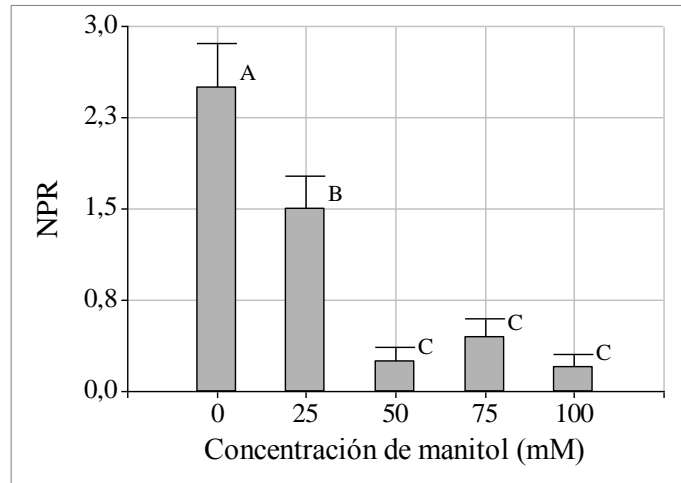
Manitol (mM)	PFCE		PCE		NPR				
	Medias	E.E.	Medias	E.E.	Medias	E.E.			
0	0,1529	0,0136	A	0,40	0,04	B	4,71	0,82	A
25	0,1541	0,0121	A	0,52	0,05	A	6,14	0,94	A
50	0,1225	0,0143	B	0,38	0,04	B	4,71	0,82	A
75	0,1008	0,0147	B	0,38	0,05	B	4,83	0,90	A
100	0,0890	0,0137	C	0,34	0,04	B	3,56	0,63	A
150	0,0126	0,0420	D	0,10	0,04	C	0,40	0,28	B

Tratamiento. Medio de inducción (MI) con 25, 50, 75, 100 y 150 mM de manitol. MI sin manitol (0 mM). Para la variable NPR, los callos embriogénicos fueron germinados en medio de regeneración sin manitol (Capítulo 3). Los valores promedios representan tres fechas de recolección de macollas. Letras diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de manitol ( $P \leq 0,05$ ). E.E. Error estándar.

### DL<sub>50</sub> en regeneración de plántulas

En la etapa de regeneración de plántulas se observó escasa respuesta en concentraciones superiores a 100 mM de manitol y sólo una plántula fue capaz de regenerar con el tratamiento de 150 mM. No se observaron plantas regeneradas *in vitro* en concentraciones de 200 y 300 mM. Por tal motivo, sólo se consideraron para los análisis estadísticos los valores obtenidos de plantas regeneradas con concentraciones que se encuentran entre 25 y 100 mM de manitol y el control (0 mM de manitol) (Fig. 5.2).

Cuando los callos se indujeron en el MI sin manitol, el máximo valor de NPR se obtuvo con medio de regeneración (MR) sin manitol ( $P < 0,001$ ). Todas las concentraciones de manitol en el MR disminuyeron el NPR (Fig. 5.2).



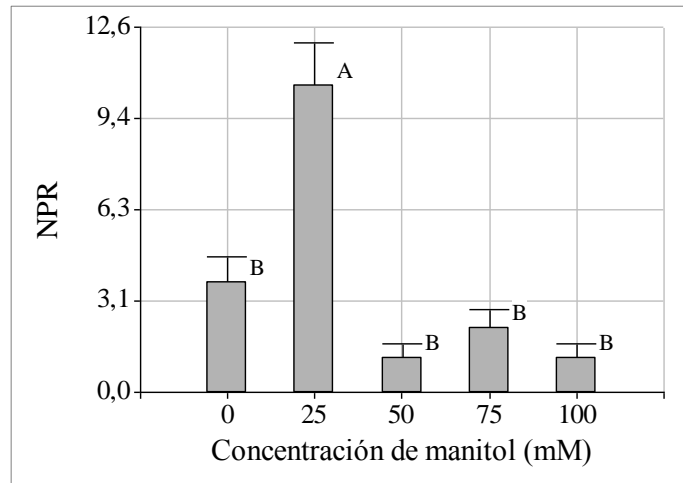
**Fig. 5.2.** Número de plántulas regeneradas (NPR) a partir del cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass. Los callos embriogénicos fueron inducidos en MI sin manitol y colocados en medio de regeneración (MR) con 0, 25, 50, 75 y 100 mM de manitol. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de manitol ( $P \leq 0,05$ ).

### **DL<sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos y regeneración de plántulas**

En la etapa de selección en el MI y MR con 150 mM no se observó respuesta en el NPR. Por tal motivo, al igual que en la etapa de selección en regeneración de plántulas, se consideraron para los análisis estadísticos los valores obtenidos con concentraciones que se encuentran entre 25 y 100 mM de manitol y el control (0 mM de manitol) (Fig. 5.3).

Cuando los callos embriogénicos se indujeron y regeneraron plántulas manteniendo las concentraciones de manitol (Fig. 5.3), el análisis del MLGM indicó que los valores máximos de NPR se obtienen con una concentración de 25 mM ( $P < 0,001$ ). Este valor se

diferenció significativamente de los demás tratamientos e incluso del medio utilizado como control.



**Fig. 5.3.** Número de plántulas regeneradas (NPR) a partir del cultivo *in vitro* de anteras de buffelgrass. Los callos embriogénicos fueron inducidos en medio de inducción y regeneraron plántulas en medio de regeneración (MR), ambos medios con 0, 25, 50, 75 y 100 mM de manitol. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de manitol ( $P \leq 0,05$ ).

#### **Determinación de $DL_{50}$ en función al NPR en un medio con manitol en regeneración y en ambas etapas del proceso (inducción y regeneración)**

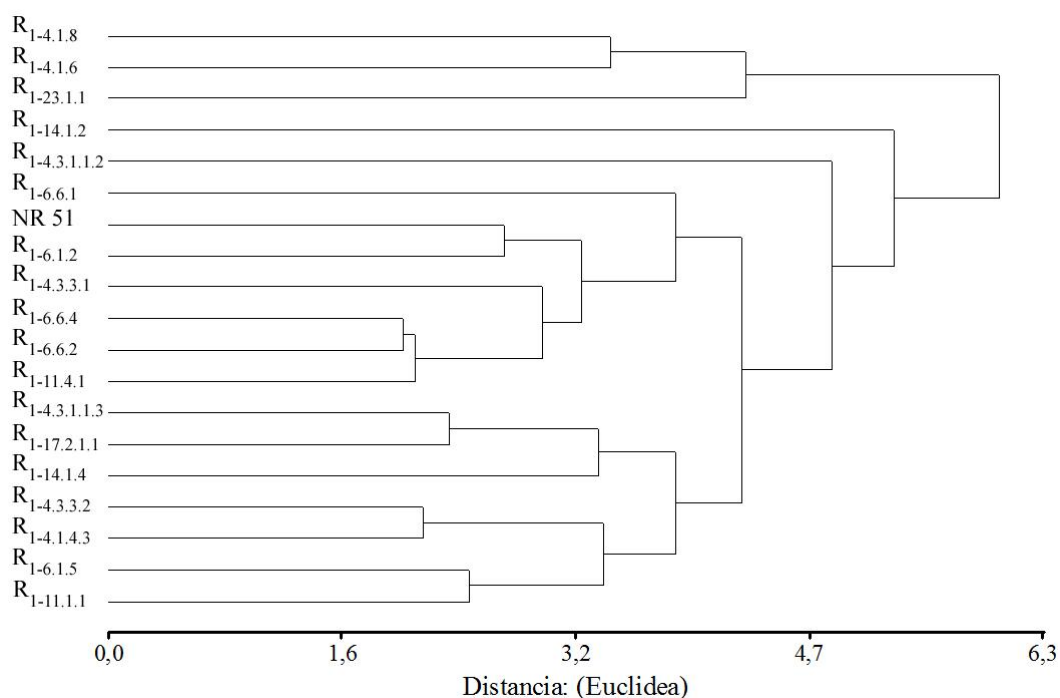
En función a las respuestas observadas en el NPR, cuando los callos embriogénicos provienen de un MI sin manitol, la  $DL_{50}$  debería permitir regenerar aproximadamente 1,25 plántulas (50% del total alcanzado). En este caso, el tratamiento que más se acerca a dicho valor es el de 25 mM manitol ( $1,50 \pm 0,27$ ). Sin embargo, cuando las concentraciones de manitol son mantenidas en ambos medios (MI y MR), el tratamiento con 25 mM se destaca entre todos ellos, ya que produce 10,6 plántulas. En este caso, la  $DL_{50}$  debería permitir regenerar aproximadamente 5,3 plántulas (50% del total). En la etapa de selección en MI y MR, todos los tratamientos se diferenciaron de la concentración que contiene 25 mM de manitol, pero ningún valor representa el porcentaje requerido para alcanzar la  $DL_{50}$ , ya que

todos aumentan la presión de selección: 11% el tratamiento de 50 mM, 21% el de 75 mM y 11% el de 100 mM de manitol.

Teniendo en cuenta los resultados observados en la variable NPR en la etapa de regeneración de plántulas y en la etapa de inducción de callos embriogénicos y regeneración de plántulas y; considerando el número de plantas regeneradas *in vitro* y el objetivo general de la tesis, se plantea aumentar la presión de selección. En la etapa donde los callos embriogénicos provienen de MI sin manitol, se sugiere escoger plantas que regeneraron en MR con concentraciones  $\geq$  de 75 mM. Mientras que cuando la dosis de manitol es mantenida en ambos medios (selección en MI y MR), se sugiere trabajar con plantas que regeneraron del tratamiento con 100 mM de manitol.

