

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, AGRONÓMICA Y  
MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE  
*BROMUS BREVIS* NESS (SECCIÓN *CERATOCHLOA*)**

**MARIANA JIMENA FERREYRA**

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al  
Grado de *MAGISTER SCIENTIAE*

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS. UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL  
PLATA  
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria

Balcarce, Argentina

Febrero 2008

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, AGRONÓMICA Y  
MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE  
*BROMUS BREVIS* NESS (SECCIÓN *CERATOCHLOA*)**

**MARIANA JIMENA FERREYRA**

**Comité consejero**

**Ing. Agr. M. Sc. Sara Alonso**

-----  
**Director de Tesis**

**Ing. Agr. M. Sc. Andrea Clausen**

-----  
**Asesor**

**Dr. Sergio Feingold**

-----  
**Asesor**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, AGRONÓMICA Y  
MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE  
*BROMUS BREVIS* NESS (SECCIÓN *CERATOCHLOA*)**

**MARIANA JIMENA FERREYRA**

Aprobada por:

Ing. Agr. M. Sc. Sara Alonso

-----  
Director de Tesis

Dr. Pedro Rimieri

-----  
Evaluador Externo

*A María E., Héctor,  
Agus y Carlos*

## Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a la Ing. Sara Alonso por su gran dedicación, sus enseñanzas y el apoyo brindados durante todo el transcurso de la realización de esta tesis.

A la Ing. Andrea Clausen por otorgarme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo y por la lectura crítica y aportes realizados al mismo.

Al Ing Sergio Feingold, por contribuir no solo con sus conocimientos científicos sino también con su calidez humana.

A la Ing. María del C. Menéndez por su comprensión y por su respaldo que aseguraron la continuidad y la finalización de este trabajo.

A Abel, Alejo, Susana, Fernanda, Mara Castaño y Leandro por su colaboración en el trabajo de campo y las gratas horas compartidas en “laboratorio, invernáculo y a campo”.

A las chicas de PROPAPA, Gabi, Erika, Nati y Silvina principalmente por su amistad y también por sus enseñanzas, por tantos momentos lindos y por su colaboración desinteresada, ¡¡¡¡MUCHAS GRACIAS !!!!

A Ariana Digilio por hacerme sentir siempre “como en casa”, desde el primer al último día de mis estancias en Balcarce y por continuar brindándome su amistad aún en la distancia.

A mi gran amiga Verónica Ispizúa, por hacerme sentir “en familia”, acompañándome siempre en todos los momentos, buenos y malos, por ayudarme a superar algunos obstáculos relacionados con la distancia y la nostalgia, por compartir conmigo sus “tesoros” y por su fortaleza y apoyo incondicional.

A mis padres, hermanos y a Agus, porque los adoro y a ellos les debo quien soy.

A Carlos, por su comprensión, por ser mi sostén y sobre todo, por su amor absoluto.

Y a todos los que de alguna manera u otra colaboraron para que la realización de este trabajo fuera posible.

## ÍNDICE

	Página
Índice de tablas	xi
Índice de figuras	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
1-La Familia <i>Gramineae</i>	4
2-El género <i>Bromus</i>	5
2.1-Características generales	5
2.2-Taxonomía	8
2.2.1-Sección <i>Ceratochloa</i> (P. Beauv.) Griseb.	9
2.2.2- <i>Bromus brevis</i> Nees ex Steud.	11
3-Variabilidad en las especies del género <i>Bromus</i>	14
3.1-Characterización morfológica y agronómica	16
3.2-Characterización molecular	17
3.2.1-RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)	18
3.2.2-AFLP	19
3.2.3-Microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats)	19
3.2.4-ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)	20
3.2.5-Índice de diversidad	21
3.2.6-Uso de marcadores moleculares en el género <i>Bromus</i>	21
3.3-Distribución de la variabilidad en función del ambiente	22
4-Importancia de los recursos genéticos de especies forrajeras nativas	23
MATERIALES Y MÉTODOS	26
1-GERMOPLASMA	26

2-Characterización y evaluación preliminar	27
2.1-Multiplicación de Semilla Original	27
2.1.1-Manejo de las poblaciones	28
2.1.2-Caracteres registrados sobre espiguillas y antecios	28
3-Siembra en Invernáculo	29
3.1-Manejo de las poblaciones	29
3.2-Caracteres registrados en la etapa de plántula	30
4-Transplante en el campo	30
4.1- Manejo de las poblaciones	30
4.2- Caracteres registrados en las etapas de juvenil y adulto	32
5-Characterización molecular	32
5.1-Extracción del ADN	32
5.2-Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	35
5.2.1-Selección de Cebadores	35
5.2.1.1.1- RAPDs	36
5.2.1.1.2 -Visualización de los productos de amplificación	37
5.2.1.2.1-SSRs	37
5.2.1.2.2-Separación de los productos de amplificación	38
5.2.1.3-ISSRs	38
5.2.2-Registro de bandas	39
6-Análisis de datos	40
6.1-Análisis univariado	40
6.2-Análisis Multivariado	41
6.2.1-Análisis de agrupamiento y ordenación	41
6.2.1.1-Datos Cuantitativos	42
6.2.1.2-Datos Cualitativos	42

6.2.2-Comparación de matrices	43
6.3-Índice de Diversidad	43
6.4-Análisis de la Varianza Molecular	43
RESULTADOS	45
1-Caracteres Morfológicos y Agronómicos	45
1.1-Caracteres Cualitativos	45
1.1.1-Pubescencia	45
1.1.1.1-Pubescencia de las glumas y la lemma	45
1.1.1.2-Pubescencia de las hojas	45
1.1.2-Hábito de crecimiento	46
1.1.3-Color de las vainas	47
1.1.4-Carbón de la Panoja	47
1.1.5-Afinidad entre las poblaciones	48
1.1.5.1-Análisis de Agrupamiento	48
1.1.5.2-Análisis de Ordenación	50
1.2-Caracteres Cuantitativos	52
1.2.1-Caracteres Morfológicos de Espiguillas y Antecios	52
1.2.2-Emergencia de Plántulas	55
1.2.3-Tamaño de las Láminas	58
1.2.3.1-Longitud y Ancho foliar durante el estadio de Plántula	58
1.2.3.2-Longitud foliar durante los estadios Juvenil y Adulto	60
1.2.4-Número de Macollos por Planta	62
1.2.5-Altura del canopeo, hasta la hoja bandera y máxima	66
1.2.6-Producción de Materia Seca	68
1.2.7-Componentes de la Panoja	70
1.2.8-Afinidad entre las Poblaciones	72
1.2.8.1-Análisis de agrupamiento	72

1.2.8.2-Análisis de ordenamiento	73
2-Characterización molecular	76
2.1-Productos de amplificación de RAPDs	76
2.2-Productos de amplificación de SSRs	76
2.3-Productos de amplificación de ISSRs	77
2.3.1-Índice de Diversidad (DI)	77
2.3.2-Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA )	79
2.3.3-Afinidad entre las poblaciones en base a los caracteres moleculares	79
2.3.3.1-Análisis de agrupamiento	79
2.3.3.2-Análisis de ordenamiento	80
2.3.4-Relación entre los agrupamientos basados en diferentes tipos de caracteres	84
2.3.4.1-Caracteres morfológicos cualitativos y caracteres moleculares	84
2.3.4.2-Caracteres morfológicos cuantitativos y caracteres moleculares	84
3-Sitios de colecta	86
3.1-Characterísticas de los sitios de colecta	86
3.2-Sitios de colecta y características de las poblaciones	89
3.2.1-Relación entre sitios y caracteres cualitativos	89
3.2.2-Relación entre sitios y caracteres cuantitativos	89
3.2.3-Relación entre sitios y caracteres moleculares	90
DISCUSION	91
1.1-Characteres Cualitativos	91
1.1.1-Pubescencia de las estructuras vegetativas y reproductivas	91
1.1.2-Hábito de crecimiento	92
1.1.3-Color de las vainas	93
1.1.4-Carbón de la Panoja	94

1.1.5-Relación entre entradas en base a las características cualitativas	94
1.2-Caracteres Cuantitativos	96
1.2.1-Caracteres Morfológicos de Espiguillas y Cariopses	96
1.2.2-Emergencia de plántulas	100
1.2.3-Tamaño de las Láminas	101
1.2.3.1-Longitud y Ancho foliar durante el estadio de Plántula	101
1.2.3.2-Longitud foliar durante los estadios Juvenil y Adulto	102
1.2.4-Número de Macollos	105
1.2.5-Altura del canopeo, hasta la hoja bandera y máxima	108
1.2.6-Producción de Forraje	110
1.2.7-Componentes de la Panoja	113
1.2.8-Afinidad entre las Poblaciones	114
2.1-Productos de amplificación de RAPDs	117
2.2-Productos de amplificación de SSRs	118
2.3-Productos de amplificación de ISSRs	119
2.3.2-Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA )	121
2.3.3-Afinidad entre las poblaciones	123
2.3.4-Asociación entre los caracteres morfológicos y los caracteres moleculares	123
3-Sitios de colecta	126
3.1-Características de los sitios de colecta	126
3.2.1-Relación entre los Sitios y los caracteres cualitativos de las Poblaciones	127
3.2.2-Relación entre los Sitios y los caracteres cuantitativos de las Poblaciones	128
3.2.3-Relación entre los Sitios y los caracteres moleculares de las Poblaciones	129
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFIA	132

APENDICE	142
Tabla I: Distritos agroclimáticos	142
Tabla II Secuencias de marcadores (M) de tipo SSR utilizados	143
Tabla III: Caracteres morfoagronómicos cuantitativos utilizados para realizar el análisis multivariado de las poblaciones	144
Tabla IV: Presencia (1) o ausencia (0) de pubescencia en las glumas y la lemma	145
Tabla V: Promedios poblacionales para longitud (L) y ancho de las estructuras de la espiguilla y el cariopse	146
Tabla VI: Promedios poblacionales para caracteres relacionados con la emergencia de plántulas	147
Tabla VII: Promedios poblacionales para el tamaño foliar de las plántulas	148
Tabla VIII: Longitud foliar en diferentes fecha (F) y longitud de la hoja bandera	149
Tabla IX: Número de macollos vegetativos (Veget) en el estadio de plántula y en dos fechas y macollos reproductivo, totales y prolificidad en fecha 2	150
Tabla X: Altura total, hasta la hoja bandera y hasta el canopeo	151
Tabla XI: Materia seca (MS) por planta en dos fechas (F1 y F2) y acumulada, y peso de los macollos (PM) en F1 y F2	152
Tabla XII: Número de cariopses por espiguilla, de espiguillas por panoja y longitud de la panoja	153

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1: Número de colección o de entrada y procedencia de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y <i>B. catharticus</i> utilizadas	26
2: Caracteres registrados sobre las espiguillas y los antecios	29
3: Caracteres registrados desde emergencia al estadio de plántula	30
4: Caracteres registrados durante la etapa juvenil y adulta, características del registro y número de plantas observadas por repetición ()	33
5: Código, secuencia de bases y peso molecular (PM) de los marcadores de tipo RAPDs utilizados	35
6: Código, motivos y tamaño en pares de bases (pb) de los marcadores de tipo SSR utilizados	36
7: Código y secuencia de los ISSR utilizados	36
8: Valor $p$ de los ANOVAS para los caracteres del antecio y las espiguillas, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>Bromus catharticus</i> ( <i>B. cat.</i> )	52
9: Valor $p$ de los ANOVAS para emergencia inicial y final, valores mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>B. catharticus</i> ( <i>B. cat.</i> )	56
10: Valor $p$ de los ANOVAS para longitud y ancho foliar de las plántulas, valores mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>Bromus catharticus</i> ( <i>B. cat.</i> )	58
11: Valor $p$ de los ANOVAS para longitud foliar en tres fechas y de la hoja bandera, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>Bromus catharticus</i> ( <i>B. cat.</i> )	60
12: Valor $p$ de los ANOVAS para número de macollos (Mac) vegetativos en el estadio de plántula, de juvenil (F1) y de adulto (F2), número de macollos reproductivos y totales en F2 y prolificidad, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>Bromus catharticus</i> ( <i>B. cat.</i> )	63
13: Valor $p$ de los ANOVAS para altura del canopeo y hasta la hoja bandera y altura máxima en plantas en floración, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>B. catharticus</i> ( <i>B. cat.</i> )	67

14: Valor $p$ de los ANOVAS para producción de materia seca (MS) en dos fechas (F1 y F2) y acumulada, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>B. catharticus</i> ( <i>B.cat.</i> )	69
15: Valor $p$ de los ANOVAS para número de espiguillas por panoja y de cariopses por espiguilla, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> y promedio de la población de <i>B. catharticus</i> ( <i>B.cat.</i> )	71
16: Número de bandas, de patrones e Índice de Diversidad (DI) para cada cebador de tipo ISSR utilizado	77
17: Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) para las 20 poblaciones de <i>B. brevis</i> y la población testigo de <i>B. catharticus</i> analizadas con los 3 marcadores ISSR	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1: Vista parcial del ensayo a campo de las poblaciones de <i>Bromus brevis</i> , correspondiente a inicios del estadio adulto	31
2: Porcentaje de plantas de cada tipo de porte en cada una de las 20 poblaciones de <i>B. brevis</i> y en la población testigo de <i>B. catharticus</i>	46
3: Porcentaje de plantas con, vainas verdes y vainas púrpuras en cada una de las 20 poblaciones de <i>B. brevis</i> y en la población testigo de <i>B. catharticus</i>	47
4: Dendrograma obtenido a partir de los datos morfológicos cualitativos, utilizando el coeficiente de similitud de emparejamiento simple (SM)	48
5: Dendrograma obtenido a partir de los datos morfoagronómicos cualitativos, utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard (J)	49
6: Agrupamiento obtenido a partir del análisis de Coordenadas Principales realizado utilizando el coeficiente de Jaccard	51
7: Promedio de las longitudes de la gluma inferior (LGi), la superior (LGs), la lemma (LLe) y el pedicelo (LPe), y del ancho del antecio (ACa) de semillas del testigo ( <i>Bromus catharticus</i> ) y valores medios, mínimos y máximos para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	54
8: Promedio de la longitud de la arista (Lar) del testigo ( <i>Bromus catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	55
9a: Promedio de emergencia de plántulas inicial (EIn) y final (EFi) del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	57
9b: Promedio del índice de emergencia (I Em), en días, del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	57
10a: Longitud foliar (LFo) promedio del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	59
10b: Ancho foliar (AFo) promedio del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	59
11: Longitud foliar promedio en tres fechas (F1, F2 y F3) durante el estadio vegetativo y de la hoja bandera (HB) del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	61

12: Número de macollos vegetativos promedio de los estadios de plántula (MPI), juvenil (MVF1) y adulto (MVF2) y número de macollos reproductivos (MRF2) , totales (MTF2) y prolificidad (Pr) del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	64
13: Promedio de la altura del canopeo (AIC) y hasta la hoja bandera (AIHB) y altura máxima (AIT) del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	68
14: Promedio de la materia seca en el corte 1 (MSF1), en el corte 2 (MSF2) y de la acumulada en los dos cortes (MSAc) del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	69
15. Promedio del número de cariopses por espiguilla (C/e) y de espiguillas por panoja (E/p) del testigo ( <i>B. catharticus</i> ) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de <i>B. brevis</i>	71
16: Dendrograma obtenido a partir de los datos morfológicos y agronómicos cuantitativos, utilizando el coeficiente de distancia taxonómica	73
17: Ordenamiento de las poblaciones en función de los componentes principales R1 y R2, obtenido a partir de los datos morfológicos y agronómicos cuantitativos	75
18: Índice de Diversidad (DI) por ISSR y por población	78
19: Análisis de coordenadas principales. Representación de la dispersión de los 147 individuos, a partir del coeficiente de similitud de emparejamiento simple calculada utilizando los datos moleculares de los 3 cebadores ISSR utilizados	82
20: Representación de la ubicación media de las poblaciones sobre las dos primeras coordenadas y agrupamiento a partir de la similitud obtenida utilizando los 3 cebadores ISSR	83
21: Eco-regiones a las que pertenecían los sitios de colecta de las entradas de <i>Bromus brevis</i> y <i>B. catharticus</i> . Mapa extraído de Bertonati y Concuera, 2000	86
22: Agrupamiento de los sitios de origen obtenido a partir del análisis de Componentes Principales	87

## RESUMEN

*Bromus brevis* (cebadilla pampeana) es una apreciable forrajera nativa de zonas áridas y semiáridas de la Argentina. En los bancos de germoplasma del INTA de Balcarce y Anguil se conservan entradas de esa especie cuya variabilidad no ha sido descrita completamente, lo que es fundamental para su conservación y utilización. Con el objetivo de caracterizar este germoplasma se analizaron 20 entradas de *B.brevis* y una de *B.catharticus* como testigo, mediante 33 caracteres morfológico-agronómicos y 3 tipos de marcadores de ADN. Se encontró variación para los caracteres cualitativos y diferencias significativas en casi todos los cuantitativos; en pocos casos el testigo difirió de las poblaciones de *B.brevis*. Los marcadores ISSR revelaron 58 bandas (índice de diversidad entre 0,97 y 0,98). El 56 % de la variabilidad molecular correspondió a variación intrapoblacional. Los análisis multivariados reunieron a las poblaciones en grupos bastante coincidentes utilizando caracteres cualitativos morfológicos, cualitativos moleculares y cuantitativos, pero la asociación fue baja y no significativa entre matrices con diferente tipo de caracteres. La relación entre características morfológico-agronómicas de las poblaciones y su origen tampoco resultó significativa, aunque las poblaciones con mejor comportamiento agronómico procedían de la eco-región Espinal. No se observó ningún patrón molecular específico para una determinada eco-región.

La variabilidad morfológica, agronómica y molecular observada sugiere que estas poblaciones de *B.brevis* pueden utilizarse para obtener variedades con mejor comportamiento en implantación, producción de forraje y de semilla, así como para ampliar la base genética de *B.catharticus*.

Palabras claves: *Bromus brevis*, variabilidad, caracterización, poblaciones, sitios, ISSR.

## ABSTRACT

*Bromus brevis* (cebadilla pampeana) is a valuable native forage of arid and semiarid zones of the Argentina. Germplasm Banks of Balcarce and Anguil (INTA) conserves accessions of this species which variability has not been decrypted completely, which is fundamental for its conservation and utilization. With the aim to characterize this germplasm there were analyzed 20 accessions of *B.brevis* and 1 of *B. catharticus* as control, by means of 33 morphologic-agronomic characters and 3 molecular techniques. Variation was found for the qualitative characters and significant differences in almost all the quantitative ones; in few cases the control differed of the populations of *B.brevis*. ISSRs primers revealed 58 bands (Diversity Index: between 0,97 and 0,98). Fifty six percent of the molecular variability corresponded to the intrapopulation variance. The multivariate analyses assembled the populations in similar enough groups using qualitative morphologic, qualitative molecular and quantitative characters, but the correlation was low and not significant between matrix of different type of characters. The relation between morphologic-agronomic characteristics of the populations and their origin did not also turn out to be significant, although the populations with better agronomic behavior proceed of the Espinal. There was not a specific molecular patron for a determinate eco-region.

The morphological, agronomic and molecular observed variability suggest that this populations of *B.brevis* can be used for varieties development with better behaviour in implantation, on forage and seed production, as well as for extending the genetic base of *B.catharticus*.

Key words : *Bromus brevis*, variability, characterization, populations, sites, ISSR.

## INTRODUCCION

En el género *Bromus* L., la sección *Ceratochloa* (P. Beauv.) Griseb, incluye especies llamadas comunmente "cebadillas", que son gramíneas nativas de la Argentina de importancia forrajera. Son especies preferidas por lo que sus poblaciones son consumidas por el ganado directamente en los pastizales naturales de donde son originarias (Covas e Itria, 1969; Cámara Hernández, 1970). En cambio, algunas de ellas ya han sido introducidas al cultivo para su utilización en pasturas consociadas o como verdeos invernales, como es el caso de *Bromus catharticus* Vahl., *B. parodii* Covas et Itria, *B. stamineous* Desv. y *B. brevis* Ness., (Ruiz et al., 1995; Bellozas et al., 2000).

*Bromus brevis* ("cebadilla pampeana"), es una especie nativa que se halla distribuida en la estepa pampeana, en los bosques centrales, en el monte occidental y en el norte patagónico. Es más resistente a la sequía y a las bajas temperaturas que la "cebadilla criolla" (*B. catharticus*), se desarrolla sin inconvenientes en suelos arenosos y constituye un preciado recurso para la zona semiárida pampeana (Cabrera, 1970). Si bien en 1967 se obtuvo un cultivar de esta especie adecuado para las zonas semiárida y subhúmeda de la región pampeana (Gorostegui, 1971), el mismo no ha tenido mucha difusión (Ruíz et al., 1995), probablemente por su susceptibilidad al carbón de la cebadilla, característica señalada como su principal defecto (Gorostegui, 1971). La liberación de un cultivar al mercado requiere la realización de numerosas pruebas o estudios agronómicos a fin de determinar la aptitud de las líneas selectas, previo análisis de la magnitud y la naturaleza de la variación genética existente en el germoplasma disponible de la especie (Vivero Vidal, 1979; Rodríguez, 1981). El estudio de la variación contenida en el acervo genético de una especie es fundamental para su conservación y utilización.

La caracterización y la evaluación inicial de los recursos genéticos se inicia tradicionalmente mediante el uso de descriptores morfológicos y agronómicos, pero la información que éstos proporcionan, aunque irremplazable, tiene ciertas limitaciones. Es por ello que una mejor descripción e interpretación de la diversidad de las entradas de germoplasma puede obtenerse mediante el análisis complementario de marcadores bioquímicos y moleculares (Karp et al., 1997).

En los bancos de germoplasma de Balcarce y Anguil se conservan poblaciones de *B. brevis* procedentes de diferentes provincias argentinas, para las cuales no se ha realizado la descripción completa de la variabilidad que contienen. En cambio, en algunas poblaciones y líneas de *B. brevis* procedentes de La Pampa y Buenos Aires, Ruiz *et al.* (1995) y Covas y Ruiz (1999) detectaron variabilidad para algunos caracteres morfológicos, fisiológicos y agronómicos. Si bien en otras especies de *Bromus*, la diversidad genética fue analizada mediante marcadores RAPD y AFLP (Massa *et al.*, 2001; Puecher *et al.*, 2001b; Diaby y Casler, 2003; Ferdinandez y Coulman, 2002), hasta el momento no se han utilizado marcadores de ADN en la caracterización de germoplasma de *B. brevis* o su aplicación es incipiente (Cuyeu *et al.*, 2005).

El presente trabajo forma parte de un proyecto mayor tendiente a establecer la variabilidad presente en *Bromus brevis*, para lo cual se registraron caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares.

Considerando el germoplasma de *Bromus brevis* de diferentes provincias de la Argentina que se halla conservado en los bancos de las EEA de Anguil y Balcarce se postula que:

H1: Existe variabilidad entre poblaciones en caracteres morfológicos.

H2: Las poblaciones presentan diferente comportamiento agronómico.

H3: Existe variabilidad genética inter e intrapoblacional que puede ser evidenciada con marcadores moleculares.

H4: La variación está asociada con las condiciones climáticas de los sitios de los que proceden las poblaciones.

Por ello, los objetivos de este trabajo serán:

- Analizar la variación en entradas de *B. brevis* de diferente procedencia mediante el empleo de caracteres morfológicos, agronómicos y de marcadores de ADN.
- Analizar la relación entre la variabilidad encontrada y los parámetros climáticos asociados con el lugar de origen de las muestras.
- Comparar los resultados obtenidos a partir de la caracterización morfológica y agronómica con los de la caracterización molecular.

## ANTECEDENTES

### 1-La Familia *Gramineae*

La Familia *Gramineae* es una de las mayores del reino vegetal por la cantidad de especies que contiene, ya que comprende unos 700 géneros y cerca de 10000 especies distribuidas en todo el mundo (Nicora y Rógolo, 1987). Se encuentran presentes en todas las latitudes, desde el nivel del mar hasta en las altas montañas, viven en regiones frías o tropicales e intermedias, así como en suelos inundados o secos hasta desérticos y, en áreas con bajas precipitaciones anuales, integran la vegetación clímax (Nicora y Rógolo, 1987; Zoomlefer, 1994). Específicamente para la región de las pampas y campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil el número de gramíneas es de 553 especies (Bilenca y Miñarro, 2004), pero si se consideran solo las regiones de la Argentina, se cuenta con 187 géneros y alrededor de 1130 especies entre nativas, naturalizadas y cultivadas (Nicora y Rógolo, 1987).

La importancia económica de la gramíneas es muy destacada dado que, si bien muchas especies se destacan por ser perjudiciales, como es el caso de las malezas y tóxicas (Marzocca, 1994), a esta familia pertenecen las cuatro plantas más cultivadas en el mundo: el trigo, el arroz, el maíz y la caña de azúcar, alimentos básicos para el hombre (Nicora y Rógolo, 1987). Existen numerosas gramíneas cultivadas por el valor alimenticio de sus granos, como también por ser importantes forrajeras, naturales o cultivadas, las que constituyen el alimento básico para el desarrollo de la ganadería (Nicora y Rógolo, 1987; Zomlefer, 1994). Las gramíneas se destacan por sus cualidades nutricionales para los rumiantes y sus efectos benéficos para mejorar la estructura, mantener la fertilidad y controlar la erosión de los suelos. Se adaptan a crecer solas o en mezclas con otras especies gramíneas o leguminosas y en diferentes condiciones de suelo (Pagano y Rimieri, 1989). Se estima que en el mundo,

aproximadamente el 75% de las especies gramíneas se utilizan para forraje (Pagano y Rimieri, 1989). De ellas, una alta proporción forma parte de pastizales silvestres o seminaturales y sólo unas pocas son incluidas en pasturas monoespecíficas o en mezclas. En tal sentido, Millot (1969) mencionó que se hallan bajo cultivo alrededor de 40 gramíneas forrajeras, de las cuales el 10% procede del Centro de Origen Sudamericano, de especies de los géneros *Axonopus*, *Paspalum* y *Bromus*.

En la Argentina se cultivan gramíneas exóticas anuales o perennes para formar praderas permanentes, varias de las cuales se han naturalizado (Nicora y Rúgolo, 1987; Mazzanti *et al.*, 1992; Alonso e Ispizúa, 1996; Echeverría *et al.*, 2001). Además, una alta proporción de gramíneas indígenas integran pasturas naturales, tales como varias especies de los géneros *Bromus*, *Festuca*, *Hordeum*, *Poa*, *Agrostis*, *Elymus* y *Stipa* entre las invernales y de *Paspalum*, *Setaria*, *Eragrostis*, *Andropogon* y *Bothriochloa* entre las estivales (Nicora y Rúgolo, 1987). En la región pampeana húmeda y subhúmeda la vegetación natural contiene muchas especies forrajeras útiles (Rosso, 2001; Echeverría *et al.*, 2001). Entre ellas se destacan varias especies del género *Bromus* de importancia no sólo en la región pampeana húmeda, subhúmeda y semiárida de la Argentina (Covas e Itria, 1969; Cámara Hernández, 1970 y 1978; Echeverría *et al.*, 2001), sino también en los campos del Uruguay (Rivas y Pinto Oliveira, 2001).

## **2-El género *Bromus***

### **2.1-Características generales**

El género *Bromus* L., del griego *Broma* = alimento, pertenece a la subfamilia *Pooideae*, tribu *Poeae*, e incluye alrededor de 150 especies distribuidas principalmente en las regiones templadas del mundo (Gutiérrez y Pensiero, 1998).

El número cromosómico básico del género *Bromus* es  $x = 7$  y en sus especies pueden encontrarse distintos niveles de ploidía: 2x, 4x, 6x, 8x, 10x y 12x (Gutiérrez y Pensiero, 1998). Las plantas de las especies de este género pueden ser anuales, bienales o perennes; cespitosas o rizomatosas, con cañas floríferas generalmente erectas, a veces decumbentes; nudos glabros o pilosos; vainas inferiores glabras, escabrosas o pubescentes, sólo abiertas en su parte superior; lígula membranácea, glabra; láminas lineares, planas o conduplicadas, glabras, escabrosas o pubescentes (Cámara Hernández, 1970 y 1978, Nicora y Rúgolo, 1987). La estructura anatómica foliar es propia de las especies con proceso fotosintético tipo C3 (Zomlefer, 1994; Gutiérrez y Pensiero, 1998).

Las inflorescencias se caracterizan por ser en panoja laxa o contraída, con ramificaciones con o sin ondulaciones; espiguillas pediceladas, lateralmente comprimidas o cilíndricas, 2-multifloras, con 2 glumas generalmente desiguales, persistentes, glabras, escabrosas o pubescentes. Cariopses alargados, pilosos en el ápice, soldados a la pálea y caedizos a la madurez; embrión pequeño, menor de 1/3 de la longitud del cariopse (Cámara Hernández, 1970 y 1978, Gutiérrez y Pensiero, 1998).

Las especies de éste género no presentan apomixis, existiendo especies autóгамas y alógamas (Rivas, 2001b). Sobre la autogamia-alogamia de las especies existen datos contradictorios basados en estudios de variación morfo-fenológicos (Naranjo, 1992; Rivas 2001b, Aulicino y Arturi, 2002). Si bien la mayoría de las especies no pueden clasificarse estrictamente como autóгамas o alógamas, sí se puede determinar un modo reproductivo prevalente (Rivas, 2001c). Las principales diferencias entre ambos grupos de plantas se dan en la distribución de la diversidad genética. En autóгамas las plantas son homocigotas y las poblaciones están fuertemente estructuradas en líneas puras; las diferencias genéticas entre poblaciones suelen ser mayores que en alógamas. Las especies con fecundación cruzada tienen

plantas heterocigotas y las poblaciones presentan una importante diversidad genética basada en las diferencias genéticas entre los individuos, no existiendo una estructuración de las mismas (Jain, 1975). En el género *Bromus* existen diferentes sistemas genéticos que afectan el sistema reproductivo; algunas son chasmógamas autoincompatibles o autocompatibles y otras son cleistógamas (Naranjo, 1992).

En la Argentina se distribuyen 25 especies de *Bromus* entre las cuales se encuentran varias adventicias introducidas de Europa, tales como *B. hordaceus* L., *B. tectorum* L., *B. rigidus* Roth. y otras. Muchas especies nativas perennes son excelentes forrajeras de invierno y primavera, como es el caso de: *B. catharticus* Vahl, *B. auleticus* Trin. Ex Ness, *B. brevis* Nees, *B. coloratus* Steudel, *B. araucanus* Philippi var. *obtusiflorus* (Hackel) Cámara y *B. setifolius* Presl. (Nicora y Rúgolo, 1987). Estas autoras mencionan que: *B. catharticus* (cebadilla criolla) es una especie de amplia distribución que en suelos fértiles se desarrolla con facilidad y semilla en abundancia; *B. auleticus* (cebadilla chaqueña) es una buena forrajera nativa, propia de pasturas mixtas de repoblación, especialmente en las regiones semiáridas del país; *B. brevis* (cebadilla pampeana) es muy resistente a la sequía y su mejoramiento puede tener importancia para ciertas regiones, tal como las zonas áridas y semiáridas de sudamérica (Covas e Itria, 1969) y la zona sub-húmeda de la región pampeana (Cámara Hernández, 1970) tanto en campos naturales como en pasturas implantadas (Ruíz *et al.*, 1995); *B. coloratus* (cebadilla magallánica) es originaria de la región magallánica donde es un forraje importante, se extiende en la región andino-patagónica, desde Tierra del Fuego donde es común hasta Neuquén y puede producir buen follaje en lugares húmedos, lo que representa una posibilidad como buena forrajera (Cámara Hernández, 1978); *B. araucanus* (cebadilla patagónica) vive en la precordillera desde Neuquén hasta Tierra del Fuego y es una forrajera silvestre valiosa, muy comida por el ganado; *B. setifolius* (cebadilla patagónica) es uno de los

pastos tiernos más importantes de la estepa patagónica y ha dado muy buenos resultados en los ensayos de resiembra realizados en la Patagonia.

Algunas especies presentan problemas de sanidad que causan perjuicios a la producción de semilla comercial como ocurre con el carbón de la panoja (*Ustilago bullata* Berk.) en *Bromus catharticus*, *B. parodii* Covas et Itria, *B. brevis* y otras especies del género (Covas *et al.*, 1995). Otra característica de importancia agronómica es la dormición de la semilla, característica común del género, lo que dificulta los análisis de laboratorio y ocasiona problemas de implantación en siembras a campo (Ruiz *et al.*, 1997).

La mayoría de las especies de *Bromus* americanas no se han domesticado ni han sido sometidas a procesos de mejora genética. Estas especies son consumidas por el ganado que pastorea pastizales naturales o poco modificados, pero para algunas de ellas existen programas de domesticación y mejoramiento que han dado lugar a distintos cultivares (Rivas y Pinto Oliveira, 2001; Maddaloni y Ferrari, 2001). Una de las especies más cultivadas es la cebadilla criolla (*Bromus catharticus*) y en la Argentina el cultivar más difundido se denomina “Martín Fierro MAG” (Rosso, 2001). También en la Argentina se obtuvieron cultivares de otras cebadillas, entre ellas de cebadilla intermedia (Covas *et al.*, 1993) y de cebadilla pampeana (Covas e Itria, 1969). Además, en la EEA Covas también se obtuvo la variedad “Pampera INTA” de cebadilla chaqueña (Traverso, 2000). Esta última especie también fue incluida en planes de mejoramiento en Uruguay, obteniéndose los cultivares “Potrillo” y “Zarco” (Rivas, 2001a).

## **2.2-Taxonomía**

Las características que presenta el género *Bromus* permiten una fácil diferenciación del resto de los géneros que integran la familia de las Poáceas. Al mismo tiempo, las

especies que se incluyen dentro de éste género poseen características que permiten reunirlos en grupos bien definidos (Gutiérrez y Pensiero, 1998). En tal sentido, algunos autores agruparon las especies en secciones (Cámara Hernández, 1978, Nicora y Rúgolo, 1987) mientras que otros consideraron subgéneros (Covas, 1981; Matthei, 1986, citado por Gutiérrez y Pensiero, 1998, Stebbins, 1981, citado por Naranjo 1985). Smith (1970, citado por Gutiérrez y Pensiero, 1998) consideró que el agrupamiento por secciones es el más adecuado hasta tanto no se posea un conocimiento más profundo del grupo.

En la flora argentina el género *Bromus* fue dividido en cinco secciones: *Zeobromus* y *Stenobromus*, con especies adventicias originarias del Viejo Mundo, *Ceratochloa*, *Festucaria* y *Neobromus*, que reúnen especies indígenas de gran importancia como forrajeras (Nicora y Rúgolo, 1987). Gutiérrez y Pensiero (1998) en su revisión de este género mencionan que en la Argentina se encuentra representado por 30 especies y tres variedades botánicas, distribuidas también en 5 secciones, pero con distintas denominaciones: secc. *Bromus* con 6 especies; secc. *Ceratochloa* con 9 especies; secc. *Genea* con 5 especies; secc. *Pinigma* con 9 especies y las 3 variedades botánicas y secc. *Neobromus* con una especie. De las especies y variedades botánicas que se reconocen para Argentina, 13 corresponden a especies exóticas, mientras que las 17 especies y las variedades restantes son nativas, tres de ellas endémicas (Gutiérrez y Pensiero, 1998). Gran parte de las especies nativas del género se caracterizan por ser importantes forrajeras, especialmente las correspondientes a Sección *Ceratochloa* (Nicora y Rúgolo, 1987).

### **2.2.1-Sección *Ceratochloa* (P. Beauv.) Griseb.**

Esta sección incluye especies anuales, bienales o perennes, originarias de Sudamérica, África y el oeste de Norteamérica; las especies americanas se hallan

distribuidas desde Alaska hasta Tierra del Fuego, pero en su mayoría son nativas del sur de los Andes de Argentina y Chile (Nicora y Rógolo, 1987; Stewart, 1996; Massa *et al.*, 2001 y 2004). La especie tipo es *Bromus catharticus* y las especies de esta sección se diferencian de las de otras secciones porque presentan espiguillas fuertemente comprimidas, dorso de la lemma carenada, arista normalmente mas pequeña que la longitud de la lemma, a veces reducida a un mucrón, naciendo a menos de 1,5 mm del ápice (Gutiérrez y Pensiero, 1998).

Algunas especies son autocompatibles, con producción alternada de flores chasmógamas, adaptadas para polinización cruzada, y cleistógamas de autofecundación obligada (Covas 1981; Naranjo 1992; Covas *et al.*, 1993). La ocurrencia de cleistogamia o chasmogamia podría estar condicionada por el fotoperíodo y la humedad del suelo, pero también se ha mencionado que la floración chasmogámica generalmente ocurre al comienzo de la primavera y la cleistogámica al final de la primavera o durante el verano (Aulicino y Arturi, 2002).

Muchas de las especies de esta sección son variables, pobremente conocidas, a menudo difíciles de identificar y han sido mencionadas en varias publicaciones bajo diferentes nombres taxonómicos o sinonimias (Zuloaga *et al.*, 1994; Stewart, 1996). En Argentina las especies representadas de esta sección son: *B. bonariensis*, *B. brevis*, *B. catharticus*, *B. coloratus*, *B. lithobius* Trin, *B. mango* E. Desv., *B. parodii*, *B. cebadilla* Steud. y *B. tunicatus* Phil, cuya diferenciación puede establecerse mediante la clave dicotómica de Gutiérrez y Pensiero (1998). La cebadilla criolla es la especie más conocida y estudiada debido a su importancia como forrajera, reconocida tanto en los países americanos como en otros continentes, de la cual existen variedades comerciales (Covas e Itria, 1969; Rosengurtt, 1970; Nicora y Rógolo, 1987; Rosso, 2001). Las especies restantes son menos conocidas y sólo en algunas de ellas se han realizado estudios agronómicos, como en *B. parodii* y *B. brevis*, siendo esta última un

importante recurso en zonas semiáridas (Cámara Hernández, 1970), o descriptivos como en *B. coloratus*; *B. lithobius*; *B. mango* y *B. tunicatus* (Masa *et al.*, 2004).