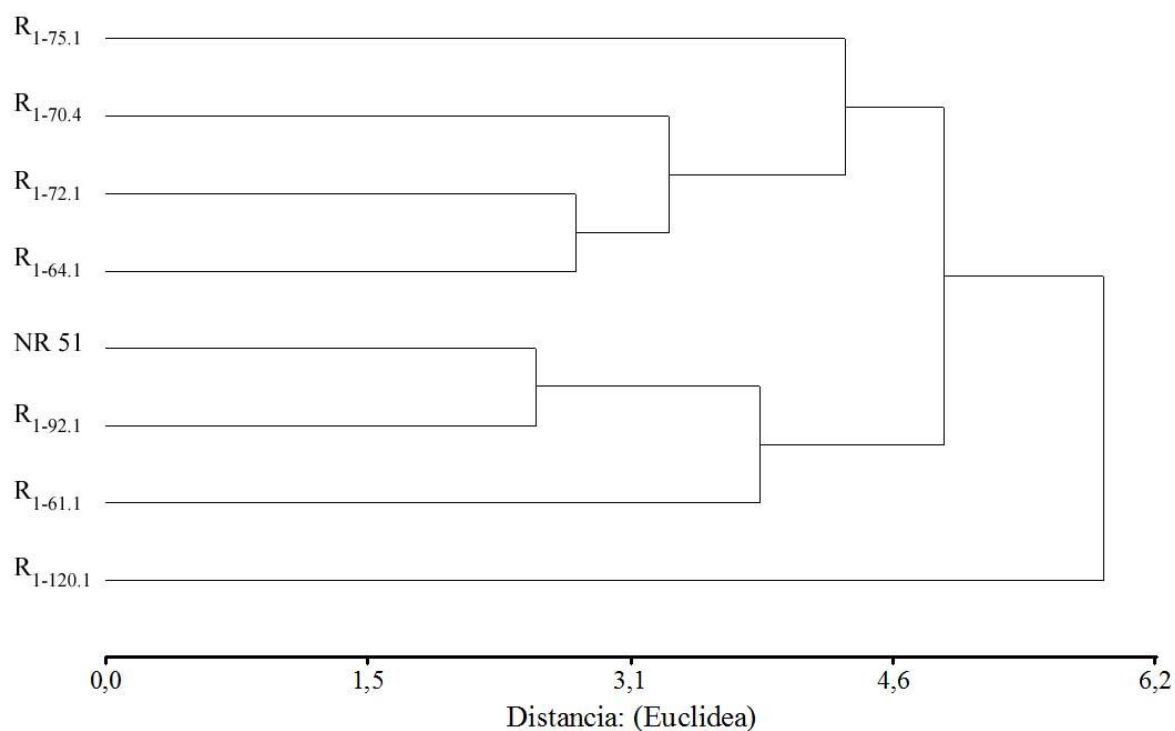
#### **Selección a campo por características deseables de plantas tolerantes *in vitro* a DL<sub>50</sub>**

Tal como se señaló, en la etapa de inducción de callos embriogénicos, se trabajó con plantas (R<sub>1</sub>) que regeneraron en un MI que contenía 100 mM de manitol. En total, 18 plantas fueron identificadas mediante el uso de marcadores morfológicos. Este análisis permitió realizar un árbol de divergencia utilizando la información proporcionada por la totalidad de los descriptores (Fig. 5.4) y seleccionar, en primera instancia, cinco materiales divergentes (Tabla 5.3). Se trabajó con este número de materiales debido al espacio físico de la cámara.



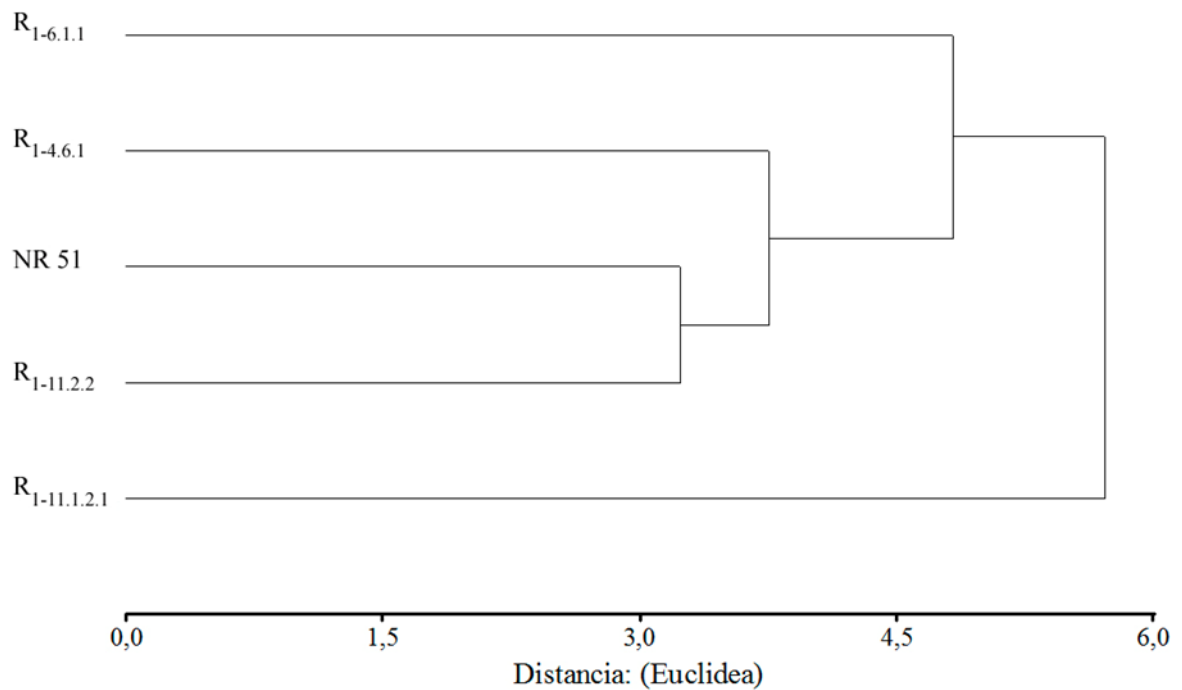
**Fig. 5.4.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclídea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un MI con 100 mM de manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,787.

En la etapa de selección en regeneración de plántulas, se trabajó con 4 plantas que regeneraron de los tratamientos con 75 o 100 mM de manitol (3 y 1 “planta”, respectivamente). Si bien estos tratamientos produjeron 7 plántulas en total con mayor o menor asociación al NR 51 (Fig. 5.5), las 4 plantas seleccionadas produjeron suficientes semillas para realizar el ensayo de estrés hídrico (Tabla 5.3).



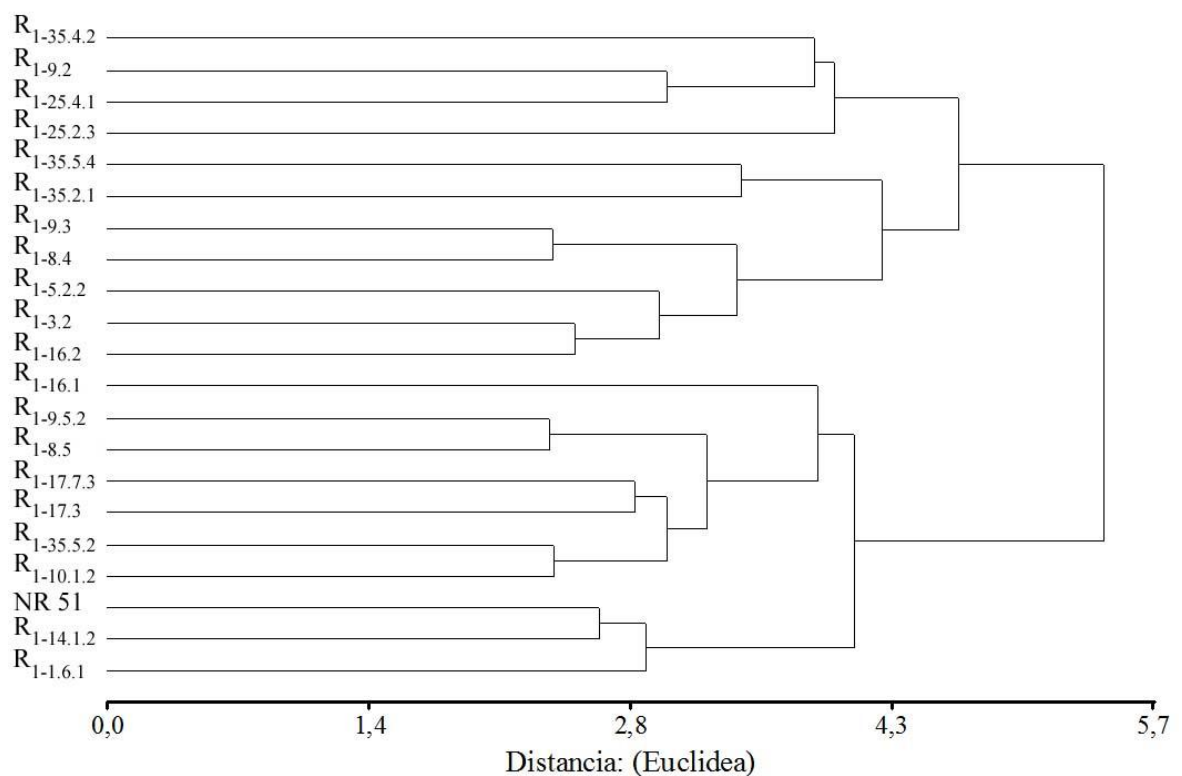
**Fig.5.5.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclídea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un MR con 75 mM ( $R_{1-75.1}$ ;  $R_{1-70.4}$ ;  $R_{1-72.1}$ ;  $R_{1-64.1}$ ;  $R_{1-61.1}$ ), 100 Mm ( $R_{1-92.1}$ ) o 150 mM ( $R_{1-120.1}$ ) de manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,846.

En la etapa de selección con manitol en ambos medios sucedió algo similar. De las 9 plantas trasplantadas a campo, 4 sobrevivieron (Fig. 5.6) y 3 de ellas produjeron suficientes semillas. Por tal motivo, se trabajó con 3 plantas regeneradas *in vitro* de medios con 100 mM de manitol en ambas etapas (inducción y regeneración) (Tabla 5.3).



**Fig. 5.6.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclídea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un MI y MR con 100 mM de manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,910.

Finalmente, fueron incluidos materiales que regeneraron *in vitro* y no provenían de ningún tratamiento con manitol, con el objeto de interpretar los resultados obtenidos mediante la puesta a punto en cada etapa del proceso de selección *in vitro*. En total se caracterizaron morfológicamente 20 plantas (Fig. 5.7), de las cuales, 3 de ellas fueron seleccionadas. Se utilizó el mismo criterio que en la etapa de inducción, seleccionando los materiales más divergentes. Fueron incluidos los somaclones R<sub>1-14</sub> y R<sub>1-132</sub>, ya que presentaron además de cambios morfológicos, cambios genéticos con respecto al material NR 51 dador de anteras (Capítulo 4) (Tabla 5.3).



**Fig. 5.7.** Dendrograma obtenido a partir del método de encadenamiento promedio (UPGMA) mediante el análisis de doce marcadores morfológicos, aplicando la distancia Euclídea como medida de proximidad. Las plantas fueron regeneradas *in vitro* en un medio sin manitol. El genotipo dador de anteras (NR 51) fue utilizado como testigo. Correlación cofenética= 0,676.

En la tabla 5.3 se muestra una descriptiva de los caracteres de morfología externa en hoja, tallo y panoja en los diferentes materiales seleccionados y utilizados en los ensayos de estrés hídrico. La prueba *t* para muestras independientes en las plantas regeneradas *in vitro* (generación  $R_1$ ) reveló diferencias significativas ( $P < 0,005$ ) en la mayoría de los caracteres morfológicos. Con la excepción de solo 3 variables de las 12 analizadas (LLHB, RAM y FL/RA), se observó variabilidad en todos los caracteres respecto al material NR 51 (Tabla 5.3).