### **2.2.2-*Bromus brevis* Nees ex Steud.**

Es una gramínea indígena de la región semiárida de la Republica Argentina cuyo nombre común es “cebadilla pampeana”. Se halla distribuida en la estepa pampeana, en los bosques centrales, en el monte occidental y en el norte patagónico (Cámara Hernández, 1970), habitando las provincias de Buenos Aires, Chubut, Entre Ríos, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro, San Juan, San Luís y Santa Cruz.

Es una especie de ciclo bienal a perenne pudiendo comportarse en algunas zonas como anual (Cámara Hernández, 1970). Se caracteriza por ser cespitosa, con escasas innovaciones de prefoliación conduplicada o plegada, cañas de (5-) 20-70cm de alto; nudos 1-3 glabros; vainas inferiores de 2-8cm de longitud, pubescentes, a veces glabras; lígula membranácea, glabra, de 2-4mm de longitud; láminas lineares, de 3-15cm de longitud por 0,2-0,45cm de ancho; glabras o pubescentes; inflorescencia en panoja erguida, densa, de 10-25cm de longitud, con ramificaciones rectas, de 0,4-5cm. de longitud; pedicelos de 0,2-3cm de longitud; espiguillas lateralmente comprimidas, de 15-24mm de longitud por 4-6mm de ancho, 5-8 (-12) floras; glumas desiguales, glabras o escabrosas, de ápice agudo, mayores de la mitad del largo de la lemma contigua, gluma inferior de 5,5-10,5mm de longitud, (5-)7- nervia; gluma superior de 6,5-11mm de longitud, 9(-11)- nervia; lemma del antecio basal de 9-12mm de longitud, glabra, escabrosa, de dorso carenado, 11 (-13)- nervia, mucronada o con arista subapical, recta, menor de 1mm de longitud; pálea del antecio inferior menor que el largo de su lemma, de 7-10mm de longitud; estambres 3, anteras de 3-4mm de longitud (Gutiérrez y Pensiero, 1998, Cámara Hernández, 1970).

Covas (1981) reporta que en *Bromus brevis*, “la floración es alternadamente chasmógama o cleistógama”, por lo cual se comporta como una autógama facultativa; las flores chasmógamas producen anteras largas, exertas, mientras que en las cleistógamas son cortas y quedan incluidas entre las glumelas. Según Naranjo (1985) *B. brevis* siempre inicia la floración en forma chasmógama (septiembre-octubre) y la finaliza con flores cleistógamas (octubre a mediados de enero), observándose un período intermedio en el que presenta ambos tipos de flores. Por el contrario, *B. catharticus* se presenta como la especie con mayor porcentaje de floración cleistógama e incluso puede presentar solo este tipo de floración (Naranjo, 1985). El hecho de que ocurran ambos tipos de floración en el mismo individuo con diferencias temporales puede tener alta incidencia en la variabilidad de la progenie (Jain, 1975), así como para la prospección y colecta ya que en función de ello se decide el tipo de muestreo a realizar (Marshall y Brown, 1975).

La cebadilla pampeana se caracteriza por ser más resistente a la sequía y a las bajas temperaturas que la cebadilla criolla (Covas, 1981). Debido a que *B. brevis* se desarrolla sin inconvenientes en suelos arenosos, constituye un valioso recurso para la zona semiárida pampeana, donde integra pastizales en los que vegeta desde mediados de otoño hasta fines de primavera (Cámara Hernández, 1970). En el monte árido aprovecha rápidamente una lluvia ocasional para germinar y desarrollarse hasta la madurez de los antecios, floreciendo a veces casi al ras del suelo, todo ello en el curso de unas pocas semanas, asegurándose así la supervivencia en un medio crítico (Covas, 2006).

Si bien la cebadilla pampeana presenta características morfológicas similares a las de la cebadilla criolla, es posible diferenciarlas debido a que la primera es de porte menor, con hojas más angostas de color verde-grisáceo cuyas láminas en los brotes jóvenes están plegadas en forma de V (prefoliación conduplicada), en lugar de arrolladas (prefoliación convolutada), siendo este carácter uno de los más constantes

(Covas, 1981). Las panojas y espiguillas son también menores en *B. brevis* y los antecios presentan el extremo mucronado o con arista corta, menor de 1mm, mientras que *B. catharticus* posee ápice agudo o con arista de hasta 4mm (Cámara Hernández, 1970; Gutiérrez y Pensiero, 1998). Sin embargo la diferenciación se complica sobre material herborizado (Gutiérrez y Pensiero, 1998), por lo que la detección de otros caracteres discriminantes, podrían facilitar la identificación de estas especies.

En los pastizales de la pampa semiárida o seca, la cebadilla pampeana es apreciada por suministrar forraje en invierno y primavera; el forraje si bien no es abundante, presenta buena a muy buena calidad, mostrando buena resistencia a la sequía y a las heladas (Covas, 2006). Debido al sobrepastoreo, las quemas y la ampliación de las zonas de cultivo se han ido perdiendo o erosionando las poblaciones de las especies nativas en general (Percz *et al.*, 2000) y de *B. brevis* en particular, a tal punto que en La Pampa se iniciaron trabajos de evaluación de poblaciones tendientes a la repoblación de esta especie en los campos de pastoreo de la provincia (J. Traverso, com. personal). Por otra parte, su valor forrajero en zonas con déficit hídrico determinó que se efectuaran trabajos de mejoramiento en la Estación Experimental Anguil (INTA), donde Itria obtuvo en 1967 el cultivar "Don Marcelo INTA", caracterizado por tener mayor palatabilidad y perdurabilidad que la cebadilla pampeana no mejorada y sanidad adecuada, si bien era susceptible al carbón de la cebadilla (Covas e Itria, 1969). Según Ruiz *et al.* (1995), este cultivar no alcanzó gran difusión, aunque no mencionan las causas de ello.

Además del valor forrajero que la cebadilla pampeana posee, es de interés para el mejoramiento de otras especies de la Sección *Ceratochloa*. En tal sentido Naranjo (1992) señala que por su alta cruzabilidad con *B. parodii*, *B. bonaeriensis* y *B. catharticus* podría servir como especie puente o pivote en futuros planes de mejoramiento de estas forrajeras. La caracterización conjunta de poblaciones de *B. brevis* con *B. catharticus*, brindaría información de las características en que resultan

más afines y o disímiles y en función de ello se podría decidir la utilización de *B. brevis* como puente para la transferencia de caracteres útiles a *B. catharticus* (Naranjo, 1985), la especie más importante desde el punto de vista forrajero de la Sección *Ceratochloa* (Gutiérrez y Pensiero, 1998).

### **3-Variabilidad en las especies del género Bromus**

La diversidad genética y el potencial productivo de las especies del género *Bromus* existentes en el Cono Sur, sustentan la prioridad que tienen la investigación y valorización de estos recursos fitogenéticos (Rivas y Pinto Oliveira, 2001). Rivas (2001b) expresa que es fundamental conocer el potencial productivo y la variabilidad genética existente para priorizar las actividades de colecta, conservación, caracterización, evaluación agronómica y domesticación – mejoramiento genético.

En relación a los recursos genéticos de forrajeras templadas, Rosso (2001) menciona que una de las actividades menos consideradas es la de caracterización y evaluación, existiendo solo un número limitado de colecciones en las que se dispone de esta información. Esto se debe a que en las especies forrajeras, es un proceso complejo y oneroso (Schultze-Kraft, 1990; Rosso, 2001). Tradicionalmente la caracterización de recursos genéticos en cultivos y forrajeras se realizó mediante el uso de descriptores morfológicos y agronómicos. El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR) sugiere, para la caracterización y evaluación preliminar de colecciones de germoplasma, el uso de descriptores estándares. Existen listas de descriptores para diferentes especies y, para especies forrajeras, el listado general de descriptores se complementa con modificaciones específicas según los objetivos del mejoramiento de cada especie (Rosso, 1989; Borrajo *et al.*, 1997 y 1998; Alonso *et al.*, 1999).

Los descriptores sugeridos por el IBPGR para la caracterización y evaluación preliminar de gramíneas forrajeras comprenden numerosos atributos cuali y cuantitativos que se registran en diferentes estadios de crecimiento (Tyler *et al.*, 1985).

Dentro de los descriptores cualitativos se encuentran los marcadores moleculares (Bramardi, *et al.*, 2000). Los marcadores genéticos del ADN presentan ventajas sobre los marcadores morfológicos. Son abundantes en estudios de una población segregante, son neutros, con mínimo o nulo efecto epistático o pleiotrópico y no presentan efecto ambiental. Algunos de ellos (RFLP, SSR) presentan la ventaja de ser codominantes. Pueden ser extraídos de semilla o de partes vegetativas en los primeros estadios de desarrollo de la planta con lo que se pueden acelerar generaciones en el proceso de mejora (Nuez y Carrillo, 2000). La utilización de marcadores moleculares en la caracterización y evaluación de recursos genéticos permite estimar la diversidad presente en las entradas de los Bancos de germoplasma, el grado de relación genética entre los diferentes cultivares, líneas y poblaciones de una especie, verificar el mantenimiento de la estructura genética y la estabilidad de los materiales luego de sucesivos ciclos de multiplicación para su regeneración, diferenciar genotípicamente los materiales a fin de detectar posibles duplicaciones y establecer asociaciones con caracteres de interés (Karp *et al.*, 1997). Además, la cuantificación de la variabilidad genética lograda con estos marcadores es más adecuada, en comparación con los caracteres morfológicos que pueden sobrestimarla debido a la plasticidad fenotípica. Sin embargo estas ventajas no implican que otros datos tradicionalmente usados para caracterizar la biodiversidad no sean valiosos. Los datos morfológicos, ecológicos y agronómicos proveen información práctica y crítica que es necesaria para caracterizar los recursos genéticos (Spooner *et al.*, 2005), por lo que ambos tipos de caracterización (tradicional y molecular) no son excluyentes sino complementarios.

### 3.1- Caracterización morfológica y agronómica

Entre los descriptores morfológicos y agronómicos sugeridos por el IBPGR (Tyler *et al.*, 1985) pueden mencionarse los siguientes: capacidad de macollaje, hábito de crecimiento en estado vegetativo, color del follaje, grado de pubescencia de las hojas, largo y ancho de hoja, estimaciones de la producción de forraje, uniformidad de la floración, cantidad de inflorescencias, hábito de crecimiento en estado reproductivo, los cuales han sido aplicados en diferentes trabajos de descripción de germoplasma de forrajeras gamíneas (Rosso, 1989, Borrajo *et al.*, 1997; Alonso 2004; Alonso y Monterubbianesi, 2006a). Para una evaluación más amplia se consideran otros caracteres más complejos como producción de materia seca, digestibilidad, persistencia, ancho y largo de la hoja bandera, altura (incluyendo la inflorescencia), susceptibilidad a distintos tipos de estrés, susceptibilidad a enfermedades e insectos (Rosso, 2001; Alonso *et al.*, 1999).

En la Argentina se han realizado numerosas acciones de colecta de germoplasma de forrajeras nativas, material que se halla conservado en bancos de germoplasma del INTA o instituciones afines (Clausen, 1997). Sin embargo los trabajos sobre caracterización y evaluación en general y del género *Bromus* en particular son escasos y se refieren a una o pocas poblaciones de una determinada especie o incluyen varias especies del género. Las dos especies que han sido objeto de mayor estudio son *Bromus auleticus* y *B. catharticus*. En cebadilla chaqueña se destacan los trabajos sobre variabilidad interpoblacional en diferentes caracteres realizados por Traverso y von der Pahlen (1982) y Traverso (2001). Con respecto a la cebadilla criolla, Rosso (2001) llevó a cabo tareas de colecta y caracterización de entradas procedentes de la región central de Argentina, mientras que Arturi *et al.* (1983) observaron la variabilidad y las correlaciones genéticas y fenotípicas presentes en 120 entradas. Para la misma especie, Aulicino y Arturi (2002) analizaron los componentes

genéticos y ambientales de la diversidad fenotípica observada en 32 poblaciones argentinas y Gieco (2002) caracterizó genética y agronómicamente distintos genotipos para delinear criterios de selección. En el caso de cebadilla criolla, también se han efectuado estudios comparativos con otras especies del género tales como los realizados por Bellozas *et al.* (2000) sobre caracterización química de las semilla, Massa *et al.* (2004), quienes describieron la variación morfológica de germoplasma patagónico de varias especies de la sección *Ceratochloa* y Stewart (1996) que examinó el valor potencial de algunas especies de esa misma sección, aunque en éstos últimos no se incluyó a la cebadilla pampeana.

En esta última especie se realizaron estudios comparativos con otras especie de la sección en temas relativos a la caracterización agronómica, genética y fisiológica, entre los que se cuentan los de Naranjo (1985), Ruiz *et al.*, (1997), Covas *et al.*, (1995), Covas y Ruiz (1999) y Perczaz *et al.*, (2000). Por su parte, Ruiz *et al.* (1995) trabajaron solo con poblaciones de *Bromus brevis*, procedentes en su mayoría de La Pampa y analizaron la variabilidad existente entre ellas para caracteres agronómicos, fisiológicos y morfológicos.

### **3.2- Caracterización molecular**

Existe una amplia gama de marcadores para realizar la caracterización molecular del germoplasma, los que presentan diferentes características (Nuez y Carrillo, 2000; Spooner *et al.*, 2005). Básicamente las técnicas de marcadores se dividen en dos tipos: bioquímicos y moleculares y estos últimos a su vez se clasifican en dos categorías, la de aquellos no basados en la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y la de los marcadores que se basan en la PCR (Dalla Rizza *et al.*, 2003; Spooner *et al.*, 2005). Entre los marcadores basados en la PCR, los más utilizados son: RAPDs (polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificados al azar),

AFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados), SSR (microsatélites o repetición de las secuencias de ADN discretas) e ISSR (inter-repetición de secuencias discretas). Por sus características, estos marcadores presentan ventajas y desventajas, en función de lo cual se decide su aplicación en una determinada especie.

### **3.2.1-RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Los marcadores RAPDs son fragmentos de ADN amplificados al azar mediante la técnica de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando cebadores sintéticos cortos, generalmente de diez pares de bases. El polimorfismo se atribuye a la variación en el sitio de apareamiento (annealing) del cebador (Spooner *et al.*, 2005), pero también puede deberse a diferencias en la longitud de las secuencias amplificadas. Esta técnica tiende a producir marcadores dominantes (Nuez y Carrillo, 2000). Su principal ventaja es que son rápidos y fáciles de obtener; requieren bajas cantidades de ADN y no se necesita información de las secuencias para la construcción de los mismos ya que cualquier decámero puede ser utilizado como cebador. Tienen alta abundancia y están distribuidos aleatoriamente en el genoma. Su principal desventaja es su baja reproducibilidad. Generalmente requieren de ADN purificado, de alto peso molecular y se necesita precaución para evitar la contaminación de las muestras de ADN porque los cebadores universales pueden amplificar ADN de una variedad de organismos. Esto hace que no sean adecuados para la transferencia o comparación de resultados entre grupos que trabajan con las mismas especies o materiales similares (Spooner *et al.*, 2005). Se utilizan tanto para estudios a nivel individual (identidad genética), como en aquellos que involucran especies cercanamente emparentadas (Spooner *et al.*, 2005). Varios autores han utilizado esta técnica en la caracterización molecular de

diferentes especies de *Bromus* (Puecher *et al.*, 2001a); Diaby y Casler, 2003; Sellaro *et al.*, 2003; Yanaka *et al.*, 2005).

### **3.2.2-AFLP**

Esta técnica combina el uso de enzimas de restricción y amplificación por PCR, de manera que se obtienen marcadores muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad. Los patrones de banda son el resultado de variaciones en los sitios de restricción o en la regiones de ADN que intervienen en la técnica (Spooner *et al.*, 2005). Tienen la ventaja de poder estudiar el polimorfismo de varios loci en una sola reacción, pero presentan la desventaja de que son en su gran mayoría dominantes (Dalla Rizza *et al.*, 2003).

Massa *et al.* (2001), Fernandez y Coulman (2002) y Pagano *et al.* (2005) se encuentran entre quienes aplicaron esta técnica al estudio de especies de *Bromus*. Estos últimos autores mencionaron que en el estudio de variabilidad en *Bromus*, esta técnica produce resultados similares a los obtenidos mediante RAPDs aunque mas reproducibles.

### **3.2.3-Microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats)**

Estos marcadores son áreas de ADN caracterizadas por repeticiones de dos, tres o cuatro nucleótidos. La variación en el número de unidades repetidas resulta en polimorfismos de longitud que pueden detectarse por electroforesis (Spooner *et al.*, 2005). Los microsatélites se encuentran de forma abundante y uniforme en los genomas de la mayoría de los organismos eucariotas (Nuez y Carrillo, 2000). La fortaleza de los microsatélites incluye la codominancia de alelos, su alta abundancia y su distribución aleatoria en el genoma. Requiere bajas cantidades de ADN templado,

tienen alta reproducibilidad y no requieren de un ADN de alta calidad. Una de las principales desventajas es el elevado costo que implica desarrollar primers o cebadores adecuados si éstos no están disponibles, dificultando su aplicación a grupos no estudiados (Spooner *et al.*, 2005). Existen trabajos recientes que exploran la gran cantidad de secuencias genéticas públicas (ESTs y Genómicas) para generar microsatélites a partir de secuencias con motivos SSRs (Feingold *et al.*, 2005). En general, muestran un alto nivel de polimorfismo, por lo que resultan muy informativos y pueden ser usados para estudios de genética de poblaciones. Hormaza (2002) menciona la transferibilidad de secuencias SSR entre distintas especies dentro del género *Prunus* y Raker y Spooner (2002) encontraron diferencias genéticas entre dos subespecies de *Solanum tuberosum* mediante el empleo de este tipo de marcadores, los cuales serían útiles para detectar diferencias entre taxones estrechamente relacionados. En *Bromus*, Ramakrishnan *et al.* (2004), desarrollaron y utilizaron SSR en la caracterización de *B. tectorum*.

#### **3.2.4-ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)**

Estos marcadores se basan en la amplificación de secuencias comprendidas entre repeticiones (microsatélites). Para ello se utilizan cebadores anclados a esas repeticiones (Goulão *et al.*, 2001). Los ISSRs son habitualmente de naturaleza dominante y a partir de esta técnica se obtienen más fragmentos o bandas que en una reacción de RAPDs (Nuez y Carrillo, 2000). La principal ventaja de los ISSRs es que no se necesitan datos de secuencias para la construcción de los cebadores. Se requieren bajas cantidades de ADN templado y además los ISSRs se encuentran distribuidos aleatoriamente a través del genoma. Por otro lado, estos marcadores al igual que los RAPDs pueden tener problemas de reproducibilidad (Spooner, 2005). Sin embargo la ventaja de los ISSRs frente a los RAPDs es que pueden usarse cebadores

de cadena mas larga lo que permite condiciones de PCR que mejoran la reproducibilidad (Nuez y Carrillo, 2000). Pueden aplicarse en estudios de identidad genética, identificación de clones y estudios taxonómicos de especies emparentadas. A pesar de sus ventajas en relación a los RAPDs, no se hallaron referencias del uso de este tipo de marcador en la caracterización de especies del género *Bromus*.

### **3.2.5-Indice de diversidad**

El indice de diversidad cuantifica el poder de discriminación de un marcador molecular, proporcionando información sobre la diversidad detectada con cada ISSR y en cada población. El indice de diversidad es cero cuando se encuentra un solo patrón y aumenta su valor cuando se incrementa el número de patrones y su valor se acerca a 1 cuando el número de patrones con frecuencias similares es alto.

### **3.2.6-Uso de marcadores moleculares en el género *Bromus***

Se han reportado diversos trabajos realizados con marcadores moleculares en especies del género *Bromus*, en los que se ha empleado uno o más de un tipo de marcadores. Entre los que emplearon un solo tipo de marcador se encuentra Oja (2002) quien utilizó isoenzimas para estudiar la diversidad genética y la divergencia entre las especies del complejo *B. madritensis* L. El uso de RAPDs permitió la detección de amplia variabilidad tanto en *B. auleticus* (Yanaka *et al.*, 2005) como en *B. inermis* Leyss. (Diaby y Casler, 2003), y también fue empleado por Puecher *et al.*, (2001a) evaluaron 22 poblaciones de *B. catharticus*, y por Sellaro *et al.* (2003) para analizar la variabilidad en *B. catharticus* y otras especies del género coexistentes con aquella, entre las que se encontraban *B. stamineus* Desv., *B. inermis* y *B. auleticus*.

Marcadores de tipo AFLP se utilizaron para caracterizar 30 entradas de germoplasma de especies de *Bromus* de la patagonia, pertenecientes a la sección *Ceratochloa* (Massa *et al.*, 2001).

Entre quienes emplearon más de un tipo de marcador puede mencionarse a Fernandez y Coulman (2002) quienes utilizaron RAPDs y AFLP para determinar las variaciones y relaciones genética entre poblaciones de *B. inermis* y *B. riparius* Rehmann, mientras que Puecher *et al.* (2001b) también emplearon ambos tipos de marcadores en la determinación de la variabilidad de poblaciones y cultivares comerciales de *B. catharticus*. En cambio, AFLP y SSR fueron utilizados para la caracterización molecular de *B. tectorum* (Ramakrishnan *et al.*, 2004).

La caracterización de germoplasma de *B. brevis* mediante marcadores moleculares es incipiente y hasta el momento solo se ha efectuado la caracterización de poblaciones mediante RAPDs (Cuyeu *et al.*, 2005).

### **3.3-Distribución de la variabilidad en función del ambiente**

La información aportada por la caracterización molecular enfocada a la distribución de la variación genética es útil para guiar a los curadores de bancos de germoplasmas en decisiones relacionadas con la adquisición de nuevo germoplasma (Spooner *et al.*, 2005). Varios trabajos realizados en especies gramíneas muestran asociaciones basadas en las variaciones de ADN y la geografía o ecología (Ruiz *et al.*; 1997, Guma *et al.*, 2006), o entre las variantes morfológicas y los patrones de variación climática y edáfica (Ram *et al.*, 2004. Alonso, 1992; Alonso *et al.*, 2000); aunque no siempre pueden encontrarse tales relaciones, como observó Ursula *et al.* (1997) en *Lolium perenne* L. Tales asociaciones facilitan a los curadores y otros usuarios interesados en el germoplasma la toma de decisiones sobre futuros sitios de colecta donde sería más factible encontrar germoplasma de su interés y pueden además alertarlos sobre la

posible necesidad de establecer determinadas áreas para la preservación *in situ* de poblaciones con material genético valioso.

#### **4-Importancia de los recursos genéticos de especies forrajeras nativas**

El pool génico de los ecotipos de pasturas, obtenidos ya sea por intercambio o colección de poblaciones silvestres, puede representar una importante fuente de caracteres de interés agronómico, de utilidad para el mejoramiento de las especies cultivadas (Vivero Vidal, 1979; Rodríguez, 1981; Cagas, 1991; Charmet, 1991; INASE, 2006). Lo mismo es extensible a las especies silvestres que tradicionalmente no han sido utilizadas comercialmente, muchas de las cuales presentan problemas de erosión genética incipiente a severa (Bertonati y Corcuera, 2001).

A consecuencia de la intensa intervención del hombre, acelerada en los últimos años por el avance de la agricultura en tierras dedicadas a la ganadería, varias provincias de la Republica Argentina sufren una continua degradación de sus recursos naturales (Bertonati y Corcuera, 2001). Algo similar ocurrió a principios del siglo pasado, con el desmonte y la incorporación de tierras al cultivo de trigo y otros cereales. Esto trajo como resultado, acelerados procesos de erosión del suelo, posible pérdida de especies vegetales autóctonas y, finalmente, la desertificación de áreas del territorio (Traverso *et al.*, 2005). Estas circunstancias llevan a un rápido deterioro de la variabilidad genética existente en las poblaciones de especies nativas, por ello es necesario rescatar y conservar el germoplasma de estas especies, antes de que se pierdan, tanto por razones de tipo ético como científico (Percz *et al.*, 2000). Según Bertonati y Corcuera (2001) la utilización de las especies nativas podría contribuir a la sustentabilidad de la región de donde son representativas.

Debe considerarse el posible empleo de las especies autóctonas en la recuperación de suelos y en el aumento de la producción forrajera de los campos.

En la región templado-húmeda de la Argentina, las especies introducidas son las más utilizadas como integrantes de pasturas implantadas, ya que en general presentan mayor persistencia bajo pastoreo y alta producción de forraje, comparadas con algunas especies nativas (Andrés, 2001). Sin embargo, esta autora también señala que las especies nativas constituyen un recurso forrajero invaluable en áreas marginales. Ello no implica que algunas especies exóticas no puedan adaptarse a ambientes con altas restricciones para el desarrollo de las plantas (Mazzanti *et al.*, 1992; Clatzle, 2007). En relación a esto último, Traverso *et al.* (2005) señalan que la utilización de especies o germoplasma proveniente de otras latitudes, puede tener dificultades de adaptación a las condiciones ambientales de La Pampa, y que algunas especies nativas ofrecen buenas posibilidades de domesticación, para su reintroducción posterior a los sistemas productivos.

Muchas especies nativas suelen ser las de mayor preferencia por el ganado, y por ello sus poblaciones presentan mayor peligro de erosión genética (Bertonati y Corcuera, 2001; Traverso *et al.*, 2005). Además, para las regiones de alta singularidad, como las eco-regiones situadas en la franja central de la Argentina, por no hallarse representadas en otras regiones o países, se recomienda realizar estudios del estado de la vegetación, sus poblaciones, su productividad y de todas las variables que permitan hacer un uso sustentable de las mismas (Bertonati y Corcuera, 2001).

En ciertas regiones de La Pampa, como el área correspondiente al Caldenal, la ganadería constituye la principal actividad económica, sustentándose la misma en el pastoreo directo de especies nativas en áreas no desmontadas y en pasturas introducidas. Entre las especies nativas de la zona se encuentra la cebadilla pampeana, (Ruiz *et al.*, 2004), especie de la cual existen colecciones de diferentes sitios de la Argentina. En los bancos de germoplasma de las Estaciones Experimentales del INTA de Balcarce y de Anguil se conservan semillas de varias poblaciones de *Bromus brevis* colectadas principalmente en las provincias de La

Pampa, Buenos Aires y Río Negro (Alonso e Ispizúa, 1996; Traverso *et al.*, 2005). Sin embargo hasta el momento no se han iniciado estudios amplios abocados a determinar la variabilidad existente entre poblaciones, y sólo se cuenta con trabajos que abordan el tema en forma parcial, con una a pocas poblaciones o referidos sólo a aspectos agronómicos (Covas, *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1995 y 1997; Percz *et al.*, 2000; Bellozas *et al.*, 2000; Cuyeu *et al.*, 2005; Pagano *et al.*, 2005).

La productividad y calidad forrajera de las especies del género, así como la erosión genética a la que se encuentran sometidas algunas de ellas, son las principales causas que han conducido a la realización de colectas y conservación de semillas en bancos de germoplasma. Dicho germoplasma requiere la realización de estudios tendientes a determinar la variabilidad de las colecciones existentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1-Germoplasma

El estudio se inició con 23 entradas correspondientes a poblaciones silvestres que fueron aportadas por los Bancos de germoplasma de las EEA de Balcarce y Anguil, INTA. De ellas, 22 poblaciones estaban clasificadas como *Bromus brevis* y provenían de distintas provincias y localidades de la República Argentina (Tabla I Apéndice). La población restante, utilizada como testigo fuera de tipo, correspondía a *B. catharticus* Vahl., procedente de la provincia de Buenos Aires. Luego de iniciado el estudio se observó que dos de las 22 poblaciones consideradas como *B. brevis* no correspondían a esa especie y fueron descartadas, por lo que el presente trabajo se referirá a 20 poblaciones de *B. brevis* y una población testigo de *B. catharticus* (Tabla 1).

Tabla 1: Número de colección o de entrada y procedencia (Provincia, ciudad mas próxima al sitio de colección y sus coordenadas) de la población de *Bromus brevis* y *B. catharticus* utilizadas.

Población	Provincia	Ciudad mas próxima	Coordenadas
CI996	Buenos Aires	Coronel Dorrego-	38° 39' lat S, 61° 22' long O
CI1012	Buenos Aires	Bahía Blanca	38° 41' lat S, 62° 26' long O
CI1014	Buenos Aires	Médanos	38° 47' lat S, 62° 39' long O
CI1016	Buenos Aires	Algarrobo	38° 54' lat S, 63° 22' long O
CI1031	Buenos Aires	Bahía Blanca	38° 39' lat S, 62° 15' long O
CI1033	Buenos Aires	Mar de Cobo	37° 45' lat S, 57° 36' long O
CIA1063	Buenos Aires	Sierra de la Ventana	38° 03' lat S, 62° 07' long O
CI1020	Río Negro	Choele choel	39° 15' lat S, 65° 40' long O
CI1022	Río Negro	Villa Regina	39° 04' lat S, 66° 46' long O
CI1028	Río Negro	Río Colorado	39° 09' lat S, 64° 58' long O
CI1029	La Pampa	Río Colorado	38° 58' lat S, 63° 57' long O
N5222	La Pampa	Telén	36° 17' lat S, 65° 32' long O
N5225	La Pampa	La Humada	36° 21' lat S, 67° 41' long O
N5226	La Pampa	Jahuel del Moro	36° 19' lat S, 68° 12' long O
N5229	La Pampa	Cañón del Atuel	35° 59' lat S, 68° 08' long O
N5231	La Pampa	Cañón del Atuel	35° 43' lat S, 68° 00' long O
N5313	La Pampa	Salitral Lavalle	37° 47' lat S, 65° 23' long O
N5319	La Pampa	Gobernador Ayala	37° 33' lat S, 68° 03' long O
N5320	La Pampa	Gobernador Ayala	37° 33' lat S, 67° 56' long O
<b>CIA1658</b>	<b>Buenos Aires</b>	<b>Fortín Olavarria</b>	<b>35° 38' lat S, 63° 00' long O</b>
N5248	Neuquén	Zapala	38° 56' lat S, 70° 02' long O

**En negrita:** Población perteneciente a *B. catharticus* utilizada como testigo

Las entradas con las siglas CI y CIA fueron cedidas por el Banco de Germoplasma de Balcarce de la Estación Experimental Balcarce, INTA (E.E.A. Balcarce) y las mismas corresponden a las iniciales de los apellidos de las personas que las coleccionaron, Ing. Andrea Clausen e Ing. Sara Alonso. Las entradas que solo presentan numeración fueron cedidas por el Banco de Germoplasma de Anguil (E.E.A. Ing. G. Covas, INTA). En todos los casos, la muestra provista debió ser multiplicada para contar con suficiente semilla para realizar los ensayos.

## **2-Characterización y evaluación preliminar**

Se realizaron observaciones sobre los individuos obtenidos a partir de semilla de primera multiplicación y se contemplaron diferentes estadios de desarrollo. En las etapas consideradas (invernáculo y campo), todas las observaciones se efectuaron sobre plantas aisladas de acuerdo a lo recomendado para especies forrajeras por Tyler *et al.*, (1987) y Schultze- Kraft (1990). En función del carácter considerado, los registros se efectuaron a nivel de parcela o de planta individual; en estos casos siempre se consideró un mínimo de 5 individuos por unidad experimental (Schultze-Kraft, 1990; van de Wouw *et al.*, 1999).

### **2.1-Multiplicación de Semilla Original**

Para contar con la cantidad de material necesario para llevar a cabo el estudio se realizó la multiplicación de 23 poblaciones durante la primavera del año 2004. Este ensayo se realizó específicamente entre los meses de octubre y diciembre en un campo sembrado con trigo en la Estación Experimental de Balcarce, provincia de Buenos Aires (37° 45` S – 58° 18` O).

### **2.1.1-Manejo de las poblaciones**

Dentro del cultivo de trigo se despejó un área para cada entrada y se trasplantaron plántulas obtenidas de la siembra en invernáculo, de cien semillas de la entrada original; cada entrada se dispuso en el campo aislada de las restantes por 30 metros, ya que *Bromus brevis* puede presentar floración chasmógama (Covas, 1981). Se optó por realizar el ensayo de esta manera debido a que la altura de las plantas de trigo permitía mantener a cada una de las parcelas de multiplicación lo suficientemente aislada como para evitar el cruzamiento entre poblaciones. Se aplicó riego una vez por semana y se desmalezó manualmente cuando lo ameritaba, para evitar las condiciones de competencia con plantas de otras especies.

Una vez que las plantas alcanzaron la madurez fisiológica, lo que se consideró a partir de la coloración pajiza de la caña y la panoja, se procedió a la cosecha. Esta se realizó en forma manual, por corte con tijera de las panojas maduras, las que se colocaron en sobres de papel rotulados. Se efectuó el seguimiento diario del ensayo para evitar la dispersión natural y pérdida de semillas debido al desgrane; cuando esto ocurrió no se colectaron los cariopses que se encontraban sobre el suelo. Una vez finalizada la cosecha se procedió al trillado manual de las panojas.

### **2.1.2-Caracteres registrados sobre espiguillas y antecios**

Los registros efectuados sobre las semillas cosechadas de las plantas obtenidas durante la multiplicación se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Caracteres registrados sobre las espiguillas y los antecios.

<u>Nº</u>	<u>VARIABLE</u>	<u>Nº</u>	<u>VARIABLE</u>
<u>1</u>	Longitud del pedicelo (mm)	6	Longitud de la gluma inferior (mm)
<u>2</u>	Ancho del Cariopse (mm)	7	Pubescencia de la gluma inferior
<u>3</u>	Longitud de la arista (mm)	8	Longitud de la gluma superior (mm)
<u>4</u>	Longitud de la lemma (mm)	9	Pubescencia de la gluma superior
<u>5</u>	Pubescencia de la lemma		

Los caracteres de las semillas se obtuvieron sobre 5 cariopses al azar por población y se observaron con la ayuda de una lupa estereoscópica; para registrar pubescencia se consideraron tres categorías: 0=Rala o glabra; 0,5= Poco pubescente ;1= Densamente pubescente.

El análisis preliminar de las variables registradas en esta etapa alertó sobre la posibilidad de que dos poblaciones de las 23 multiplicadas no correspondieran a *Bromus brevis* (Alonso *et al.*, 2005), las que fueron descartadas. Esto influyó en el tipo de variables y su forma de registro en la etapa de campo.

### **3-Siembra en Invernáculo**

#### **3.1-Manejo de las poblaciones**

A partir de las semillas procedentes de la primera multiplicación, en marzo de 2005 se realizó la siembra en bandejas para plantines, las que fueron mantenidas en una jaula antiáfidos de la EEA Balcarce, INTA. Se implementó un ensayo con 4 repeticiones donde cada repetición comprendía 25 semillas por población, sembradas individualmente en cada recipiente de la plantinera, en un sustrato formado por una mezcla de arena, suelo franco y perlita en las proporciones 1:1:1/4.. El riego se aplicó aproximadamente dos veces por semana y el desmalezado manual se efectuó a medida que aparecían plantas de otra especie. Los plantines se mantuvieron en las

bandejas hasta el estadio juvenil con 2-3 macollos desarrolladas, momento en el que fueron transplantados en el campo.

### 3.2- Caracteres registrados en la etapa de plántula

Durante la etapa de emergencia a estadio juvenil se registraron las variables que se consignan en la Tabla 3.

Tabla 3: Caracteres registrados desde emergencia al estadio de plántula

Nº	VARIABLE	
10	Emergencia Inicial (%)	Porcentaje de plántulas emergidas a los 12 días de la siembra.
11	Emergencia Final (%)	Porcentaje de plántulas emergidas a los 47 días de la siembra.
12	Índice de Emergencia (In)	$In = (\sum (n^{\circ}pl_i \cdot d_i)) / n^{\circ}pl \text{ total}$ donde $pl_i = n^{\circ}$ plántulas emergidas al día $i$ desde $i-1$ ; $d_i = n^{\circ}$ de días desde siembra al recuento $i$ ; $i = n^{\circ}$ de recuentos ( $i=6$ realizados a los 12, 19, 26, 33, 40 y 47 días de la siembra).

## 4-Transplante en el campo

### 4.1- Manejo de las poblaciones

En junio de 2005, cuando las plántulas alcanzaron un tamaño de 2-3 macollos desarrollados, fueron transplantadas a mano en un lote de la EEA Balcarce, sobre un suelo Argiudol Típico. Se aplicó un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones, en el que cada repetición consistía en una hilera de 20 individuos por población. Cada hilera, así como las plantas de cada hilera se colocaron espaciadas a 35 cm, mientras que los bloques fueron separados por 1 metro (Figura 1). El riego se

aplicó al trasplante y periódicamente cuando el cultivo lo requería. El desmalezado fue manual desde el mes del trasplante hasta la floración.

Figura 1: Vista parcial del ensayo a campo de las poblaciones de *Bromus brevis*, correspondiente a inicios del estadio adulto.



## **4.2- Caracteres registrados en las etapas de juvenil y adulto**

Para tener la certeza de que los individuos estudiados pertenecían a *Bromus brevis* y que no hubiera mezclas con otras especies del género se observó la prefoliación de los 20 individuos de cada hilera, ya que esta característica posee valor taxonómico discriminante y permite separar a *B. brevis*, (con prefoliación plegada), de otras especies vegetativamente similares, pero que presentan prefoliación convolutada (Cámara Hernández, 1970). En 10 individuos de las 21 poblaciones se marcó un macollo mediante precintos plásticos, de manera de poder realizar un seguimiento del macollo y del individuo durante todo su ciclo. A partir de estos ejemplares se registraron algunos caracteres no destructivos en las etapas vegetativa y reproductiva, mientras que los restantes individuos se utilizaron para el registro de los caracteres destructivos y parte de los no destructivos (Tabla 4).