Tabla 5.3. Caracteres de morfología externa de hoja, tallo y panoja analizados en 17 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

Material	Trat.	LLHB (cm)	ALHB (cm)	LVHB (cm)	AFP (cm)	LINF (cm)	LPE (cm)	LPEE (cm)	LINT (cm)	AT (mm)	NUD (n°)	RAM (n°)	FL/RA (n°)
NR 51	-	33,3	1,2	7,2	126,8	11,9	19,4	8,3	10,8	3,9	9,8	6,8	2,4
R <sub>1-17.2.1.1</sub>	MI	28,8	0,88*	6,8	100,6*	9,6	23,2	11,6	8,3	2,7*	8,8	4,2	0,4
R <sub>1-4.3.1.1.2</sub>	MI	28,6	0,96*	7,3	85,6*	9,4*	23,4	12,8	7,4*	2,1*	8*	8,8	3,6
R <sub>1-4.3.3.1</sub>	MI	30,9	0,96*	7,4	126,4	10,0	25,2*	13,9*	12,0	3,6	9,4	7,2	2,4
R <sub>1-6.6.1</sub>	MI	32,8	1,02*	9,2*	139,4	10,8	21,6	9,6	12,3	4,2	10,0	8,0	3,0
R <sub>1-6.6.4</sub>	MI	34,5	1,1	6,9	116,8	9,1	22,6	12*	12,3	3,6	9,5	7,3	0,3
R <sub>1-61.1</sub>	MR	32,6	0,98*	10,1*	141,2*	13,0	23,2	11,8*	10,2	4,2	10,4	7,2	2,0
R <sub>1-70.4</sub>	MR	27,2	0,94*	7,9	113,8	9,6	21,0	9,4	12,6	3,0	9,2	8,0	2,6
R <sub>1-75.1</sub>	MR	23,7	0,62*	5,9	111,6*	10,1	17,4	8,8	11,3	3,1	10,6	7,4	0,6
R <sub>1-92.1</sub>	MR	36,6	1,1	7,2	124,8	12,2	21,8	8,9	8,6	4,0	12,2	8,2	1,4
R <sub>1-11.2.2</sub>	MI-MR	29,1	0,98*	7,2	119,2	11,6	18,5	9,8	14,1	3,2	8*	4,2	1,2
R <sub>1-4.6.1</sub>	MI-MR	33,0	0,94*	7,9	132,6	11,2	28,4*	13*	12,8	4,0	8,7*	5,2	2,5
R <sub>1-6.1.1</sub>	MI-MR	35,2	1,04*	6,7	117,4	8,6*	18,1	6,7	10,6	3,6	10,8	8,4	0,0
R <sub>1-8.5</sub>	C	35,9	1*	7,4	106,6*	8,3*	19,0	8,6	7*	3,0	11,8*	6,4	0,4
R <sub>1-17.3</sub>	C	26,4	0,87*	7,9	93,8*	8,8*	20,8	9,4	9,0	3,6	9,8	4,8	1,4
R <sub>1-10.1.2</sub>	C	27,5	0,96*	8,0	99,1*	10,8	18,5	6,5	4,6*	2,8*	10,8	4,8	2,0
R <sub>1-132</sub>	C	31,0	1,3	6,2	102,5*	7,8*	15*	5,6	6,02*	3,2	9,2	6,2	2,8
R <sub>1-t4</sub>	C	28,7	0,87*	6,4	92,8*	8,5*	17,5	8,7	7*	2,4*	9,6	5,6	3,4

(\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en los caracteres morfológicos analizados de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51). Trat: Plantas R<sub>1</sub> regeneradas *in vitro* en medio de inducción con 100 mM de manitol (I), en medio de regeneración con 75 o 100 mM de manitol (R), en medio de inducción y regeneración con 100 mM de manitol (IR), y plantas regeneradas en medio de inducción y regeneración sin manitol (C). Variables morfológicas: longitud de lámina de hoja bandera (LLHB), ancho de lámina de hoja bandera (ALHB), longitud de vaina (LVHB), altura final de planta (AFP), longitud de inflorescencia (LINF), longitud total del pedúnculo floral (LPE), longitud del pedúnculo excerto (LPEE), longitud inter-nodal (LINT), ancho tallo (AT), número de nudos (NUD), número de ramas (RAM) y número de flores/ramas (FL/RA).

## Evaluación de la tolerancia a estrés hídrico en la progenie (S<sub>1</sub>) de plantas regeneradas *in vitro* (R<sub>1</sub>)

### Caracteres de biomasa y fisiológicos

En la tabla 5.4 se muestra el comportamiento bajo condiciones de estrés hídrico de las progenies (S<sub>1</sub>) de los materiales seleccionados en la etapa de inducción (DL<sub>50</sub> en inducción de callos embriogénicos). En algunos de los caracteres de biomasa, la prueba

test  $t$  para muestras independientes indicó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto a la planta dadora de anteras (NR 51). En el ensayo control, donde las macetas fueron mantenidas al 80% del contenido hídrico del suelo (CHS), una de las plantas seleccionadas (material S<sub>1-6.6.4</sub>) presentó menor altura. En el tratamiento de sequía (30% CHS), tres de los materiales evaluados presentaron variabilidad respecto al material dador de anteras (NR 51). Dos de ellos mostraron una disminución en todas las variables analizadas (S<sub>1-17.2.1.1</sub> y S<sub>1-6.6.4</sub>); mientras que el material S<sub>1-4.3.1.1.2</sub> demostró mejor comportamiento en altura, peso fresco y peso seco. Los materiales S<sub>1-4.3.3.1</sub> y S<sub>1-6.6.1</sub> no presentaron diferencias significativas con respecto al NR 51 en ninguna de las variables.

Al realizar la ponderación del daño por estrés hídrico en las variables fisiológicas [ $I = \sum(x_i/X_c)/n$ ], la prueba test  $t$  indicó que las progenies S<sub>1</sub> que provienen de R<sub>1</sub> seleccionados en MI con manitol, no presentan diferencias significativas en el contenido de MDA y proteínas totales ( $P > 0,05$ ) respecto del NR 51 (Tabla 5.5). Sin embargo, los resultados del análisis demuestran diferencias significativas en los materiales S<sub>1-4.3.3.1</sub> y S<sub>1-4.3.1.1.2</sub> ( $P < 0,05$ ) para la variable FRAP, presentando los menores índices en el contenido final. La diferencia que se observa está relacionada en el valor de dicha variable en la situación de estrés (CHS 30%). Al respecto, en el material NR 51 las plantas presentaron un valor de FRAP aproximadamente al doble en condiciones de estrés hídrico, respecto a la situación control (CHS 80%). En cambio, los materiales S<sub>1-4.3.3.1</sub> y S<sub>1-4.3.1.1.2</sub> mostraron valores similares de FRAP en ambas situaciones (resultados no mostrados).

Tabla 5.4. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S<sub>1</sub>) de buffelgrass que provienen de materiales (R<sub>1</sub>) seleccionados en MI con manitol.

Material	Control			Sequía		
	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)
NR 51	42,25	1,131	0,098	37,6	0,802	0,094
S <sub>1-17.2.1.1</sub>	41,6	1,121	0,101	35,05*	0,643*	0,074*
S <sub>1-4.3.1.1.2</sub>	43,58	1,141	0,114	42,05*	1,054*	0,112*
S <sub>1-4.3.3.1</sub>	41,4	1,112	0,109	38,1	0,861	0,095
S <sub>1-6.6.1</sub>	40,95	1,014	0,095	37,45	0,757	0,090
S <sub>1-6.6.4</sub>	38,65*	0,945	0,090	33,45*	0,582*	0,069*

Control: macetas mantenidas al 80% del contenido hídrico suelo (CHS). Sequía: macetas mantenidas al 30% de CHS. (\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

Tabla 5.5. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S<sub>1</sub>) de buffelgrass que provienen de materiales (R<sub>1</sub>) selectos en MI con manitol.

Material	MDA	FRAP	Pt
NR 51	1,212	2,034	1,389
S <sub>1-17.2.1.1</sub>	1,343	1,571	1,07
S <sub>1-4.3.1.1.2</sub>	1,006	1,072*	1,237
S <sub>1-4.3.3.1</sub>	1,455	1,163*	1,045
S <sub>1-6.6.1</sub>	1,226	1,414	1,244
S <sub>1-6.6.4</sub>	1,527	1,872	1,128

(\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

Cuando se analizaron las progenies S<sub>1</sub> de materiales seleccionados en la etapa de regeneración (R<sub>1</sub>) de callos embriogénicos (MR con manitol), se observó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la mayoría de los caracteres de biomasa analizados al finalizar el ensayo (Tabla 5.6). Sin embargo, en ninguno de los materiales evaluados se observó mejor comportamiento con respecto al testigo (NR 51). Con la excepción de los materiales S<sub>1-61.1</sub> y S<sub>1-70.4</sub> que no se diferencian del NR 51 en algunas de las variables, los demás materiales presentaron menor valor estadísticamente significativo en todos los caracteres

de biomasa considerados. En dichos materiales, el análisis de la prueba test *t* indicó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en algunas variables fisiológicas (Tabla 5.7). Dos de ellos ( $S_{1-70.4}$  y  $S_{1-92.1}$ ) presentaron índice mayor en el contenido de MDA. Estos resultados indican que las plantas generan mayor cantidad de MDA en el tratamiento sequía, respecto al NR 51. Adicionalmente, uno de los materiales ( $S_{1-70.4}$ ) presenta mayor índice en el contenido de proteínas totales ( $S_{1-70.4}$ ) y el otro ( $S_{1-92.1}$ ) menor índice en el contenido de FRAP. El material  $S_{1-75.1}$  también presentó menor índice en el contenido de FRAP respecto al NR 51 (Tabla 5.7).

Tabla 5.6. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies ( $S_1$ ) de buffelgrass que provienen de materiales ( $R_1$ ) seleccionados en MR con manitol.

Material	Control			Sequía		
	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)
NR 51	56,89	2,5642	0,262	42,35	0,8232	0,160
$S_{1-61.1}$	52,35*	0,9332*	0,127*	40,9	0,8075	0,142
$S_{1-70.4}$	54,37	1,5855*	0,145*	39,45	0,706	0,139*
$S_{1-75.1}$	52,85*	0,9921*	0,140*	33,84*	0,6632*	0,117*
$S_{1-92.1}$	49,8*	1,1532*	0,129*	36,53*	0,6072*	0,118*

Control: macetas mantenidas al 80% del contenido hídrico suelo (CHS). Sequía: macetas mantenidas al 30% de CHS. (\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

Tabla 5.7. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies ( $S_1$ ) de buffelgrass que provienen de materiales ( $R_1$ ) seleccionados en MR con manitol.