## **5- Caracterización molecular**

### **5.1- Extracción del ADN**

La extracción de ADN genómico se llevo a cabo a partir de material foliar de individuos en estado vegetativo, mediante la metodología descrita por Haymes (1996) con modificaciones propias del laboratorio de Biotecnología Agrícola de la EEA Balcarce donde se llevó a cabo la extracción. Estas modificaciones correspondían a ajustes en cuanto a volúmenes de soluciones y tamaño de muestra, las que se especifican posteriormente.

Tabla 4: Caracteres registrados durante la etapa juvenil y adulta, características del registro y número de plantas observadas por repetición.

Nº	VARIABLE	CARACTERÍSTICAS
Variables No Destructivas		
13 a 16	Longitud foliar en 3 fechas: (F1: juvenil (29/08); F2: inicio de encañazón (16/09); F3: (18/10): y longitud de la hoja bandera (02/11)	Longitud de la última hoja desarrollada, desde la lígula al ápice (en 10 individuos)
17 a 19	Altura hasta el follaje (AF), hasta la hoja bandera (AHB) y total (AT)	En plantas en floración (en 10 individuos) Fecha 18/11
20	Número de macollos vegetativos (MV1) en el estadio vegetativo.	Nº macollos por planta (en 5 plantas) Fecha 4/10.
21 a 23	Número de macollos vegetativos (MV2), reproductivos (MR) y totales (MT) en el estadio reproductivo.	Nº macollos por planta (en 5 plantas). Fecha 21/11. MT= MV + MR
24	Prolificidad o esfuerzo reproductivo	$P = MR / MT$ de la fecha 21/11
25	Color de las vainas.	V= verdes; P= púrpuras (en 5 plantas) Fecha 4/11
26	Porte de las plantas	E0 erguido; SE= semierguido; P = postrado (por hilera). . Fecha 5/11
27	Sanidad de las panojas	Presencia de carbón de la panoja (en 20 plantas). Fecha 20/11
Variables Destructivas		
28	Materia Seca en el estadio vegetativo (Corte 1, fecha 9/10)	Peso seco del follaje cortado a 4 cm del suelo y secado en estufa a 80 °C
28	Materia Seca en el estadio reproductivo (Corte 2, fecha 18/11)	Peso seco del follaje cortado a 4 cm del suelo y secado en estufa a 80 °C
30	Materia Seca Acumulada	Sumatoria de los cortes 1 y 2
31	Número de espiguillas por panoja	En 10 panojas.
32	Número de cariopses por espiguilla	En 50 espiguillas
33	Longitud de la inflorescencia	Longitud de la caña + raquis, en 10 panojas.

Para la obtención de las muestras se utilizaron 7 de los 10 individuos de cada población del ensayo a campo, que presentaban macollos marcados. Se cortó manualmente con tijera aproximadamente 2 gramos de hojas jóvenes completamente expandidas. Este material se colocó en una bolsa porosa de acetato que contenía un rotulo identificador en su interior, se cerró con broches de acero y se introdujo completamente en un recipiente con nitrógeno líquido. Posteriormente fueron almacenadas en un freezer a  $80^{\circ}\text{C}$  bajo cero hasta el inicio de la extracción.

Cada una de las bolsas conteniendo el material foliar de cada individuo de las 21 poblaciones definitivas fue retirada del freezer y procesada individualmente. Para ello se utilizaron morteros de porcelana previamente enfriados donde se colocaron trozos de las hojas que habían sido previamente congeladas y se les agregó nitrógeno líquido para macerarlas. Una vez que el material quedó reducido a polvo se colocó rápidamente dentro de un tubo eppendorff con la ayuda de una espátula de acero, junto con 0,5ml del buffer de extracción; posteriormente se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Luego se adicionaron  $600\mu\text{l}$  de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (12:1), se agitó en vortex y se centrifugó a 14000 rpm. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a otro tubo para precipitar el ADN; con este fin se adicionaron  $600\mu\text{l}$  de isopropanol. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con  $300\mu\text{l}$  de una solución de etanol al 75% y acetato de amonio 10mM. Se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm, se descartó el etanol y el ADN precipitado se secó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para resuspenderlo se le agregó  $50\mu\text{l}$  de buffer TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM. Finalmente se adicionó  $2\mu\text{l}$  de RNAsa ( $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) para eliminar el ARN de las muestras.

El ADN extraído se observó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, después de la electroforesis en buffer TBE 1X (Tris- borato 0,089M, Acido bórico 0,089M y EDTA 0,002M) a 100 voltios durante una hora. Los geles se observaron en

un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron con una cámara Polaroid con película de alta sensibilidad (ASA 3000).

## **5.2-Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

### **5.2.1-Selección de Cebadores**

Se trabajó con tres clases de marcadores moleculares: SSRs, RAPDs e ISSRs. Se usaron 5 marcadores de tipo RAPDs (A01, A02, A05, A07 y A10) de la serie OPA de Operon Technologies, USA (Tabla 5). Se seleccionaron siete cebadores para la obtención de microsatélites (Tabla 6 y Tabla II) que habían sido diseñados específicamente para la especie *Bromus tectorum* (Ramakrishnan *et al.*, 2004). Se probaron además, siete marcadores de tipo ISSRs (Tabla 7) que habían sido diseñados para trigo.

Tabla 5. Código, secuencia de bases y peso molecular (PM) de los marcadores de tipo RAPDs utilizados.

CÓDIGO	SECUENCIA	PM
OP-01	CAGGCCCTTC	2955
OP-02	TGCCGAGCTG	3035
OP-05	AGGGGTCTTG	3090
OP-07	GAAACGGGTG	3108
OP-10	GTGATCGCAG	3059

Tabla 6: Código, motivos y tamaño en pares de bases (pb) de los marcadores de tipo SSR utilizados.

Locus	Motivos	Tamaño (pb)
Bt03	(CA) <sub>7</sub>	112–114
Bt04	(CA) <sub>13</sub>	114–117
Bt05	(CT) <sub>9</sub>	167–178
Bt12	(CA) <sub>5</sub> (CA) <sub>6</sub>	252–262
Bt26	(CT) <sub>18</sub>	152–156
Bt30	(GT) <sub>8</sub>	114–118
Bt33	(AG) <sub>3</sub> (AG) <sub>7</sub> (AGG) <sub>5</sub>	221–223

Tabla 7: Código y secuencia de los ISSR utilizados.

CÓDIGO	SECUENCIA
IS 01	(CTTCA) <sub>3</sub>
IS 02	(AGT) <sub>6</sub>
IS 03	(GGAGA) <sub>3</sub>
IS 04	(TGC) <sub>6</sub>
IS 05	(AG) <sub>8</sub> T
IS 06	(AC) <sub>8</sub> CT
IS 07	(GT) <sub>8</sub> CG

#### 5.2.1.1.1- RAPDs

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20µl. Los componentes de la reacción fueron: 50ng de DNA genómico con una dilución 1:10, Buffer Promega 1 X, 20,8µg de BSA, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de DNTPs (Promega), 1ng de primer 10-mer Operon Technologies, Alameda, USA) y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Promega). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 MJ Research Inc., utilizando el siguiente programa:

	T °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	3 minutos	
Desnaturalización	94	30 segundos	} 35 ciclos
Apareamiento	42	30 segundos	
Extensión	72	60 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	

#### 5.2.1.1.2 -Visualización de los productos de amplificación

Luego de realizada la PCR las muestras se conservaron a 20 grados bajo cero hasta el momento de su análisis. Los productos de amplificación del ADN fueron separados en electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v luego de la electroforesis en buffer TBE 1 X y visualizados con tinción de bromuro de etidio El tamaño de las bandas se estimó por comparación con un marcador de 100 pares de bases. La documentación del gel se realizó a través de fotografías tomadas con una cámara Polaroid, análogamente a lo especificado previamente..

#### 5.2.1.2.1-SSRs

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 15µl. Los componentes de la reacción fueron: 50ng de DNA genómico con una dilución 1:10, Buffer Promega 1 X, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> , 0,2mM de DNTPs (Promega), 0,2µM de primer forward y reverse, 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (Fermentas). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 MJ Research Inc., utilizando el siguiente programa:

	T °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	3 minutos	
Desnaturalización	94	30 segundos	} 35 ciclos
Apareamiento	54	30 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	

Se visualizaron los productos de amplificación siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para RAPDs y luego se procedió a la separación de los productos de amplificación.

#### **5.2.1.2.2-Separación de los productos de amplificación**

Se añadió a las muestras un volumen de buffer de carga de secuenciación (NAOH 10mM, azul de bromofenol 0,05%, xilene cyanol 0,05% y formamida demonizada 95%). Las muestras fueron desnaturalizadas durante 4 minutos a 90°C, conservadas en hielo hasta que se sembraron 5µl de cada muestra en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 5% (19:1 acrilamida:bis, urea 7,5M y buffer TBE 1 X). Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis a voltaje constante, 80W durante 2 horas y luego el gel se fijó con ácido acético al 10% y se reveló con tinción de plata. Este se realizó tanto para SSR como para ISSR.

#### **5.2.1.3-ISSRs**

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20µl. Los componentes de la reacción fueron: 50ng de DNA genómico con una dilución 1:10,

Buffer Promega 1 X, 2mM de  $MgCl_2$ , 0,2mM de DNTPs (Promega), 0,5 $\mu$ M de primer, 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (Fermentas). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 MJ Research Inc., utilizando el siguiente programa (touchdown):

	T °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	3 minutos	
Desnaturalización	94	30 segundos	} 35 ciclos
Apareamiento	*	40 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	

\*:El apareamiento se realizó con descensos de la temperatura de 0,5°C, comenzando a 50°C por los primeros 11 ciclos, seguido por 25 ciclos a 45°C .

Se visualizaron los productos de amplificación y luego de la separación de los mismos se procedió al registro de las bandas.

### 5.2.2-Registro de bandas

Un locus de RAPD, SSR o ISSR fue considerado polimórfico si la banda amplificada estaba presente en algunos individuos y ausente en otros, y monomórfica si la banda estaba presente en todos los individuos evaluados. Se construyó una matriz binaria a partir de las fotografías o de la visualización directa de los geles, asignando el valor 1 a la presencia y 0 a la ausencia de banda.

## 6-Análisis de datos

Los registros obtenidos como parte del presente trabajo fueron sometidos a análisis univariado y éstos, junto con datos complementarios aportados por otros investigadores en el marco del proyecto general, fueron incluidos en el análisis multivariado (Tabla III).

### 6.1-Análisis univariado

El análisis de los caracteres cuantitativos se realizó mediante Análisis de la Varianza (ANOVA), a partir de dos modelos lineales (Steel y Torrie, 1980). El primer modelo correspondió a un Diseño Completamente Aleatorizado (CA), con un número de repeticiones entre 5 y 15 dependiendo de la variable. Este diseño se aplicó a los datos del estadio de plántula (largo y ancho foliar, y número de macollos) y los de morfología de semillas. El segundo modelo correspondió a un Diseño en Bloques Completos aleatorizados (BCA) con y sin submuestreo. Este análisis se aplicó al resto de las variables y se consideró submuestreo en aquellos casos en que se contaba con varios registros por parcela. Los modelos matemáticos se presentan a continuación:

Completamente Aleatorizado:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : Variable de interés;  $\mu$ : Media conceptual;  $\alpha_i$ : Efecto de la i-ésima población;  $\varepsilon_{ij}$ : Error experimental de la ij-ésima observación

Bloques Completos Aleatorizados

-Sin submuestreo:  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$

-Con submuestreo:  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} + \theta_{ijk}$

Donde :

$Y_{ijk}$ : Variable de interés;  $\mu$ : Media conceptual;  $\alpha_i$ : Efecto de la i-ésima población;

$\beta_j$ : Efecto del j-ésimo bloque;  $\varepsilon_{(ijk)}$ : Error experimental la ij-ésima observación;

$\theta_{ijk}$ : Error de la ijk-ésima planta en cada parcela

La comparación de medias entre poblaciones se evaluó mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) protegida ( $\alpha=0,05$ ). El procesamiento de datos se realizó utilizando el paquete estadístico S.A.S (2001)

Los caracteres cualitativos se analizaron mediante tablas de frecuencias y gráficos comparativos utilizando el programa Excel del software Microsoft Office.

## **6.2-Análisis Multivariado**

### **6.2.1-Análisis de agrupamiento y ordenación**

Se elaboraron distintas matrices con las 21 unidades taxonómicas operativas (OTU=población) en función del tipo de datos (cuantitativos: morfológicos-agronómicos y ambientales; cualitativos: morfológicos y moleculares). Las mismas contenían n variables (según el tipo de datos). Con ellas se llevaron a cabo análisis de agrupamiento y ordenación y se realizaron dendrogramas y gráficos bidimensionales, para interpretar los datos de cada tipo de análisis, respectivamente. Además se estimó el grado de distorsión de los datos a su representación gráfica mediante el coeficiente de correlación cofenética.

### **6.2.1.1-Datos Cuantitativos**

Para los datos morfológico-agronómicos se construyó una matriz para las 21 poblaciones y 31 caracteres entre los que se incluyeron las variables mencionadas en el análisis univariado (descartándose las redundantes) más un conjunto de variables complementarias registradas por otros investigadores del mismo grupo de trabajo (Tabla III). Con este conjunto de datos se realizó un análisis de agrupamiento utilizando la distancia taxonómica y el método de ligamiento promedio (UPGMA; Crisci y Armengol, 1983). El análisis de ordenamiento realizado fue el de Componentes Principales (ACP) para el cual se calculó una matriz de correlación, se obtuvieron los autovalores y se efectuó la proyección en los tres primeros componentes.

Con los datos ambientales se utilizaron los mismos tipos de análisis y se aplicó la misma metodología, pero a partir de una matriz básica de 21 poblaciones y 7 variables (Tabla I)

### **6.2.1.2-Datos Cualitativos**

El análisis de agrupamiento para datos morfológicos cualitativos se realizó sobre una matriz de 21 OTU por 14 variables y se calculó la matriz de similaridad utilizando los coeficientes de Jaccard y de emparejamiento simple (*Simple Matching*). Para estimar la similaridad genética a partir de los datos de la caracterización molecular se utilizó el coeficiente de Jaccard (1908) aplicado sobre una matriz de 21 poblaciones por 38 caracteres (bandas obtenidas con el total de cebadores que amplificaron correctamente). La matriz de similaridad resultante se procesó con un análisis de cluster utilizando el método de agrupamiento medio de emparejamiento ponderado (UPGMA) y luego se realizó un dendrograma.

Los análisis de componentes para este tipo de variables fue el de coordenadas principales (ACoorP), realizado mediante a partir de la matriz disimilaridad obtenida del análisis anterior, seguido del doble centrado y la obtención de autovalores.

### **6.2.2-Comparación de matrices**

La relación entre la variación debida a diferentes tipos de datos (morfológica-agronómica y molecular, morfológico-agronómica cuali y cuantitativa, etc.) se obtuvo a partir de la correlación entre las correspondientes matrices de distancia y/o similitud genética, con el Test estadístico de Mantel (Mantel, 1967), utilizando el procedimiento de comparación de matrices MXCOMP de NTSYS- 2.1 (Rohlf, 2000).

### **6.3. Índice de Diversidad**

Para cada ISSR a partir del número de patrones de bandas encontradas y su frecuencia, se calculó un índice de diversidad (DI) según Millbourne *et al.* (1997):

$$DI = 1 - \sum pg^2$$

donde  $pg$  es la frecuencia de cada uno de los patrones observados.

### **6.4. Análisis de la Varianza Molecular**

El análisis de varianza molecular, AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) se empleó para particionar la varianza en sus componentes jerárquicos (entre y dentro de poblaciones) y para probar la significancia de los mismos. El procedimiento se basa en un análisis de varianza clásico que utiliza distancia entre haplotipos (patrones de amplificación). La matriz de distancia se construyó utilizando el coeficiente de distancia euclídeo equivalente al número de diferencias entre los patrones de amplificación de dos

individuos. Para establecer la significancia de los componentes de la varianza se utilizó el procedimiento de permutación no paramétrico (Excoffier *et al.*, 1992), eliminando la asunción de normalidad que es un requisito para el análisis de la varianza, pero inapropiado para datos moleculares. Para el AMOVA se utilizó el software Arlequín versión 2000 (Schneider *et al.*, 2000).

## RESULTADOS

### 1. Caracteres Morfológicos y Agronómicos

#### 1.1. Caracteres Cualitativos

##### 1.1.1. Pubescencia

##### 1.1.1.1. Pubescencia de las glumas y la lemma

Al analizar la presencia de pubescencia en las glumas y la lemma sobre las espiguillas procedentes de la primer multiplicación, se observó que en ocho de las veinte poblaciones de *B. brevis*, tanto las glumas como la lemma eran glabras. Sin embargo en las restantes entradas y en el testigo se constató la presencia de pubescencia en alguna o en todas las estructuras. Observaciones posteriores realizadas sobre las semillas cosechadas al finalizar la experiencia, permitieron observar que sólo en seis poblaciones las glumas eran glabras, mientras que otras presentaban algún tipo de pubescencia en alguna de las piezas analizadas (Tabla IV). En dicha Tabla se constata que en el testigo y en 12 entradas de cebadilla pampeana se observaron pelos muy cortos y ralos sobre la lemma, en otras cinco los pelos eran más largos y densos y en las tres restantes se encontraron antecios con los dos tipos de pubescencia.

##### 1.1.1.2. Pubescencia de las hojas

La totalidad de las poblaciones de *B. brevis* presentaron vainas pubescentes, al igual que el testigo. Con respecto a la pubescencia de las láminas se observó que 18 poblaciones presentaron hojas pubescentes (90%), y las restantes (C11012 y N5225) más el testigo de *B. catharticus* fueron la excepción pues presentaron láminas glabras.

### 1.1.2. Hábito de crecimiento

En el conjunto de plantas observadas durante el estadio juvenil, se encontraron individuos de porte postrado (21%), semipostrado (45%) y erguido (34%). Algunas poblaciones presentaron homogeneidad en el tipo de porte de sus plantas, pero en la mayoría de ellas, los individuos presentaron dos o tres tipos hábito de crecimiento (Figura 2). Tres poblaciones de *B. brevis* presentaron el 100% de los individuos con porte erguido (CI1020, N5319 y N5320) y otras tres, incluido el testigo presentaron plantas predominantemente erguidas. Solamente en la población, N5231, el 100% de las plantas fue de hábito semipostrado y las restantes presentaron mezclas de individuos. En ninguna población prevalecieron las plantas postradas aunque en tres de ellas esa categoría de porte se contabilizó en un 50% de los individuos (CI996, CI1031 y CI1033).

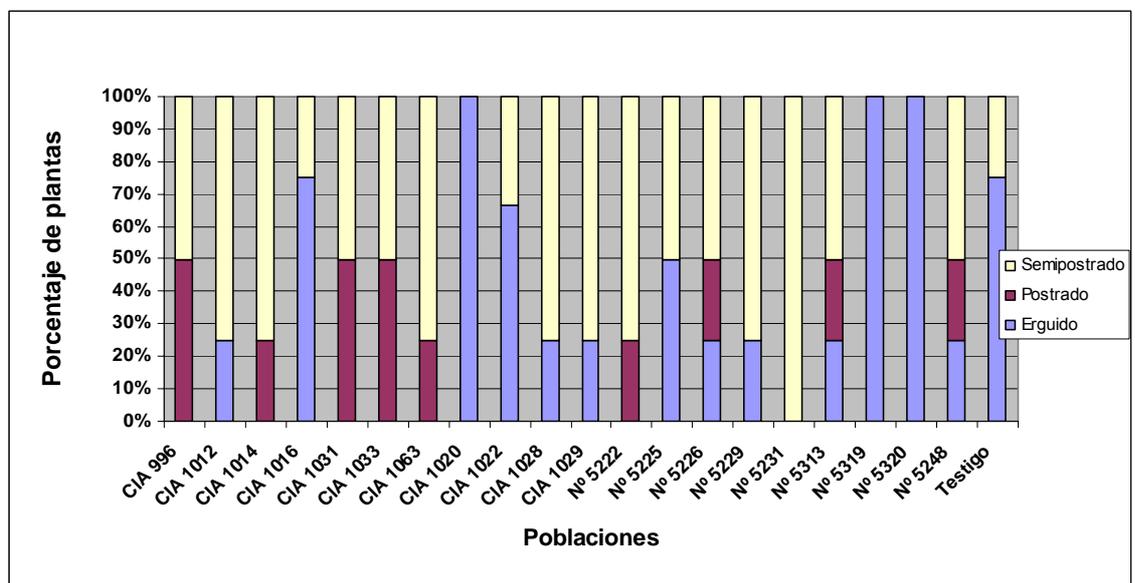


Figura 2: Porcentaje de plantas de cada tipo de porte en cada una de las 20 poblaciones de *B. brevis* y en la población testigo de *B. catharticus*.

### 1.1.3. Color de las vainas

Entre las poblaciones de *B. brevis*, 11 presentaron el 100% de sus plantas con vainas púrpuras, al igual que la población testigo y otras cuatro presentaron más del 70% de sus individuos con vainas de esa tonalidad (Figura 3). Solamente en la población CI1031 la proporción de individuos de cada categoría estuvo equilibrada, ya que en las cuatro restantes, el 100% de los individuos (entradas N5226 y N5229) o más del 50% de ellos presentaron vainas verdes (CI1012 y CIA1063).

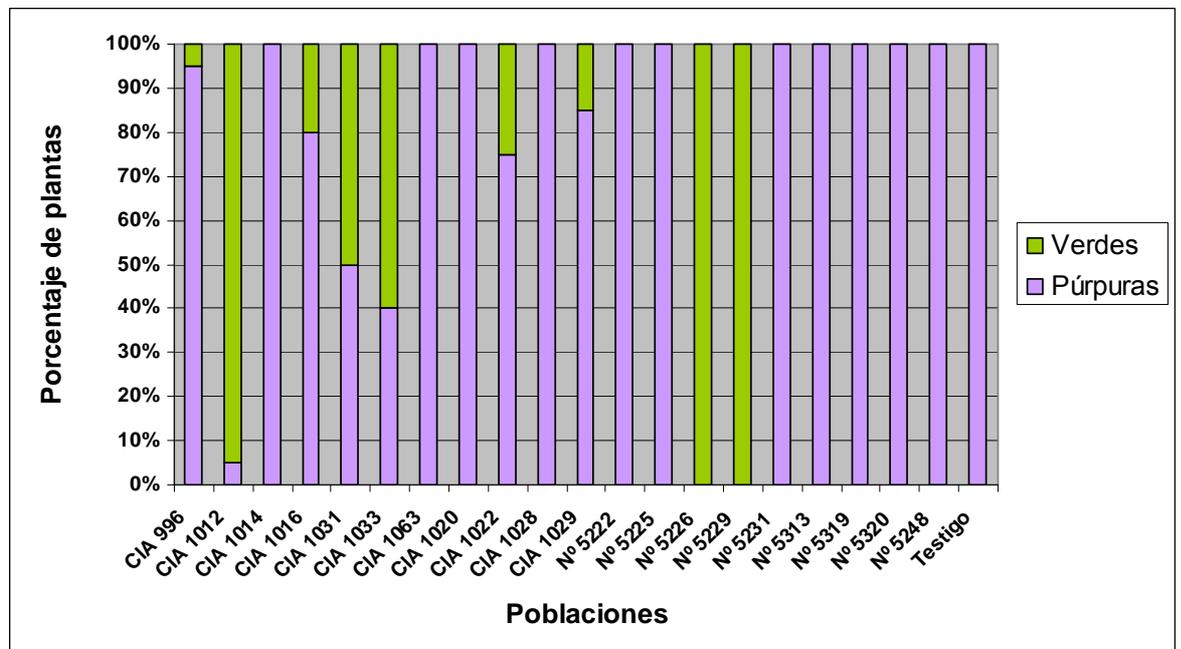


Figura 3: Porcentaje de plantas con vainas verdes y vainas púrpuras en cada una de las 20 poblaciones de *B. brevis* y en la población testigo de *B. catharticus*.

### 1.1.4. Carbón de la Panoja

Se observó la presencia de carbón de la panoja (*Ustilago bullata* Berk.) solamente en individuos pertenecientes a las poblaciones CI1020 y N5229, en las diferentes repeticiones. El ataque del patógeno se produjo a partir de una infección natural

debida a la presencia del agente causal en el área donde se llevó a cabo el ensayo, y afectó en mayor grado a las panojas que primero aparecieron.

### 1.1.5. Afinidad entre las poblaciones

#### 1.1.5.1. Análisis de Agrupamiento

En el análisis de agrupamiento, la similitud entre poblaciones estimada en base a los coeficientes de emparejamiento simple (SM) y de Jaccard, presentaron el mismo ajuste, es decir el mismo coeficiente de correlación cofenético ( $r_{\text{cof.}} = 0,73$ ).

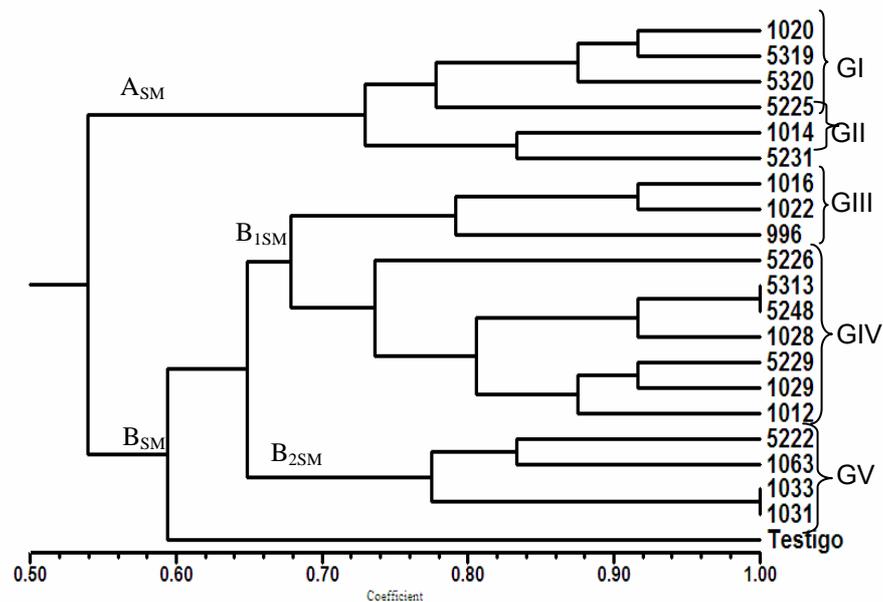


Figura 4: Dendrograma obtenido a partir de los datos morfológicos cualitativos, utilizando el coeficiente de similitud de emparejamiento simple (SM), con una correlación cofenética  $r=0,73$ .

El dendrograma obtenido mediante el coeficiente SM indicó la formación de dos grupos, A y B, a un nivel de similitud de 0,54. El grupo  $A_{SM}$  incluyó a seis poblaciones de *B. brevis* y el  $B_{SM}$  a las 14 restantes más el testigo (Figura 4). Si se considera el

73% de similitud, cada grupo se separó en agrupamientos menores; el grupo A se desglosó en los subgrupos I y II, mientras que a partir del grupo B, se formaron tres subgrupos (III, IV y V) y el testigo, que quedó aislado. Solo dos pares de poblaciones presentaron identidad (similitud = 1), y éstas se ubicaron en los subgrupos IV y V.

En el dendrograma obtenido al emplear el coeficiente de Jaccard, cambió el agrupamiento de las poblaciones (Figura 5). El cambio más acentuado se relacionó con la población testigo la cual se separó de todas las entradas de cebadilla pampeana a una similitud baja (0,43).

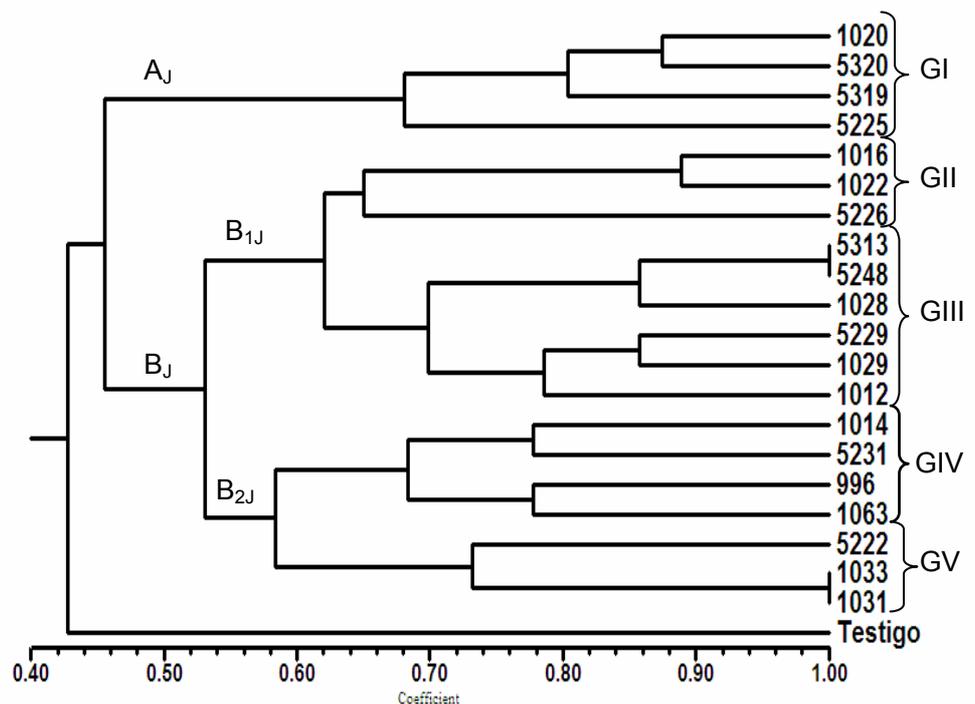


Figura 5: Dendrograma obtenido a partir de los datos morfoagronómicos cualitativos, utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard (J), con una correlación cofenética  $r=0,73$ .

A partir de este dendrograma se obtuvieron dos grupos, A<sub>J</sub> y B<sub>J</sub>. El primero de ellos incluyó a cuatro poblaciones de *B. brevis* y el segundo a las 16 restantes. Cuando se consideró un coeficiente de similitud del 64% se obtuvieron cinco grupos. El grupo I

coincidió con el que anteriormente se denominó grupo  $A_J$ , mientras que el grupo  $B_J$ , se desglosó en los grupos II, III, IV y V (Figura 5).

Comparando los dos dendrogramas el grupo I quedó constituido por las mismas poblaciones. Las poblaciones del grupo II del dendrograma obtenido con SM ( $II_{SM}$ ) coincidieron con dos del grupo  $IV_J$ . Este último grupo incluyó además a dos poblaciones (CI996 y CIA1063) que se habían congregado en los grupos  $III_{SM}$  y  $V_{SM}$  respectivamente. Los grupos  $III_{SM}$  y  $II_J$  coincidieron en dos poblaciones. El grupo  $IV_{SM}$  fue semejante al  $III_J$  con la excepción de la población N5226 y los grupos  $V_{SM}$  y  $V_J$  fueron concordantes, exceptuando la población CIA1063.

#### 1.1.5.2. Análisis de Ordenación

Los agrupamientos obtenidos a partir del análisis de coordenadas principales utilizando el coeficiente de emparejamiento simple (SM) y el de Jaccard fueron similares, por lo que sólo se presenta uno de ellos (Figura 6). La población CI1014 se mantuvo aislada y el resto, incluido el testigo, formaron cuatro grupos: el grupo 1 incluyó cinco poblaciones, el grupo 2 a otras dos y al testigo, el grupo 3 se conformó con siete poblaciones y el grupo 4 con cinco de ellas. De los dos pares de poblaciones señalado como de identidad total en los dendrogramas, solo el par N5248 y N5313 fue ordenado espacialmente en el mismo sitio, dentro del grupo 3, mientras que las poblaciones CI1031 y CI1033, aunque ambas forman parte del grupo 4 quedaron algo distanciadas. De las poblaciones del grupo 1, cuatro de las cinco coinciden con el Grupo I obtenido por el análisis de agrupamiento, independientemente del coeficiente usado. Ellas se caracterizaron por tener solamente vainas púrpuras y la gluma inferior y la lemma de los antecios pubescentes y ser de hábito preferentemente erguido.

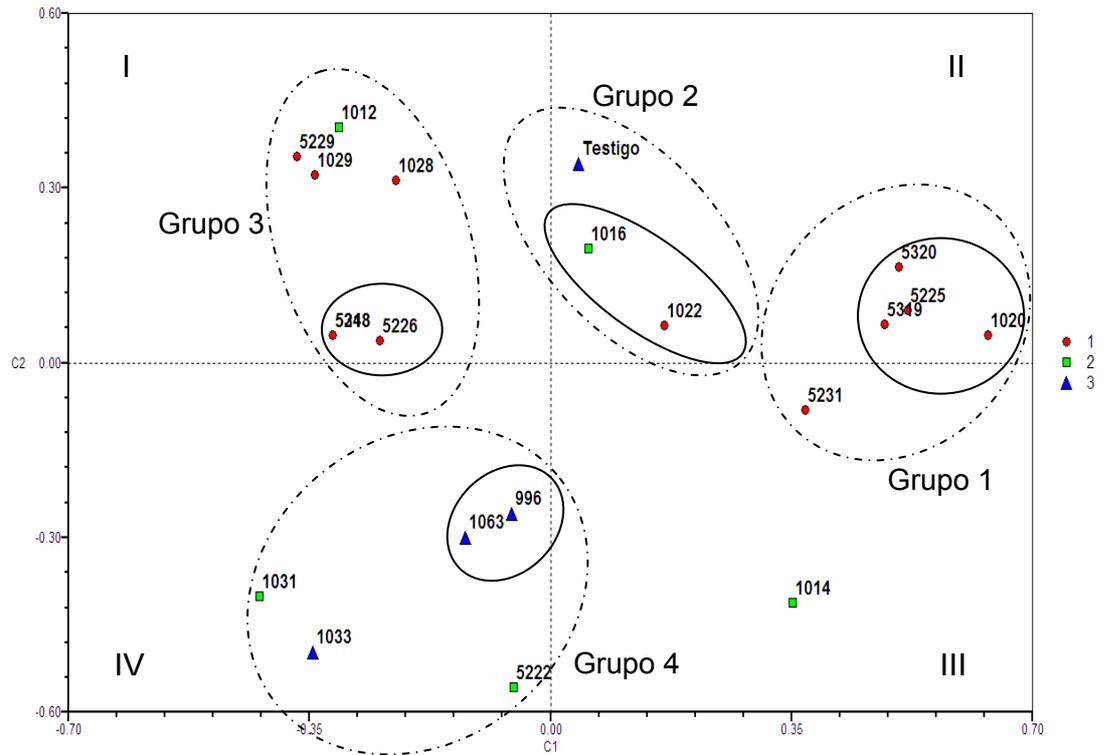


Figura 6: Agrupamiento obtenido a partir del análisis de Coordenadas Principales realizado utilizando el coeficiente de Jaccard.; C1 y C2 = coordenadas principales. Sitios rojos = 1: Monte; sitios verdes = 2: Espinal; sitios azules = 3: Pampa. En números romanos se indican los cuadrantes.

Las poblaciones del grupo 2, con excepción del testigo, coinciden con los grupos II<sub>J</sub> y III<sub>SM</sub>; las tres poblaciones quedan reunidas por presentar gluma superior y lemma pubescentes, y plantas erguidas o semipostradas con vainas púrpuras o verdes. El grupo 3 se caracterizó por agrupar poblaciones de porte erguido y semipostrado, pero con glumas y lemmas glabras; seis de las siete poblaciones integrantes correspondían a los grupos III<sub>J</sub> y IV<sub>SM</sub> obtenidos por el análisis de agrupamiento. Las poblaciones del grupo 4 resultaron casi equivalentes a las de los grupos V presentados en los dendrogramas. Ellas se caracterizaron por presentar plantas con láminas pubescentes, vainas púrpuras uniformes o mezcladas con algunos individuos de vainas verdes y porte postrado a semipostrado.

## 1.2. Caracteres Cuantitativos

### 1.2.1. Caracteres Morfológicos de Espiguillas y Antecios

La longitud de las glumas fue variable entre poblaciones ya que entre los valores máximos y mínimos observados se constató una diferencia de 3,7 y 3,4mm para las glumas inferior y superior, respectivamente (Tabla 8 y Figura 7). El promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* resultó 1,84mm inferior al de *B. catharticus*. La longitud de la gluma inferior fue menor que la de la gluma superior y las poblaciones variaron entre sí en la longitud de ambas piezas de la espiguilla, como puede observarse al comparar los valores extremos registrados (Tabla 8 y Tabla V del Apéndice).

Tabla 8: Valor *p* de los ANOVAS para los caracteres del antecio y las espiguillas, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES	Valor p	Mínimo	Máximo	B.brevis	B.cat.
Long.Gluma inferior mm)	<0,0001	5,7	9,4	6,92	8,76
Long. Gluma superior (mm)	<0,0001	6,7	10,1	8,20	10,6
Longitud Lemma (mm)	<0,0001	8,5	12,0	10,19	16,14
Longitud Arista (mm)	<0,0001	0,16	0,56	0,32	0,68
Ancho del antecio (mm)	<0,0001	1,74	2,44	2,06	2,38
Longitud Pedicelo (mm)	0,018	3,32	9,76	6,51	7,22

Las diferencias entre las poblaciones fueron altamente significativas; la gluma inferior del testigo presentó considerable longitud, pero no difirió significativamente del tamaño presentado por las seis poblaciones de *B. brevis* de mayor longitud para esa gluma, entre las cuales CI1033 presentó el registro más alto (Tabla V). La población

CIA1063 presentó el menor tamaño de gluma inferior, pero no difirió de otras once poblaciones. La longitud de la gluma superior del testigo tuvo el máximo valor absoluto, sin embargo no difirió significativamente de tres poblaciones de cebadilla pampeana. Considerando el tamaño de ambas glumas solo dos poblaciones de *B. brevis* (CI1033 y CI1014) no difirieron del testigo.