Material	MDA	FRAP	Pt
NR 51	0,903	1,505	3,354
$S_{1-61.1}$	0,681	1,426	2,768
$S_{1-70.4}$	1,566*	1,382	5,707*
$S_{1-75.1}$	1,044	0,703*	3,101
$S_{1-92.1}$	1,391*	0,912*	3,868

(\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

Las progenies ( $S_1$ ) de los materiales seleccionados en la etapa de inducción y regeneración de callos embriogénicos (MI y MR con manitol), también presentaron diferencias significativas en algunos de los caracteres de biomasa analizados ( $P < 0,05$ ). Se puede observar mayor variabilidad en la condición control, ya que los tres materiales presentan diferencias significativas en al menos una de las variables analizadas (Tabla 5.8). En este sentido, los tres materiales evaluados presentan menor altura, dos de ellos menor peso fresco ( $S_{1-4.6.1}$  y  $S_{1-6.1.1}$ ) y uno menor peso seco ( $S_{1-4.6.1}$ ). En cambio, en el tratamiento sequía dos de los materiales evaluados ( $S_{1-11.2.2}$  y  $S_{1-4.6.1}$ ) no se diferenciaron en ninguna de las variables analizadas con respecto a NR 51. Los tres materiales produjeron mayor peso seco y uno de ellos ( $S_{1-6.1.1}$ ) se diferenció estadísticamente del material utilizado como dador de anteras (NR 51) (Tabla 5.8). Este material junto con el  $S_{1-11.2.2}$  evidenciaron comportamiento diferencial ( $P < 0.05$ ) en las variables fisiológicas (Tabla 5.9). En ambos se observó menor índice, tanto en el contenido de MDA como en el de FRAP, respecto al material dador de anteras (NR 51).

Tabla 5.8. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies ( $S_1$ ) de buffelgrass que provienen de materiales ( $R_1$ ) seleccionados en la etapa de inducción y regeneración de callos embriogénicos (MI y MR con manitol).

Material	Control			Sequía		
	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)
NR 51	49,05	1,6734	0,116	33,4	0,4181	0,068
$S_{1-11.2.2}$	45,4*	1,4858	0,111	35,4	0,4818	0,079
$S_{1-4.6.1}$	44,55*	1,2964*	0,094*	34,3	0,49	0,075
$S_{1-6.1.1}$	45,95*	1,1038*	0,099	40,72*	0,4826	0,086*

Control: macetas mantenidas al 80% del contenido hídrico suelo (CHS). Sequía: macetas mantenidas al 30% de CHS. (\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

Tabla 5.9. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies ( $S_1$ ) de buffelgrass que provienen de materiales ( $R_1$ ) seleccionados en la etapa de inducción y regeneración de callos embriogénicos (MI y MR con manitol).

Material	MDA	FRAP	Pt
NR 51	2,741	2,556	1,457
$S_{1-11.2.2}$	1,498*	1,5*	1,155
$S_{1-4.6.1}$	3,063	1,839	1,317
$S_{1-6.1.1}$	1,174*	1,577*	1,151

(\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

Cuando se analizó el comportamiento frente a estrés hídrico en los caracteres de biomasa, las progenies ( $S_1$ ) que provenían de materiales regenerados *in vitro* ( $R_1$ ) sin ningún tratamiento de manitol mostraron diferencias significativas con respecto al NR 51 ( $P < 0,05$ ) (Tabla 5.10). Sólo tres variables en tres materiales, no se diferenciaron del testigo (NR 51). Si bien no se detectó mejor comportamiento en ningunos de los mismos, se pudieron encontrar diferencias significativas en los caracteres de biomasa entre los materiales evaluados. Estos resultados sugieren que la variabilidad que se observa a campo en los materiales regenerados *in vitro* ( $R_1$ ), también se expresa en la descendencia ( $S_1$ ) en estado de plántula.

A diferencia de lo que se observó en las progenies de otros materiales seleccionados en medios de cultivos con manitol, las progenies de  $S_{1-17.3}$  y  $S_{1-t4}$  presentaron índice mayor en el contenido de FRAP ( $P < 0.05$ ), respecto al genotipo dador de anteras (Tabla 5.11). El contenido de proteínas totales también difirió respecto al NR 51, con menor índice en los materiales  $S_{1-10.1.2}$ ,  $S_{1-8.5}$  y  $S_{1-t4}$ .

Tabla 5.10. Altura, peso fresco (PF) y peso seco (PS) evaluados en condiciones control y estrés hídrico (sequía) en progenies (S<sub>1</sub>) de buffelgrass que provienen de materiales (R<sub>1</sub>) regenerados *in vitro*.

Material	Control			Sequía		
	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)	Altura (cm)	PF (g)	PS (g)
NR 51	43,55	1,0946	0,099	38,55	0,7916	0,083
S <sub>1-10.1.2</sub>	38,9*	0,8033*	0,070*	32,35*	0,4538*	0,058*
S <sub>1-17.3</sub>	43,6	0,8568*	0,085*	34,85*	0,4472*	0,073*
S <sub>1-8.5</sub>	39*	0,7762*	0,069*	33,05*	0,4773*	0,061*
S <sub>1-t32</sub>	37,2*	0,9125*	0,088	31,79*	0,5376*	0,069*
S <sub>1-t4</sub>	38,6*	0,6743*	0,071*	35,65*	0,4958*	0,074

Control: macetas mantenidas al 80% del contenido hídrico suelo (CHS). Sequía: macetas mantenidas al 30% de CHS. (\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

Tabla 5.11. Estado fisiológico determinado por malondialdehído (MDA), capacidad de reducir al hierro (FRAP) y proteínas totales (Pt) totales evaluados en condiciones control o estrés hídrico (sequía) en progenies (S<sub>1</sub>) de buffelgrass que provienen de materiales (R<sub>1</sub>) regenerados *in vitro*.

Material	MDA	FRAP	Pt
NR 51	1,494	1,320	1,478
S <sub>1-10.1.2</sub>	1,323	1,776	1,253*
S <sub>1-17.3</sub>	1,175	1,885*	1,312
S <sub>1-8.5</sub>	1,091	1,110	0,878*
S <sub>1-t32</sub>	1,512	1,423	1,653
S <sub>1-t4</sub>	1,032	1,835*	0,825*

(\*) Indica diferencia significativas ( $P < 0,05$ ) dentro de cada columna en las variables analizadas de los materiales regenerados *in vitro* con respecto a la planta dadora de anteras (NR 51).

## DISCUSIÓN

Los resultados del proceso de selección *in vitro* demuestran que durante la etapa de inducción de callos embriogénicos el potencial hídrico generado con una concentración de 25 mM de manitol (~ -0.45 MPa) no afectó el PFCE. No obstante y como sucede en otras especies (Hassan *et al.*, 2004; Matheka *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2013; Hadi *et al.*, 2014), a medida que aumenta la concentración del agente osmótico en el medio de cultivo ocurre

una disminución del potencial hídrico y del PFCE. El menor peso en los callos puede estar relacionado con el retraso en el crecimiento, producto de la pérdida de turgencia que se observa en células que se desarrollan en situaciones de estrés (Al-Bahrany 2002; Errabii *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2011). A su vez, se menciona que dicha reducción depende del material vegetal y de cada especie (Biswas *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2007; Aazami *et al.*, 2010). Los resultados de este trabajo, basados en la variable PFCE sugieren que el crecimiento de los callos comienza a afectarse por efecto del estrés hídrico a partir de potenciales equivalentes a -0,75 MPa (50 mM de manitol).

En este contexto, es necesario mencionar que los tratamientos de manitol le adicionan una fuente de carbono al MI (MS + 3% sacarosa + 6 mg/l de 2-4D + manitol). Si el manitol fuese metabolizado, es de esperar aumento en el peso fresco del explanto (Gulati y Jaiwal, 1993; Lipavská y Vreugdenhil 1996; Mohamed y Ibrahim 2012). Sin embargo, no se registró este comportamiento, ya que el PFCE no aumentó en ningún tratamiento con manitol. Similar resultado fue mencionado en el crecimiento de bananas, donde el manitol utilizado como fuente de carbono no incrementó el peso fresco de las plántulas micro-propagadas (Rukundo *et al.*, 2013). Asimismo, en otras especies, el manitol no produce respuestas favorables en comparación con otras formas de azúcares disponibles en el medio (Hilae y Te-chato, 2005; Yaseen *et al.*, 2009). Yaseen *et al.* (2013) sugieren que la habilidad de células o tejidos para crecer en un medio con manitol está relacionada con la capacidad de la especie para formar y asimilar el azúcar. Por lo tanto, es probable que la inutilización del manitol como fuente de carbono se deba a la incapacidad que tiene buffelgrass para metabolizar este azúcar. Estudios complementarios serían de gran utilidad para confirmar dicha hipótesis (Vítová *et al.*, 2002; Rejšková *et al.*, 2007).

En cuanto a la variable PCE, la respuesta que se observa está muy relacionada con la disminución del potencial hídrico del medio y la situación que genera el estrés. En primer lugar, el tratamiento de 25 mM de manitol produjo una mayor cantidad de callos embriogénicos. Efectos similares fueron observados en otros sistemas de regeneración cuando se utiliza manitol como agente osmótico (Nadel *et al.*, 1989; Biahoua y Bonneau, 1999). Algunos autores sugieren que la disminución del potencial osmótico en el medio de



cultivo genera una condición de estrés en el explanto necesaria para estimular la respuesta embriogénica (Kamada *et al.*, 1993; Aoshima, 2005). Es probable que el aumento en la PCE observada con la dosis más baja de manitol se deba al estímulo que genera el estrés osmótico (Zavattieri *et al.*, 2010). De hecho, el aumento en la PCE exhibida en algunos materiales de buffelgrass cuando se aplican otros estreses en las macollas (frío) concuerda con dicha hipótesis (Capítulo 3).

No obstante, la respuesta embriogénica de los diferentes explantos cultivados *in vitro* depende del nivel de estrés, entre otros factores (Karami y Saidi 2010). En *C. sinensis* se menciona un umbral de potencial osmótico para estimular la formación de callos embriogénicos con manitol; puesto que con concentraciones mayores a las óptimas no se produce dicho efecto (Aoshima, 2005). En el presente trabajo, las mencionadas observaciones concuerdan con los tratamientos mayores a 25 mM de manitol, ya que las concentraciones de 50, 75 y 100 mM no generaron respuesta positiva en la variable PCE. Mientras que la escasa o nula respuesta en la PCE que se observa con los tratamientos de 150 mM (200 y 300 mM, resultados no mostrados), puede estar relacionada con la inhibición en la respuesta embriogénica que se menciona en cultivos que no superan la condición de estrés (Matheka *et al.*, 2008; Mahmood *et al.*, 2014).

Es interesante notar la respuesta observada en la variable número de plantas regeneradas *in vitro* (NPR), la cual difiere según los callos fueron inducidos o no con manitol. Por un lado, si se elimina el agente osmótico durante la etapa de regeneración, el estímulo que se observó en la PCE con 25 mM de manitol en el MI no se tradujo en mayor cantidad de plantas regeneradas. Sólo se observó efecto positivo en el NPR cuando la concentración de manitol (25 mM) se mantuvo en ambos medios de cultivos (MI y MR). En otras especies, la aplicación de PEG mejora la capacidad que tienen los embriones somáticos para desarrollarse en plantas (Svobodová *et al.*, 1999). Las condiciones de estrés osmótico generadas con el PEG en el medio resultan ser necesarias para aumentar la deposición de proteínas de reservas (Misra *et al.*, 1993) y los niveles de transcritos involucrados en la diferenciación de la región apical y radicular (Stasolla *et al.*, 2003). Tal vez, el aumento en el NPR que se observa cuando el manitol es mantenido en ambos

medios (MI y MR), esté relacionado con el requisito de un potencial osmótico necesario en la maduración de los embriones somáticos en la etapa de regeneración (Svobodová *et al.*, 1999).

Por el contrario, cuando los tratamientos de manitol fueron realizados sólo en la etapa de regeneración, cualquier tratamiento disminuyó el NPR respecto del control. Este comportamiento podría estar relacionado con la falta de aclimatación reportada en el cultivo de células o plantas que se mantienen durante algún tiempo en un medio con cierto nivel de estrés (Leone *et al.*, 1994; Gangopadhyay *et al.*, 1997; Claeys *et al.*, 2014). Al respecto, cuando el manitol se colocó directamente en el medio de regeneración (MR), cualquier concentración del mismo disminuyó el NPR. En cambio, en aquellos callos embriogénicos que se indujeron durante 90 días en condiciones de estrés osmótico (MI con manitol), la menor cantidad de plantas regeneradas en el MR con manitol se observó en los tratamientos mayores de 25 mM de manitol. Es probable que las condiciones de estrés impuestas por concentraciones bajas de manitol durante el MI hayan generado equilibrio en el metabolismo celular (Leone *et al.*, 1994); lo que les permitió formar embriones y sortear más favorablemente los efectos negativos del estrés osmótico en la etapa de regeneración (MR) (Mohamed *et al.*, 2000). En cambio, cuando el manitol es colocado directamente en el medio de regeneración (MR), es probable que se produzca *shock* osmótico en las células (Gangopadhyay *et al.*, 1997) afectando drásticamente a los embriones somáticos y su posterior regeneración (Matheka *et al.*, 2008).

En cuanto a la selección y evaluación de los materiales regenerados *in vitro*, es conocido que durante el cultivo de células o tejidos se generan y recuperan plantas con cambios respecto al material de origen (Larkin y Scowcroft, 1981). Este trabajo demostró dicho fenómeno en plantas regeneradas *in vitro* utilizando anteras como explanto (Capítulo 4). Con el mismo sistema de regeneración (Capítulo 3), los resultados del presente capítulo también demuestran cambios en plantas regeneradas ( $R_1$ ), ya sea en morfología de hoja, tallo y panoja. A su vez, los ensayos de estrés hídrico comprueban que la progenie de estos materiales ( $S_1$ ) presentaron un comportamiento diferencial respecto al genotipo dador de anteras, tanto en condiciones control como en sequía. Estos estudios, al igual que los

generados por el grupo de trabajo del IFRGV - INTA (Lopez Colomba *et al.*, 2011; 2013), confirman que la variación somaclonal es un fenómeno observable y aplicable para la obtención de variabilidad genética en genotipos apomícticos de buffelgrass.

Los descriptores como altura, peso fresco y peso seco de planta son los caracteres morfológicos más importantes para evaluar y caracterizar los diferentes genotipos pertenecientes a buffelgrass (Griffa, 2002; 2010; Griffa *et al.*, 2010). Conjuntamente, el peso seco es el carácter de mayor relevancia agronómica y el principal componente de rendimiento en pasturas forrajeras (Moore *et al.*, 2004). En los materiales regenerados de medios de cultivo sin manitol y evaluados en el ensayo de estrés hídrico, no se encontró mejor comportamiento para ninguna de las variables de biomasa antes mencionadas. En cambio, las progenies ( $S_1$ ) de los materiales  $S_{1-4.3.1.1.2}$  y  $S_{1-6.1.1}$  seleccionados de medios con manitol, tuvieron mayor peso seco en el tratamiento de sequía. El mejor comportamiento de estos materiales respecto al que le dio origen, sugiere tolerancia en su respuesta al crecimiento bajo la situación de estrés (Munns, 2002; Moore *et al.*, 2004; Verslues *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos resultados indican que la selección *in vitro* con manitol permite regenerar materiales con mejor respuesta a condiciones de sequía, tal como sucede en otras especies (Mohamed *et al.*, 2000).

En buffelgrass, el contenido de MDA se encuentra relacionado con el daño oxidativo causado por las EAO, tanto en condiciones de estrés térmico como salino. En general, el incremento de MDA se menciona en genotipos que presentan menor tasa de crecimiento (López Colomba *et al.*, 2013), menor altura o acumulación de materia fresca (Lanza Castelli *et al.*, 2010; Tommasino *et al.*, 2012). Lo contrario sucede en cultivares tolerantes, donde se menciona aumento en las variables antes mencionadas y menor contenido de MDA. Los resultados del tratamiento de sequía demostraron similar comportamiento en los materiales  $S_{1-6.1.1}$  (MI y MR),  $S_{1-70.4}$  y  $S_{1-92.1}$  (MR), ya que el primero presentó menor índice de MDA y mayor peso seco con respecto al NR 51, mientras que en los últimos dos, el comportamiento fue inverso. Sin embargo, esta tendencia no fue observada en todos los materiales evaluados. Una posible explicación puede estar relacionada con el momento de la toma de muestra, ya que las mayores

diferencias en el contenido de MDA entre individuos se observan a las 48 o 72h de comenzado el ensayo de estrés (Lanza Castelli *et al.*, 2010; Tommasino *et al.*, 2012; López Colomba *et al.*, 2013).

En las progenies de los materiales evaluados ( $S_1$ ), también se observaron diferencias en sus respuestas al estrés hídrico para el índice de FRAP y proteínas totales. En cuanto al FRAP, la técnica cuantifica la capacidad reductora de los compuestos antioxidantes contenidos en un extracto vegetal (Ou *et al.*, 2002), por medio de la reducción del hierro (Benzie y Strain, 1996). Los resultados obtenidos muestran diferencias en los valores de FRAP, con respecto al material NR 51. Algunos materiales presentaron el mismo índice en el contenido de FRAP y mayor daño en MDA, aunque, también se observaron materiales con menor índice de FRAP y mayor, menor o igual daño cuantificable mediante MDA. Estos resultados no permiten dilucidar si el mismo o el menor índice en el contenido de FRAP se debe a que los compuestos antioxidantes están siendo utilizados para disminuir las EAO o si el sistema de defensa no alcanza a controlarlas (Ou *et al.*, 2002; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). Para asegurar este comportamiento en los materiales se debería analizar la relación entre el glutatión reducido y oxidado en cada condición, ya que es uno de los principales componentes del sistema de defensa no enzimático (Noctor y Foyer, 1998; Lascano *et al.*, 2001). Con respecto a proteínas, la técnica empleada no permite discriminar si la variación en el contenido total que se observa en algunos materiales respecto al testigo NR 51, se debe a una síntesis de *novo* o al clivaje de las mismas (Bradford, 1976). Por lo tanto, si bien se detectó variabilidad en FRAP y proteínas totales en los materiales evaluados ( $S_1$ ), para esclarecer el comportamiento de estas dos variables se deberían realizar otros ensayos tendientes a evaluar los cambios fisiológicos asociados a la adaptación al estrés hídrico.

Con respecto a la etapa más factible para realizar el proceso de selección, el material  $S_{1-4.3.1.1.2}$  estuvo en contacto con el agente osmótico durante inducción de callos embriogénicos (MI) y el  $S_{1-6.1.1}$  en ambos medios (MI y MR). Ningún material seleccionado durante regeneración (MR) evidenció mejor comportamiento. Estos resultados sugieren que la presión de selección con manitol, al menos, debe realizarse en

inducción de callos embriogénicos. Si bien cualquier fuente o proceso morfogénico es susceptible a expresar variación somaclonal (Bairu *et al.*, 2011), una posible explicación a estos resultados puede estar relacionada con lo que sucede en el explanto durante la etapa de inducción. Al respecto, cuando las anteras son colocadas en el MI se observa desdiferenciación y proliferación desorganizada de células que crecen hasta formar un callo (Capítulo 3). Estos procesos son claves en la variación somaclonal; ya que pueden inducir alteraciones en las células que generan inestabilidad (Karp, 1995). Adicionalmente, se sugiere que algunos cambios genéticos que se observan en plantas regeneradas *in vitro* provienen de la fase de callo (Phillips *et al.*, 1994).

## CONCLUSIONES

Se confirma la presencia de variabilidad en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass, puesto que el fenotipo de plantas regeneradas ( $R_1$ ), como los caracteres morfológicos y fisiológicos evaluados en sus progenies ( $S_1$ ) tienen un comportamiento diferencial respecto al material dador de anteras.

El manitol incorporado en el proceso de selección *in vitro* y utilizado como agente de selección genera un estrés osmótico en el medio de cultivo que permite obtener materiales tolerantes para caracteres asociados al estrés hídrico.

La etapa de inducción fue la más sensible al tratamiento con 100 mM de manitol para la generación de variación somaclonal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aazami M. A., Torabi M., and Jalili E. 2010. In vitro response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. *African Journal of Biotechnology* 9(26): 4014-4017.
- Ahmad M. S. A., Javed F. and Ashraf M. 2007. Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Plant Growth Regulation* 53(1): 53-63.
- Al-Bahrany A. M. 2002. Callus growth and proline accumulation in response to polyethylene glycol induced osmotic stress in rice, *Oryza sativa* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5(12): 1294-1296.
- Aoshima Y. 2005. Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. *Plant Biotechnology* 22(4): 277-280.
- Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Bairu M. W., Aremu A. O. and Van Staden J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63(2): 147-173.
- Benzie I. F. F. and Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70–76.
- Biahoua, A., and Bonneau, L. (1999). Control of in vitro somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Reports* 19(2): 185-190.
- Bidabadi S. S., Mahmood M., Meon S., Wahab Z., and Ghobadi C. 2011. Evaluation of in vitro water stress tolerance among EMS—Induced variants of banana (*Musa* spp., AAA), using “morphological, physiological and molecular” traits. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14(4): 255-263.
- Biswas J., Chowdhury B., Bhattacharya A., and Mandal A. B. 2002. In vitro screening for increased drought tolerance in rice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38(5): 525-530.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.
- Cha-um S., Takabe T. and Kirdmanee C. 2012. Physio-biochemical responses of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings to mannitol and polyethylene glycol-induced iso-osmotic stresses. *Plant Production Science* 15(2): 65-72.
- Claeys H., Van Landeghem S., Dubois M., Maleux K. and Inzé D. 2014. What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used in Vitro Stress Assays. *Plant physiology* 165(2): 519-527.
- Conti H., Cazenave G. y Giagnoni R. 2009. Características climáticas de las provincias de Santiago del Estero, Chaco y Formosa. En: *Flora Chaqueña-Argentina (Santiago del Estero, Chaco y Formosa)*. Freire S. E. y Molina A. M. (ed.). INTA, pp. 9-26.
- Cubero J. I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Cubero J. I. (ed.) *Mundi-Prensa* (2<sup>a</sup>). 566 pp.