Para los caracteres longitud de la lemma y ancho del antecio también se observó variación entre poblaciones, resultando las diferencias altamente significativas (Figura 7 y Tabla V). La mayor longitud de lemma correspondió al testigo (16,14 mm), quien difirió significativamente de todas las poblaciones de *B. brevis*. Éstas presentaron un rango de variación de 8,52 mm a 12,04 mm, valores extremos que corresponden a las poblaciones CI996 y CI1012, respectivamente (Tabla 8 y Tabla V).

En ancho de los antecios también se observó un amplio rango de variación entre las poblaciones de *B. brevis* pero el testigo no se diferenció estadísticamente de cinco de ellas (Figura 7 y Tabla V). La población N5248 mostró los antecios más anchos en promedio (2,44mm), y junto con otras 2 poblaciones de cebadilla pampeana, presentaron valores mayores que los del testigo. Los antecios más angostos correspondieron a la población CIA1063 (1,74mm), la que no presentó diferencias con otras 4 poblaciones de cebadilla pampeana.

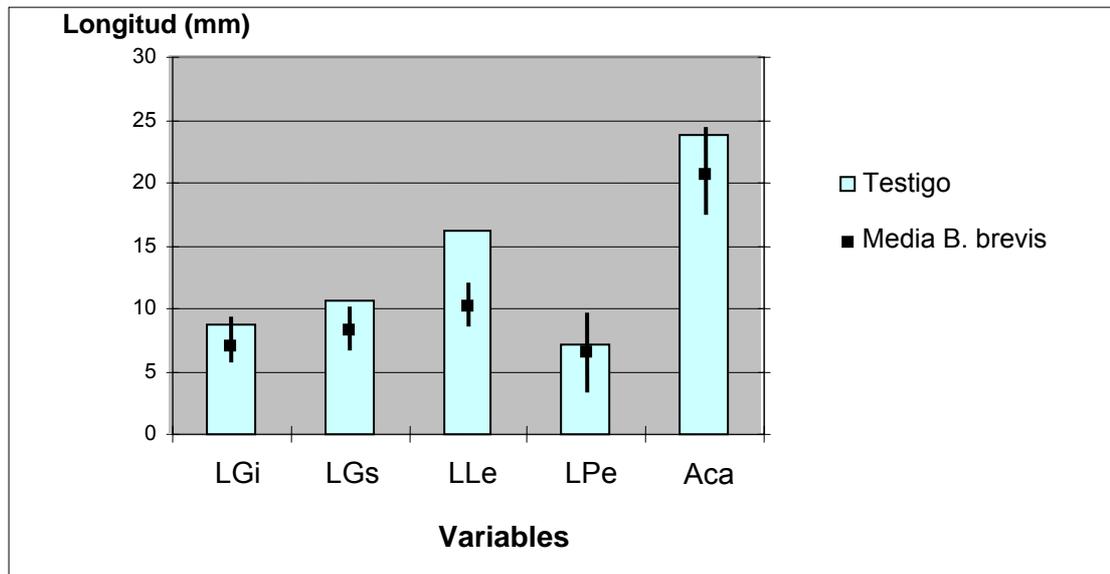


Figura 7: Promedio de las longitudes de la gluma inferior (LGi), la superior (LGs), la lemma (LLe) y el pedicelo (LPe), y del ancho del antecio (ACa) de semillas del testigo (*Bromus catharticus*) y valores medios, mínimos y máximos para las poblaciones de *B. brevis*.

Las diferencias entre poblaciones para longitud del pedicelo fueron altamente significativas (Tabla 8 y Tabla V). La amplitud de la variación en las poblaciones de *B. brevis* fue de 6,44mm; el testigo no difirió del grupo de poblaciones de *B. brevis* de mayor longitud de pedicelo (Tabla 8 y Figura 7), el cuál estuvo encabezado por la población CI1020 la que presentó pedicelos 2,5mm más largos que el testigo.

La longitud de la arista también presentó gran variación entre las poblaciones de *B. brevis* (Tabla 8 y Figura 8), ya que se observaron valores medios desde 0,16 a 0,56mm para las poblaciones N5248 y N5226, respectivamente. El testigo presentó las aristas más largas (0,68mm) y se diferenció significativamente de todas las poblaciones de *B. brevis*, excepto de N5226 (Tabla V). Por otro lado, el grupo de aristas cortas estuvo integrado por ocho poblaciones de cebadilla cuyas aristas no resultaron mayores de 0,3mm.

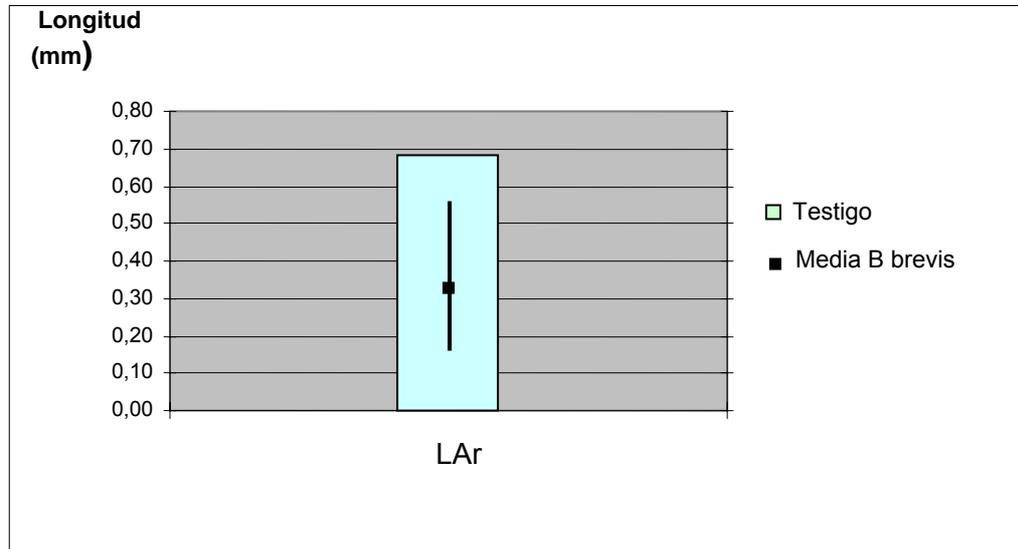


Figura 8: Promedio de la longitud de la arista (LAr) del testigo (*Bromus catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

### 1.2.2. Emergencia de Plántulas

En los caracteres relacionados con la emergencia de las plántulas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones (Tabla 9 y Tabla VI). Los promedios poblacionales para porcentaje de emergencia a los 12 días de la siembra o emergencia inicial oscilaron entre 12 y 76%. Solo tres poblaciones alcanzaron una emergencia inicial de al menos 50%; de ellas, CI996 logró el porcentaje más alto de plántulas emergidas a los 12 días de la siembra, diferenciándose significativamente del resto de las poblaciones de *B. brevis* y del testigo (Tabla VI). En valores absolutos, éste presentó un valor de emergencia inicial inferior al de todas las poblaciones de *B. brevis*, pero no se diferenció estadísticamente de las siete poblaciones que mostraron una emergencia inferior al 30% (Figura 9a y Tabla VI).

La emergencia final, registrada a los 47 días de la siembra varió entre 36 y 90% (Figura 9a). La mayoría de las poblaciones de *B. brevis* presentaron porcentajes intermedios comprendidos entre 40 y 70% y sólo en cinco de ellas más el testigo, la

emergencia de plántulas superó el 70% (Tabla VI). En esa Tabla se puede observar que también en esta fecha la población CI996 presentó el porcentaje de emergencia más alto, aunque en este caso no se diferenció significativamente de otras dos poblaciones de cebadilla pampeana ni del testigo.

Tabla 9 Valor  $p$  de los ANOVAS para emergencia inicial y final (12 días y 47 días de la siembra), valores mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES	Valor p	Mínimo	Máximo	B.brevis	B.cat.
Emergencia Inicial (%)	<0,0001	12	76	36	12
Emergencia Final (%)	<0,0001	36	90	65	82
Índice Emergencia (días)	0,0524	10,52	16,81	13,94	18,46

El índice de velocidad de emergencia varió entre 10,52 y 16,81 días para las poblaciones de *B. brevis*, y fue de 18,46 días para el testigo (Figura 9b). Si bien la entrada de cebadilla criolla fue la más lenta en emerger, no se diferenció significativamente del resto de las poblaciones ( $p>0,05$ ). Seis poblaciones de cebadilla pampeana presentaron un índice de emergencia superior a los 15 días (Tabla VI) y las poblaciones con índices de emergencia menores a los 13 días fueron CI1029, CI1020, CI1022 y N5248 (Tabla VI).

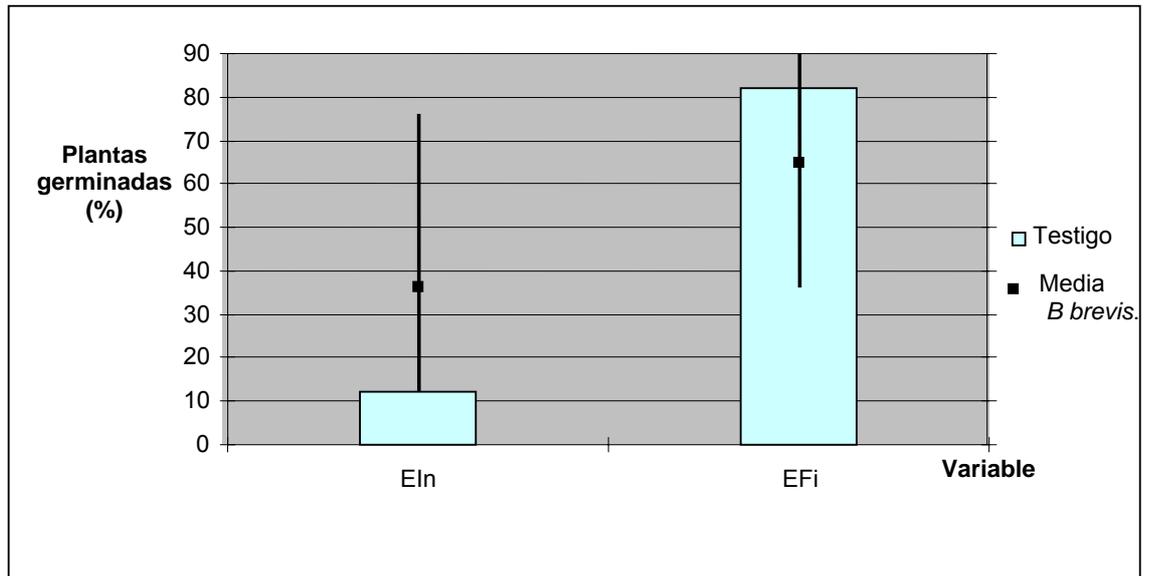


Figura 9a: Promedio de emergencia de plántulas inicial (EIn) y final (EFi) del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

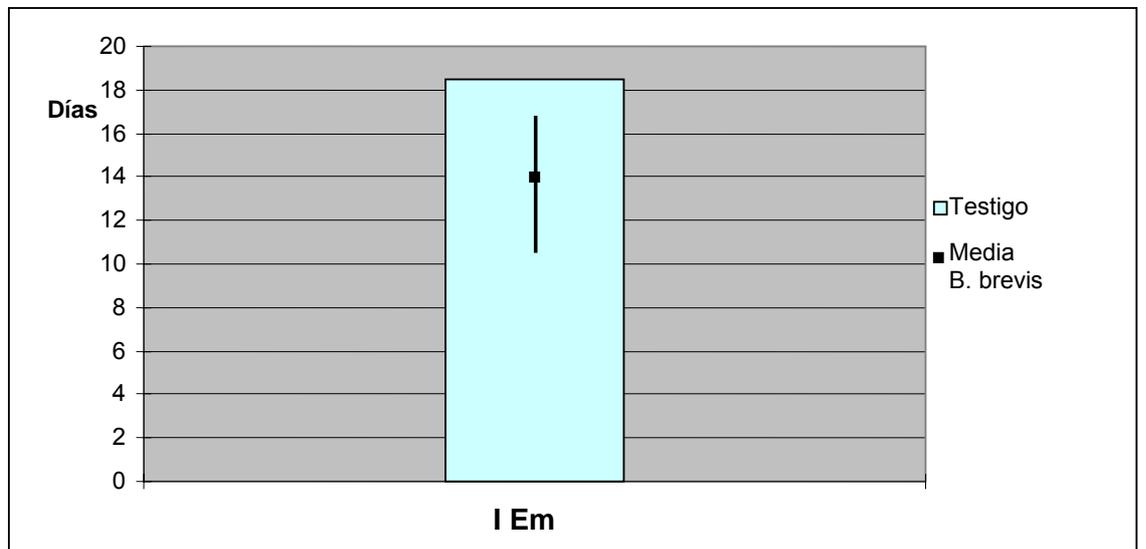


Figura 9b: Promedio del índice de emergencia (I Em) del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

### 1.2.3. Tamaño de las Láminas

#### 1.2.3.1. Longitud y Ancho foliar durante el estadio de Plántula

La longitud promedio de las hojas de las plántulas varió entre 9,42 y 12,85cm entre las poblaciones de *B. brevis* (Tabla 10 y Figura 10a), variación que resultó significativa para tamaño foliar en este estadio (Tabla VII). Nueve de ellas y el testigo presentaron las láminas cortas (<10,6cm), mientras que en el otro extremo, nueve poblaciones formaron el grupo de entradas con láminas mayores a los 11,5cm longitud; las dos poblaciones restantes presentaron longitud intermedia (Tabla VII). El testigo mostró mayor ancho foliar que cualquiera de las poblaciones de *Bromus brevis*, de las que se diferenció significativamente con un promedio de 5,3mm (Tabla VII).

Tabla 10. Valor *p* de los ANOVAS para longitud y ancho foliar de las plántulas, valores mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES	Valor p	Mínimo	Máximo	B.brevis	B.cat.
Longitud Foliar (cm)	<0,0001	9,42	12,85	11,17	10,23
Ancho Foliar (mm)	<0,0001	2,48	4,08	3,04	5,35

Entre las entradas de cebadilla pampeana el máximo ancho foliar observado fue de 4,08 mm en CI1033, y la mínima fue para CI996, con 2,48mm (Tabla 10 y Tabla VII, Figura 10b). Once poblaciones presentaron hojas muy angostas (<3mm) y ocho poblaciones exhibieron hojas intermedias de 3 a 3,5mm de ancho. La correlación entre longitud y ancho foliar en el estadio de plántula fue positiva pero no significativa ( $p>0,05$ ;  $gl=19$ ), siendo el coeficiente de correlación  $r = 0,29$ .

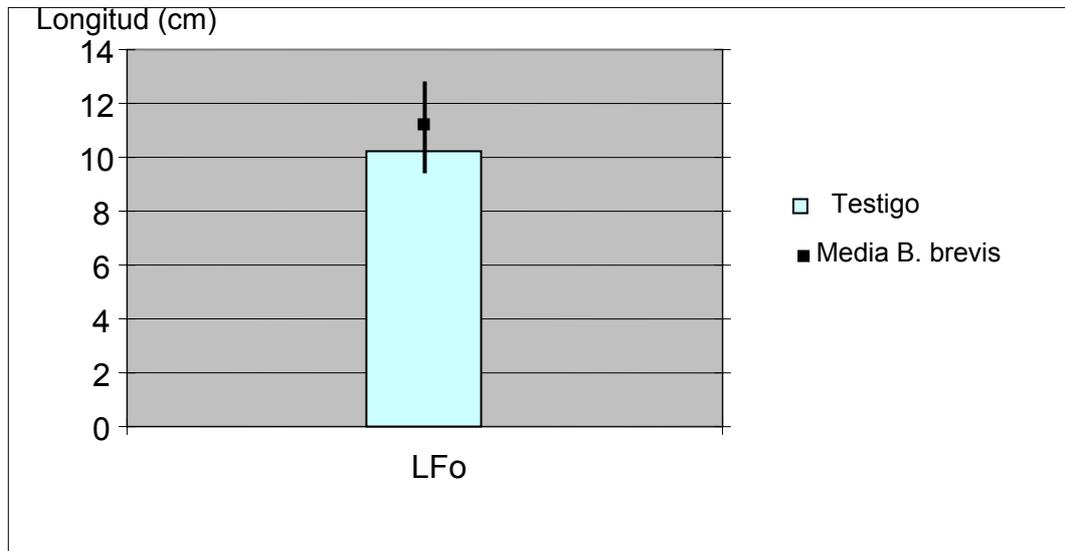


Figura 10a: Longitud foliar (L Fo) promedio en plántulas del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

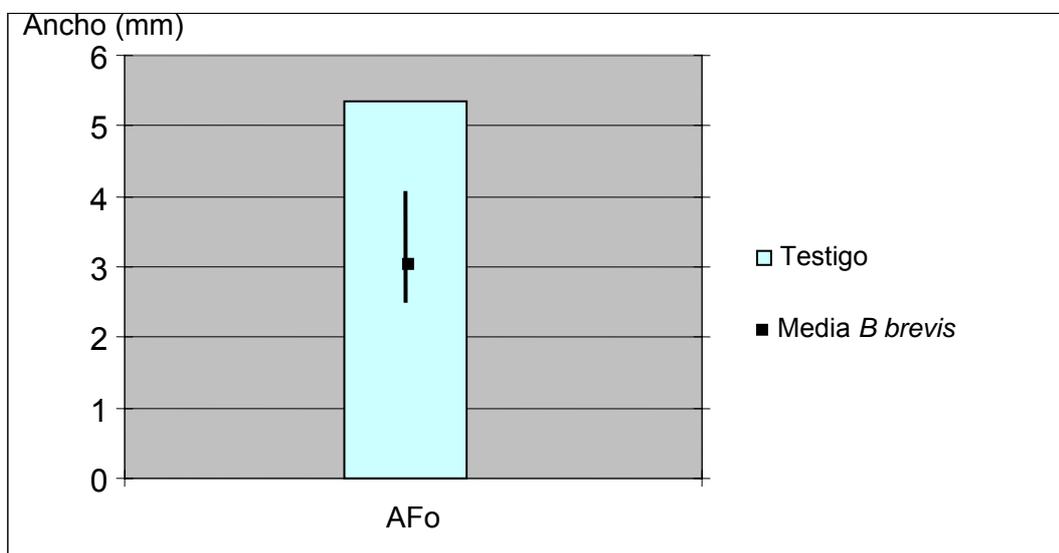


Figura 10b: Ancho foliar (A Fo) promedio en plántulas del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

### 1.2.3.2. Longitud foliar durante los estadios Juvenil y Adulto

Durante la etapa vegetativa, la longitud foliar no difirió entre poblaciones en la Fecha 1, observándose una media general de 6,9cm (Tabla 11 y Figura 11). En esa Tabla se puede observar que en la segunda fecha, las poblaciones de *B. brevis* presentaron longitudes de lámina comprendidos entre 12,27 y 16,32cm, y si bien la amplitud de la variación fue de solo 4cm, las diferencias resultaron significativas. El 50% de las poblaciones presentaron hojas con más de 15cm y el 25% de las restantes mostraron hojas menores a 13,5cm de longitud (Tabla VIII); el testigo presentó hojas más largas que las de las entradas de cebadilla pampeana, pero no llegó a diferir significativamente de 6 de esas poblaciones.