- Di Rienzo J. A., Guzmán A.W. and Casanoves F. 2002. A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 7:1–14
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C. W. 2012. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (<http://www.infostat.com.ar>).
- Errabii T., Gandonou C. B., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., and Senhaji N. S. 2007. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(2): 95-102.
- Foyer C. H., Lelandais M. and Kunert K. J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92(4): 696-717.
- Gangopadhyay G., Basu S. and Gupta S. 1997. In vitro selection and physiological characterization of NaCl-and mannitol-adapted callus lines in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50(3): 161-169.
- Gopal J. and Iwama K. 2007. In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports* 26(5): 693-700.
- Griffa S. M. 2002. Caracterización de una estirpe sexual y cultivares apomícticos de “buffelgrass” (*Cenchrus ciliaris* L.). M.Sc. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC, Córdoba, Argentina 163 pp.
- Griffa S. M. 2010. “Caracterización bioquímica y molecular de germoplasma, evaluación de tolerancia a la salinidad y obtención de híbridos en Buffel grass”. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC, Córdoba, Argentina 137 pp.
- Griffa S., Ribotta A., López Colomba E., Tommasino E., Carloni E., Luna C. and Grunberg K. 2010. Evaluation seedling biomass and its components as selection criteria for improving salt tolerance in Buffelgrass genotypes. *Grass and Forage Science* 65: 358-361.
- Gulati A. and Jaiwal P. K. 1993. Selection and characterization of mannitol-tolerant callus lines of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34(1): 35-41.
- Hadi S. M., Ibrahim K. M. and Yousif S. I. 2014. Effect of shock and elevated levels of mannitol on callus growth, regeneration and proline accumulation in *Ruta graveolens* cultures. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(11): 479-488.
- Hanna W. W. and Bashaw E. C. 1987. Apomixis: Its Identification and Use in Plant Breeding. *Crop Science* 27: 1136-1139.
- Hassan N. S., Shaaban L. D., Hashem E. S. A. and Seleem E. E. 2004. In vitro selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. Cv. Myak. *International Journal of Agriculture and Biology* 6:1-13.
- Heath R. L. and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1): 189-198.
- Hemon A. F. and Sudarsono. 2010. Evaluation of Somaclones Peanut Plants Regenerated from Repeat Cycles of In Vitro Selection Against Drought Stress. *Jurnal Agronomi Indonesia* 38(1): 36-42.
- Hilae A. and Te-chato S. 2005. Effect of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Songklanarin J Sci Tech* 27(3): 629-635.



- Hodges D. M., Delong J. M., Forney C. F. and Prange R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues and other interfering compounds. *Planta* 207: 604–611.
- Hohl M. and Schopfer P. 1991. Water relations of growing Maize coleoptiles comparison between Mannitol and Polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiology* 95(3): 716-722.
- Jain S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153–166.
- Joshi R., Shukla A., and Sairam R. K. 2011. In vitro screening of rice genotypes for drought tolerance using polyethylene glycol. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(6): 2209-2217.
- Kamada H., Ishikawa K., Saga H. and Harada H. 1993. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue Culture Letters* 10: 38-44.
- Karami O. and Saidi A. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37(5): 2493-2507.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, 85(1-3): 295-302.
- Lanza Castelli S., Grunberg K., Muñoz N., Griffa S., Colomba E. L., Ribotta A., Biderbost E. and Luna C. 2010. Oxidative damage and antioxidant defenses as potential indicators of salt-tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(9): 622-626.
- Larkin P. J. and Scowcroft S. C. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Lascano H. R., Antonicelli G. E., Luna C. M., Melchiorre M. N., Gómez L. D., Racca R. W., Trippi V. S. and Casano L. M. 2001. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Functional Plant Biology*, 28(11): 1095-1102.
- Leone A., Costa A., Tucci M and Grillo S. 1994. Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum* 92: 21-30.
- Lipavská H. and Vreugdenhil D. 1996. Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45(2): 103-107.
- López Colomba, E., 2009. Inducción de variabilidad genética mediante técnicas de cultivo in vitro para tolerancia a estrés abiótico en *Cenchrus ciliaris* L. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba, pp. 142.
- López Colomba E., Prina A., Griffa S., Ribotta A. N., Carloni E., Tommasino E., Luna C., Biderbost E. and Grunberg K. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and in vitro selection. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 80: 59-64.
- López Colomba E., Tommasino E., Luna C., Griffa S., Carloni E., Ribotta A., Quiroga M. and Grunberg K. 2013. Differential salt-stress response during germination and vegetative growth in in vitro selected somaclonal mutants of *Cenchrus ciliaris* L. *South African Journal of Botany* 87: 157-163.
- Mahmood I., Razzaq A., Hafiz I. A., Kaleem S., Khan A. A., Qayyum A. and Ahmad M. 2012. Interaction of callus selection media and stress duration for in vitro selection

- of drought tolerant callus of wheat. *African Journal of Biotechnology* 11(17): 4000-4006.
- Matheka J. M., Magiri E., Rasha A. O. and Machuka J. 2008. In vitro selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology* 7(4):641-650.
- Misra S., Attree S. M., Leal I. and Fowke L. C. 1993. Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Annals of Botany* 71: 11–22.
- Mohamed M. H., Harris P. J. C. and Henderson J. 2000. In vitro selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science* 159(2): 213-222.
- Mohamed M. A. H. and Ibrahim T. A. 2012. Enhanced in vitro production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by mannitol and ventilation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111(3): 335-343.
- Moore K. J., Boote K. J., and Sanderson M. A. 2004. Physiology and developmental morphology. En: Warm-season (C4) grasses. Moser L. E., Burson B. L. and Sollenberger L. E. (eds) Madison, Wisconsin, pp. 179-216.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell and environment* 25(2): 239-250.
- Nadel B. L., Altman A. and Ziv, M. 1989. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18(2): 181-189.
- Noctor G., and Foyer C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* 49(1): 249-279.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A. and Deemer E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11): 3122-3128.
- Pérez-Clemente R. M. and Gómez-Cadenas A. 2012. In vitro tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. INTECH Open Access Publisher. <http://dx.doi.org/10.5772/50671> Activo Julio de 2015.
- Phillips R. L., Kaeppler S. M. and Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(12): 5222-5226.
- Polle A. 1997. Defense against photooxidative damage in plants. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 34: 623-666.
- Rejšková A., Patková L., Stodůlková E. and Lipavská H. 2007. The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant physiology* 164(2): 174-184.
- Remotti, P. C. 1998. Somaclonal variation and in-vitro selection for crop improvement. In *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Jain S. M., Brar D. S. and Ahloowali B. S. Dordrecht, The Netherlands, pp 169-201
- Rukundo P., Ulinzwenimana C., Uwase F. and Ahishakiye V. 2013. Comparative study of effects of table sugar, laboratory grade sucrose and mannitol on growth of banana plantlets under in vitro conditions. *Rwanda Journal* 28(1): 76-83.
- Sánchez-Rodríguez E., Rubio-Wilhelmi M., Cervilla L. M., Blasco B., Rios J. J., Rosales M. A., Romero L and Ruiz J. M. 2010. Genotypic differences in some

- physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science*, 178(1): 30-40.
- Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W. and Sederoff R. R. 2003. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* 131(1): 49-60.
- Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýřová L., Lipavská H., Vágner M. and Vondráková Z. 1999. Somatic embryogenesis in Norway spruce: anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(3): 209-221.
- Tessi N. P., Avila J. M., Edith R., Armando R. H. y Ferrando C. A. 2014. Buffel grass Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. (ed) INTA, Chamental, La Rioja, 1-20 pp.
- Tommasino E., Griffa S., Grunberg K., Ribotta A., López Colomba E., Carloni E., Quiroga M. and Luna C. 2012. Malondialdehyde content as a potential biochemical indicator of tolerant *Cenchrus ciliaris* L. genotypes under heat stress treatment. *Grass and Forage Science*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2494.2012.00851.x>.
- Tommasino E. 2013. I Workshop sobre Estresses Abióticos em Plantas Forrageiras. Disertación: Fenotipificación de Genotipos de *Cenchrus ciliaris* para tolerancia al estrés hídrico. <http://cloud.cnpgc.embrapa.br/weapf2013/files/2012/12/ENSAYOS-DE-ESTR%C3%89S-POR-SEQU%C3%8DA-FINAL.pdf> Activo Febrero de 2016
- Verma D., Ansari M. W., Agrawal G. K., Rakwal R., Shukla A., and Tuteja N. 2013. In vitro selection and field responses of somaclonal variant plants of rice cv PS113 for drought tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 8(4).
- Verslues P. E., Ober E. S. and Sharp R. E. 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiology* 116(4): 1403-1412.
- Verslues P. E., Agarwal M., Katiyar Agarwal S., Zhu J. and Zhu J. K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.
- Vítová L., Stodůlková E., Bartoníčková A. and Lipavská H. 2002. Mannitol utilisation by celery (*Apium graveolens*) plants grown under different conditions in vitro. *Plant Science* 163(4): 907-916.
- Yaseen M., Ahmad T., Abbasi N. A. and Hafiz I. A. 2009. Assessment of apple rootstocks M 9 and M 26 for in vitro rooting potential using different carbon sources. *Pakistan Journal of Botany* 41(2): 769-781.
- Yaseen M., Ahmad T., Sablok G., Standardi A. and Hafiz I. A. 2013. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular biology reports* 40(4): 2837-2849.
- Zavattieri M.A., Frederico A.M., Lima M., Sabino R. and Arnholdt-Schmitt B. 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: 1-9.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo reveló que la constitución genética de la colección activa de germoplasma de buffelgrass [*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.] está representada por una amplia gama de citotipos tetraploides y aneuploides. La identificación de materiales con diferentes números de cromosomas confirmó la diversidad genética que se encuentra en la especie y en la colección activa a campo de buffelgrass. El estudio proporciona un conocimiento indispensable para los mejoradores que utilicen y/o requieran trabajar con los diferentes genotipos apomícticos de la colección activa de germoplasma del IFRGV (INTA-CIAP).

Se demostró que las anteras pueden ser utilizadas como un explanto alternativo para regenerar plantas, *vía* embriogénesis somática, en tres genotipos apomícticos de buffelgrass. En dos de los genotipos, el sistema de regeneración *in vitro* es eficiente, tanto como otros sistemas utilizados para obtener plantas en buffelgrass. Este hallazgo requiere profundizar el conocimiento, indagando la respuesta embriogénica en los demás genotipos apomícticos. En particular, las anteras podrían ser utilizadas como un explanto para recuperar cierta eficiencia de regeneración en materiales considerados como recalcitrantes.

En dos genotipos apomícticos de buffelgrass se detectó un grupo de plantas regeneradas *in vitro* ( $R_1$ ) con variación somaclonal; puesto que presentan modificaciones en el contenido de ADN nuclear e incluso la pérdida de un cromosoma. Además, los materiales regenerados *in vitro* presentan variabilidad en los perfiles moleculares y en el fenotipo. Finalmente, las progenies ( $S_1$ ) de dos de estos materiales regenerados ( $S_{1-14}$  y  $S_{1-132}$ ), como de otros escogidos de un proceso de selección *in vitro*, presentaron un comportamiento diferencial respecto al material dador de anteras, tanto en caracteres morfológicos como fisiológicos.

Si bien es dificultoso evaluar todas las plantas regeneradas *in vitro* a campo, el trasplante de los materiales regenerados ( $R_1$ ) a una parcela experimental y la

implementación de marcadores morfológicos es un buen criterio para detectar cambios debido a la variación somaclonal.

En una de los genotipos apomícticos de buffelgrass, el proceso de selección *in vitro* con manitol permitió identificar materiales tolerantes ( $S_1$ ) en caracteres asociados con tolerancia al estrés hídrico. Cuando se utilizó 100 mM de manitol como agente osmótico en el MI o en ambos medios (MI y MR), se identificaron dos materiales con mayor altura, peso fresco (en uno de ellos) y peso seco al finalizar el tratamiento de sequía. Estos materiales, como otros que presentan características morfológicas diferentes al material apomíctico dador de anteras, podrían ser incorporados en un programa de mejoramiento genético de buffelgrass.

El estudio realizado en la presente tesis sirve de base para futuras líneas de investigación, las cuales deberían estar orientadas a:

Evaluar el comportamiento de las sucesivas progenies ( $S_2$  y  $S_3$ ) de los materiales seleccionados *in vitro*, como también de otros que presentaron cambios morfológicos respecto al material utilizado como dador de anteras.

Utilizar el sistema de selección *in vitro* para obtener materiales con un comportamiento diferencial en diversos cultivares comerciales o en otros genotipos apomícticos introducidas de buffelgrass.

Explorar el sistema de regeneración y selección *in vitro* para la obtención de materiales con un comportamiento diferencial en otros estreses abióticos, como por ejemplo estrés por frío o salino.

## **CAPÍTULO 7**

### **ANEXO**

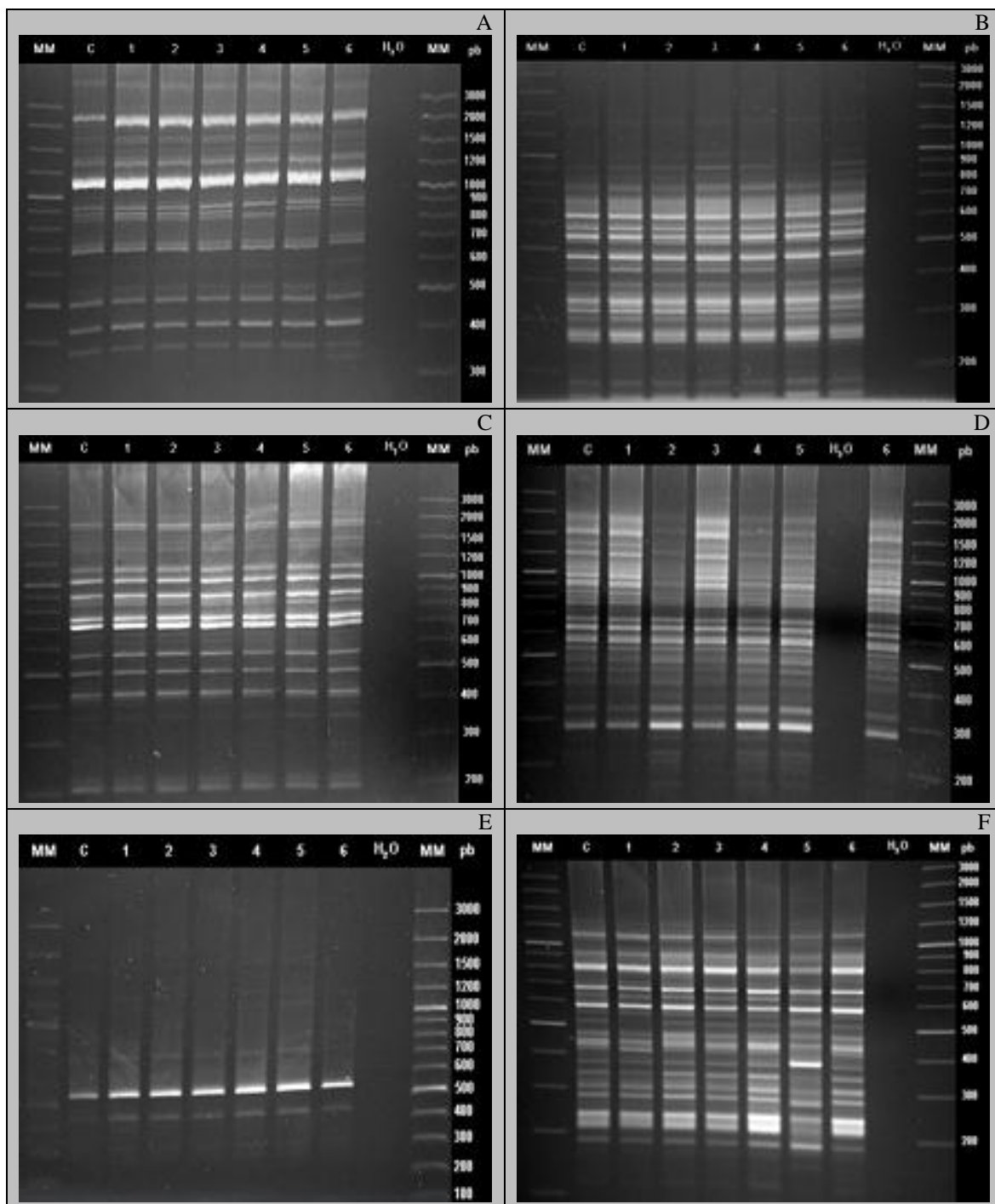
Tabla 7.1. Cebadores, secuencias de nucleótidos (Sec. de nucl.), temperaturas de hibridación (Temp.) y tamaño de bandas (Tam. band.) generadas por los cebadores *ISSRs* utilizados para la diferenciación molecular en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass.

N°	Cebadores	Sec. de nucl.	Temp.	Tam. band.
1	17899	(CA) <sub>6</sub> AG	55°C + BSA	> 3000 - 350
2	AE <sub>2</sub>	(CA) <sub>8</sub> G	55°C	1400 - 100
3	D12	(GA) <sub>6</sub> CG	55°C + BSA	2900 - 200
4	D14	(CAC) <sub>3</sub> GC	52°C y 55°C	-
5	HB13	(GAG) <sub>3</sub> GC	52°C + BSA	3000 - 200
6	HB14	(CTC) <sub>3</sub> GC	55°C + BSA	700 - 400
7	ISSR1C	(AG) <sub>8</sub> Y*	55°C	1800 - 100
8	ISSR1E	(AG) <sub>8</sub> GG	52°C + BSA	550 - 180
9	ISSR4	(GA) <sub>8</sub> T	55°C + BSA	1500 - 220
10	ISSR8C	(AG) <sub>8</sub> Y*T	55°C + BSA	3000 - 200
11	ISSR9E	(GATC) <sub>3</sub> GC	55°C + BSA	3000 - 250
12	ISSR9C	(AG) <sub>8</sub> Y*C	55°C + BSA	1800 - 250
13	RAF16	(GACA) <sub>4</sub>	52°C + BSA	> 3000 - 250
14	RAF4	(GA) <sub>9</sub> T	55°C	2300 - 400
15	RAF9	(CAA) <sub>5</sub>	55°C + BSA	3000 - 280
16	UBC816	(CA) <sub>8</sub> T	55°C + BSA	2500 - 250
17	UBC825	(AC) <sub>8</sub> T	55°C + BSA	2000 - 180
18	UBC827	(AC) <sub>8</sub> G	55°C	> 3000 - 250
19	UBC834	(AG) <sub>8</sub> CT	55°C + BSA	1800 - 200
20	UBC840A	(GA) <sub>8</sub> CT	55°C	3000 - 180
21	UBC840B	(GA) <sub>8</sub> TT	52°C + BSA	2000 - 200
22	UBC850	(GT) <sub>8</sub> Y*C	55°C	1500 - 300
23	UBC861	(ACC) <sub>6</sub>	52°C y 55°C	-
24	UBC863	(AGT) <sub>6</sub>	52°C y 55°C	-
25	UBC864	(ATG) <sub>6</sub>	55°C + BSA	2000 - 180
26	UBC865	(CCG) <sub>6</sub>	52°C y 55°C	-

(\*) Y= T/C

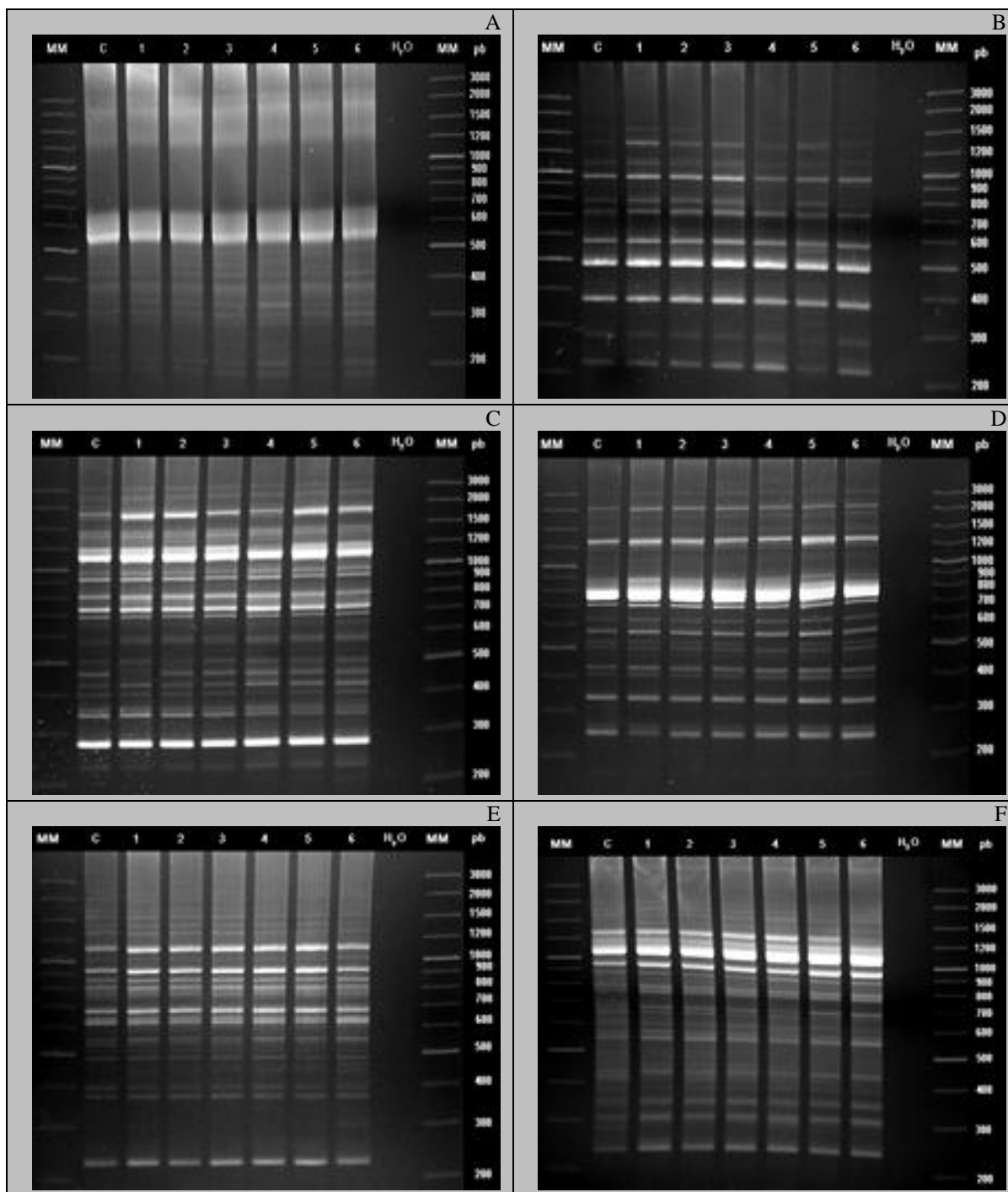
Tabla 7.2. Análisis de coordenadas principales (EMD) de siete perfiles moleculares generados con veintidós cebadores *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass, obtenido a partir de la transformación ( $\sqrt{1-S}$ ) del índice de similitud de Jaccard.

Componente principal	Valor	Proporción de varianza (%)	Proporción de varianza acumulada (%)
CP 1	5	42	42
CP 2	2	21	62
CP 3	2	20	82

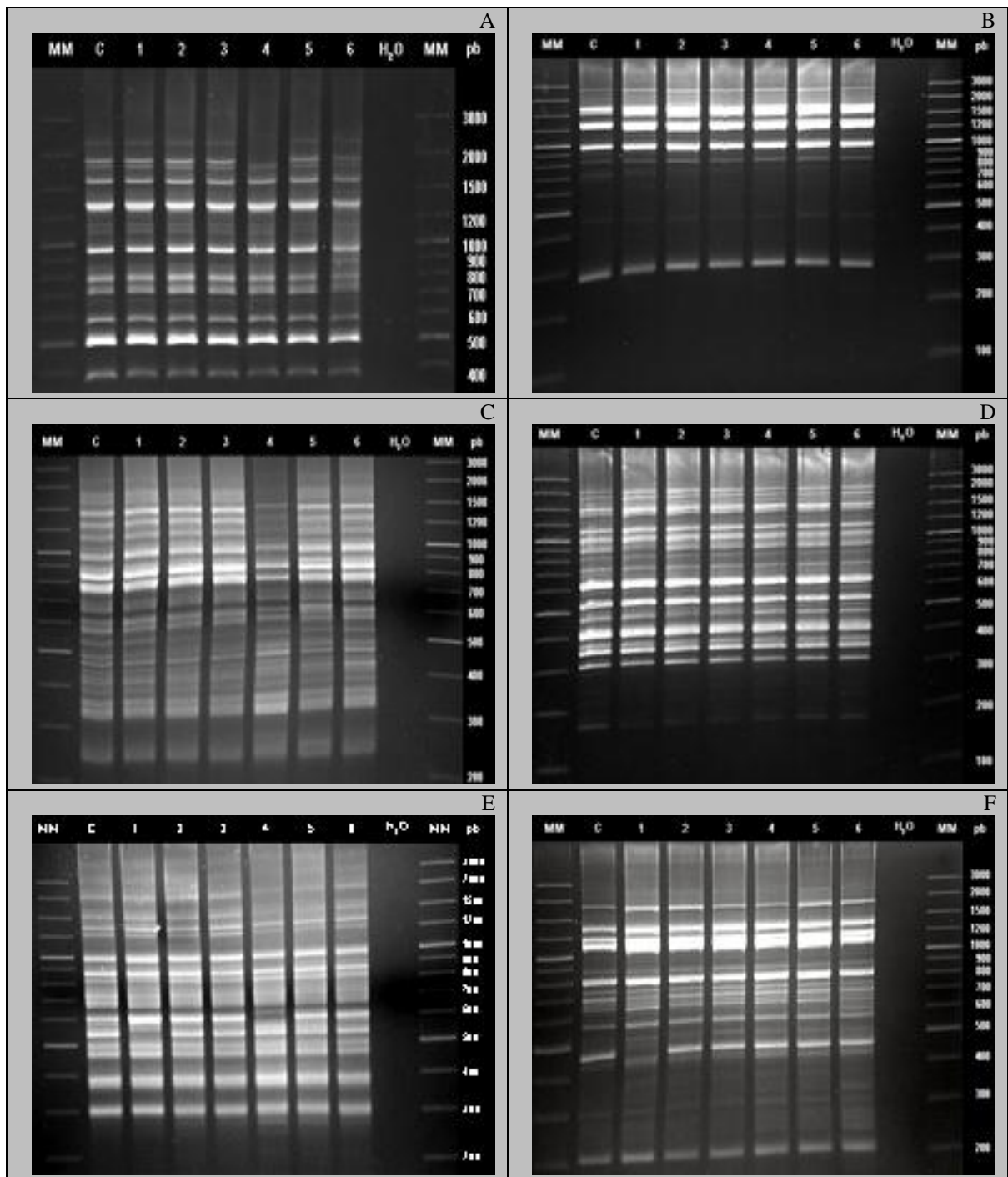


**Fig. 7.1.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido con los siguientes *ISSRs*: (A) 17899, (B) AE<sub>2</sub>, (C) D12, (D) HB13, (E) HB14 y (F) ISSR1C. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio).

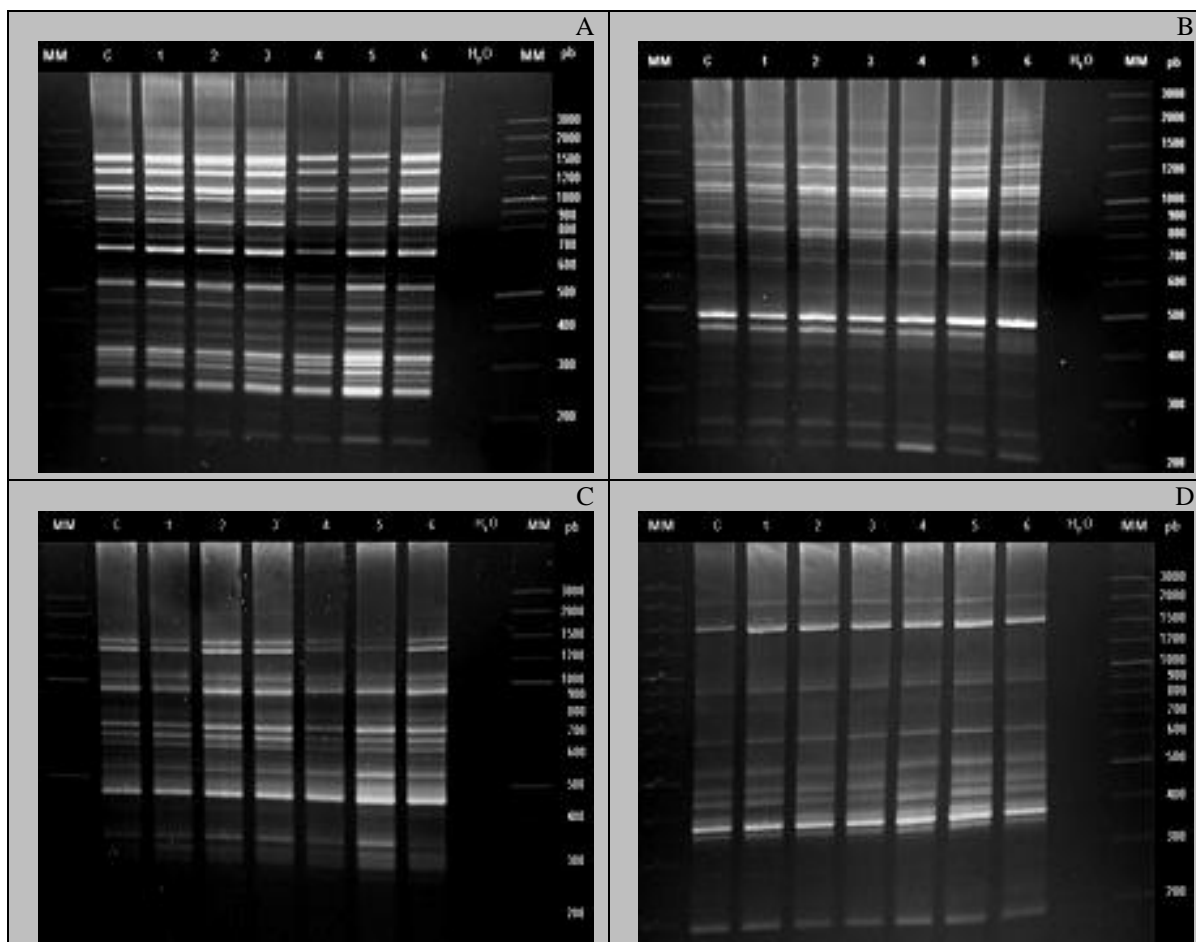




**Fig. 7.2.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido con los siguientes *ISSRs*: (A) *ISSR1E*, (B) *ISSR4*, (C) *ISSR8C*, (D) *ISSR9E*, (E) *ISSR9C* y (F) *RAF16*. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio).



**Fig. 7.3.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido con los siguientes *ISSRs*. (A) RAF4, (B) RAF9, (C) UBC816, (D) UBC825, (E) UBC827 y (F) UBC834. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio).



**Fig. 7.4.** Detección de variabilidad genética utilizando *ISSRs* en plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido con los siguientes *ISSRs*: (A) UBC840A, (B) UBC840B, (C) UBC850, (D) UBC864. MM: Marcador de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). C: ADN de planta dadora de anteras (NR 51). Calles 1 al 6: ADN de 6 plantas regeneradas *in vitro* de buffelgrass. H<sub>2</sub>O: Control negativo (*mix* de la PCR menos el ADN molde de la planta en estudio).