Tabla 11: Valor *p* de los ANOVAS para longitud foliar en tres fechas y longitud de la hoja bandera, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES	Valor p	Mínimo	Máximo	B. brevis	B.cat.
Long. Fecha 1 (cm)	0.081	6,90	12,24	9,614	10,35
Long. Fecha 2 (cm)	0.0066	12,27	16,32	14,64	18,54
Long. Fecha 3 (cm)	<0,0001	15,32	20,98	18,35	23,03
Long. Hoja Bandera (cm)	<0,0001	9,90	19,47	15,22	20,84

En la fecha 3 el testigo nuevamente presentó la máxima longitud foliar y se diferenció significativamente de todas las poblaciones de *B. brevis* exceptuando a CI1022 (Tablas 11 y VIII y Figura 11). En esta etapa la amplitud de la variación de la longitud foliar fue ligeramente mayor (5,6 cm); el 25% de las poblaciones presentó hojas cortas, con menos de 17cm de longitud, el 40%, hojas intermedias de 17 a

19,1cm y el 35% restante, hojas mayores a 19,5cm de longitud, aunque sin alcanzar el promedio de las hojas del testigo.

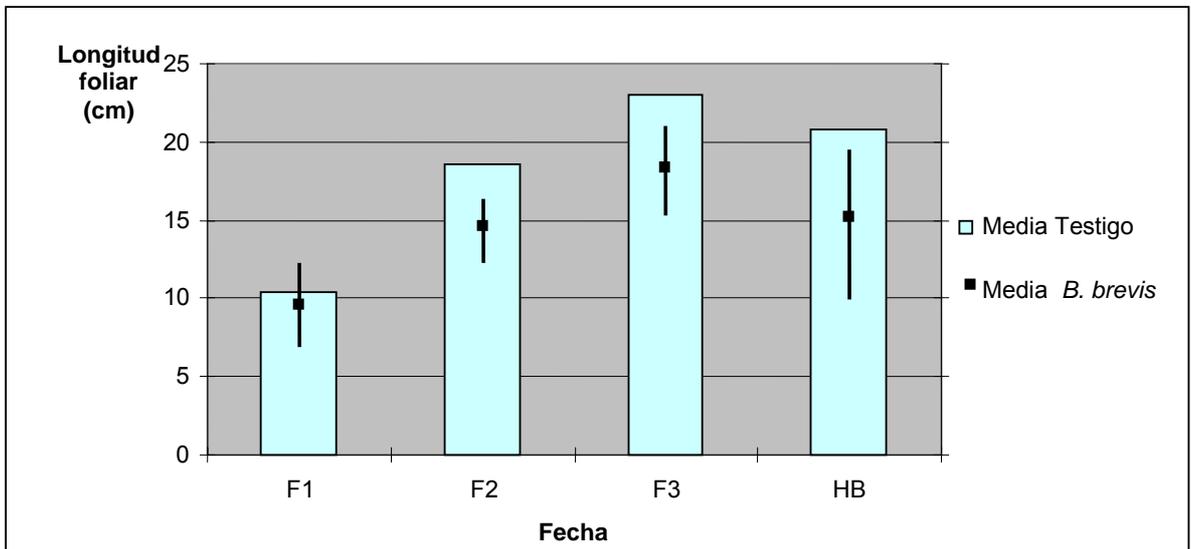


Figura 11: Longitud foliar promedio en tres fechas (F1, F2 y F3 ) durante el estadio vegetativo y de la hoja bandera (HB) del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

A través de las fechas del estadio vegetativo se observó que las poblaciones de cebadilla pampeana CI1014 y CI1033, N522, N5225 y N5248 conformaron el grupo con menores registros absolutos de longitud foliar y que además no alcanzaron los 17cm en la tercera fecha. Por el contrario, CI1016, CI1022, CIA1063 y N5229 fueron las poblaciones con hojas mayores a los 20cm de longitud en esa fecha y que en cada medición alcanzaron registros superiores al promedio (Tabla VIII). Al comparar la longitud foliar entre el estadio de plántula y el juvenil, se constató que de las diez poblaciones con hojas mayores a la media en el estadio de plántula, sólo seis presentaron registros medios superiores a la media de la tercera fecha (CI1012, CI1031, CIA1063, N5231, N5319 y N5320). Por otro lado, algunas de las que

superaron la longitud promedio en la 3ª fecha, no lo hicieron en el estadio de plántula (CI1012, CI1016, N5226, N5229 y N5313).

La longitud foliar de la hoja bandera fue más corta que la de la fecha 3 en la mayoría de las poblaciones, entre las que se detectaron diferencias altamente significativas (Tabla 11 y Tabla VIII). La hoja bandera para el promedio de *B. brevis* fue 15,22cm y dentro de esta especie se observaron poblaciones con hojas bandera de 9,9 a 19,47cm. De las veinte poblaciones de cebadilla pampeana, cuatro poblaciones presentaron longitudes de hoja bandera menores a 13,3cm, siendo CI1020 la de menor longitud. Otras diez poblaciones de esa especie exhibieron hojas de entre 13,4 y 16cm y las seis restantes, de más de 16,5cm de longitud. El testigo presentó la hoja bandera más larga (20,84cm) pero de todos modos no se diferenció significativamente de 5 poblaciones de *B. brevis* (Tabla VIII). Todas las poblaciones con menor longitud foliar en la etapa juvenil, presentaron un promedio de hoja bandera inferior a la media general, excepto la entrada N5222. En cambio, entre las poblaciones de hojas más largas en la etapa juvenil, sólo CIA1063 presentó un promedio para hoja bandera superior a la media del ensayo.

#### **1.2.4. Número de Macollos por Planta**

En el estadio de plántula el número promedio por población varió entre 2,2 y 6,2 macollos por plántula, lo que permitió considerar tres grupos artificiales (Tabla 12 y Figura 12); el de las poblaciones con menos de tres macollos, que incluyó al testigo y tres entradas de *B. brevis*, el intermedio, con 11 poblaciones que presentaron entre tres y cuatro macollos, y el conformado por las cinco poblaciones con mayor número de macollos (> 4 mac/plántula; Tabla IX). En este último grupo se destacó la entrada N5222 por presentar un promedio de 6,2 macollos, con lo cual se diferenció estadísticamente del resto.

En el estadio juvenil, al efectuarse el recuento de macollos por planta se observó que todos ellos eran vegetativos y que las poblaciones de *B. brevis* mantenían diferencias estadísticamente significativas entre sí (Tabla 12 y Tabla IX). La variación del número de macollos por planta fue amplia, entre 7,8 y 19,8 para las poblaciones correspondientes a esta especie; ocho poblaciones presentaron menos de 12 macollos, cinco fueron intermedias, y las 7 restantes exhibieron más de 16 macollos por planta. El testigo se caracterizó por presentar el menor número de macollos en esta etapa (Tabla 12 y Tabla IX) aunque no se diferenció significativamente de 8 poblaciones de *B. brevis*. El número promedio de macollos del ensayo observado en esta etapa incrementó con respecto al de la etapa de plántula, el que fue superado en casi 4 veces.

Tabla 12: Valor *p* de los ANOVAS para número de macollos (Mac) vegetativos en el estadio de plántula, de juvenil (F1) y de adulto (F2), número de macollos reproductivos y totales en F2 y prolificidad, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES	Valor <i>p</i>	Mínimo	Máximo	<i>B. brevis</i>	<i>B.cat.</i>
Mac. Plántulas	<0,0001	2,20	6,20	3,60	2,38
Mac. Vegetativos F1	0,0001	7,86	19,80	14,01	6,00
Mac. Vegetativos F2	<0,0001	1,29	11,87	5,15	1,80
Mac. Reproductivos F2	<0,0001	10,93	33,64	21,14	9,87
Mac. Totales 2F	<0,0001	12,21	40,79	26,28	11,67
Prolificidad	0,0001	0,72	0,92	0,81	0,85

La siguiente fecha de recuento correspondió al estado adulto y en ese período parte de los macollos eran vegetativos y parte ya se encontraban en el período de alargamiento de entrenudos, es decir en el inicio de la etapa reproductiva. La densidad de macollos vegetativos fue menor a la observada en la etapa anterior y mostró una variación en los promedios poblacionales desde 1,12 (CI1020) a 11,87 macollos por planta (CIA1063) como puede observarse en la Figura 12. En cinco poblaciones de cebadilla pampeana se observaron menos de 4 macollos y solo en tres hubo más de 7 de ellos. El promedio para las poblaciones de *B. brevis* fue de 5,15 macollos por planta, valor muy superior al del testigo que solo presentó 1,8 macollos vegetativos, aunque no se diferenció de seis poblaciones de cebadilla pampeana (Figura 12 y Tabla IX).

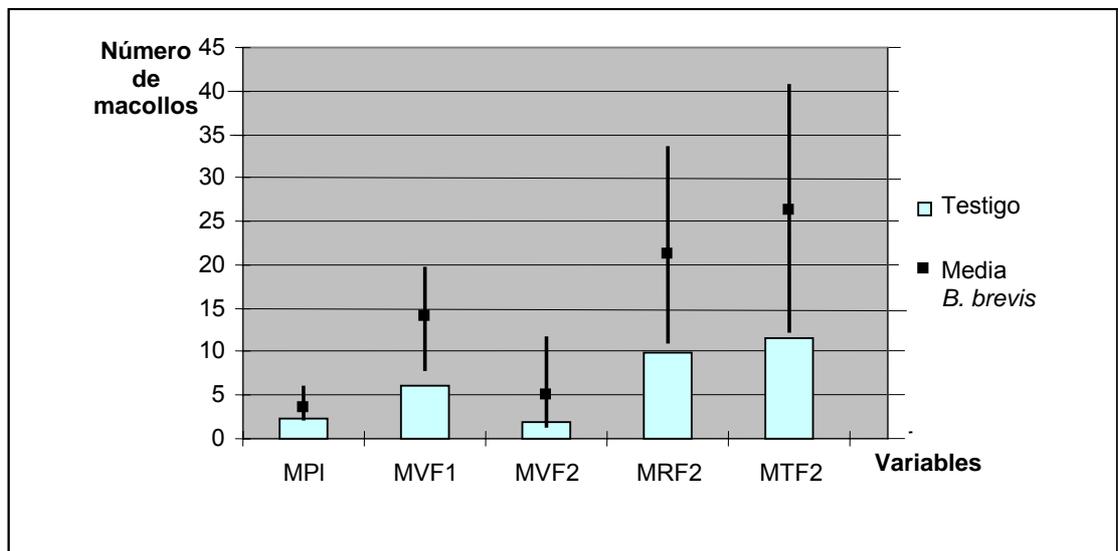


Figura 12: Número de macollos vegetativos promedio de los estadios de plántula (MPI), juvenil (MVF1) y adulto (MVF2) y número de macollos reproductivos (MRF2), totales (MTF2) y prolificidad (Pr) del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

En la etapa reproductiva, en todas las poblaciones incluido el testigo, el número de macollos reproductivos fue mucho mayor que el de macollos sin panoja visible, registrándose un promedio para *B. brevis* de 21,14 macollos por planta. El menor número le correspondió al testigo (9,87 mac.) y si bien algunas poblaciones de *B. brevis* presentaron promedios bajos, cercanos a los 10 macollos, en otras el promedio superó los 30 macollos (Figura 12). Dada la amplitud en el número de macollos reproductivos que presentaron las poblaciones de cebadilla pampeana, las diferencias entre éstas fueron altamente significativas (Tabla IX); nueve poblaciones presentaron menos de 19 macollos por planta, 6 poblaciones entre 19 y 24 y las cinco poblaciones restantes más de 26 macollos.

El número de macollos totales también presentó gran variación entre las poblaciones de *B. brevis*, desde 12 hasta 40 macollos mientras que el testigo solo presentó un total de 11,67 macollos por planta (Figura 12). Esa cantidad estuvo conformada en su mayor parte por la contribución de los macollos reproductivos, como puede observarse en la Tabla IX donde también se evidencia que las diferencias interpoblacionales resultaron altamente significativas. Las cuatro poblaciones que presentaron más de 35 macollos no difirieron entre sí, como tampoco el testigo de la entrada CI1020, que fueron las dos de menor número de macollos totales. La densidad de macollos por planta en este período de la etapa adulta fue el mayor que se observó durante la presente experiencia, siendo el incremento promedio con respecto al presentado por las plántulas, superior en más de 7 veces. La correlación entre número de macollos en la primera y segunda fecha fue significativo y positivo ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,01$ ).

La variación observada en prolificidad fue altamente significativa, indicando que la proporción de macollos reproductivos con respecto al total fue diferente entre poblaciones. El rango de variación para *B. brevis* se extendió entre 0,72 y 0,92. El 45% de las poblaciones presentaron prolificidad inferior a 0,79, en un 25% fue intermedia

(entre 0,80 y 0, 85) y el 30% restante mostró promedios mayores a 0,86. De acuerdo con estas categorías la prolificidad del testigo fue intermedia (Tabla IX).

#### **1.2.5. Altura del canopeo, hasta la hoja bandera y máxima**

Se observaron diferencias significativas para todas las variables relacionadas con la altura, excepto para altura máxima o total a floración (Tablas 13 y X). La altura del canopeo varió entre 9,8 y 16,9cm, con un promedio de 13,9cm para las poblaciones de *B. brevis* y similar para el testigo (Figura 13). El grupo con canopeo de mayor altura fue el que superó los 14,5cm de altura y estuvo integrado por 11 poblaciones de *B. brevis* que no difirieron entre sí; el máximo valor absoluto del grupo lo presentó la población CI1022. El testigo y otras cinco poblaciones de *B. brevis* presentaron canopeo de altura intermedia y sólo en cuatro poblaciones de esa especie, la altura de follaje fue similar o menor a los 12cm.

La altura hasta la hoja bandera también mostró amplia variabilidad entre las poblaciones (Figura 13). El valor medio para *B. brevis* fue 42,90cm, pero tres poblaciones presentaron menos de 36cm, once poblaciones mostraron valores cercanos al promedio y las seis restantes alcanzaron más de 46cm de altura hasta la hoja bandera; el testigo se ubicó en este último grupo (Tabla 13 y X). La población N5226 presentó mayor altura hasta la hoja bandera en promedio, pero no se diferenció significativamente de las 5 poblaciones de cebadilla pampeana que presentaron las mayores longitudes, ni de la población testigo. Por otro lado, la población CI1020 fue la de menor altura hasta la hoja bandera.

Tabla 13: Valor  $p$  de los ANOVAS para altura del canopeo y hasta la hoja bandera y altura máxima en plantas en floración, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES	Valor $p$	Mínimo	Máximo	<i>B. brevis</i>	<i>B. cat.</i>
Altura del canopeo (cm)	0.0003	9,80	16,87	13,9	13,45
Altura hasta Hoja Bandera (cm)	<0,0001	29,11	54,08	42,9	45,99
Altura Máxima (cm)	0.0673	78,66	108,93	96,8	101,05

La altura máxima alcanzada por las plantas en plena floración fue de 96,8 cm, con un intervalo de aproximadamente 30 cm entre los valores extremos (Tabla 13). A pesar de ello, las diferencias no fueron significativas entre las poblaciones a nivel del 5% (Tabla 13). La entrada de *B. catharticus* presentó una altura promedio superior a la del promedio general (Figura 13). Como la las poblaciones no difirieron en altura total pero sí en altura hasta hoja bandera, la diferencia entre esos registros también varió entre entradas; dicha diferencia corresponde a la longitud de la caña más el raquis de la inflorescencia (datos no mostrados).

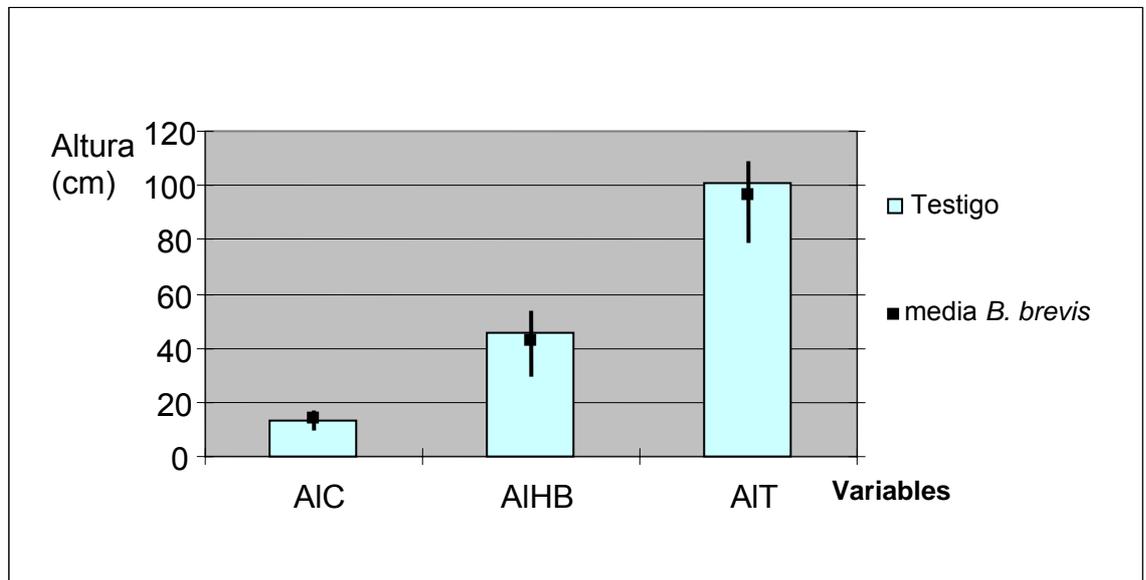


Figura 13: Promedio de la altura del canopeo (AIC) y hasta la hoja bandera (AIHB) y altura máxima (AIT) del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

### 1.2.6. Producción de Materia Seca

El primer corte de forraje fue realizado a principios de octubre, momento en que las plantas se encontraban entre fines del estadio vegetativo y luego del primer recuento de macollos. El forraje producido fue escaso y fluctuó entre las poblaciones entre 3,76 y 21,1 gramos de materia seca (MS) por planta (Tabla 14 y Figura 14). Las diferencias extremas fueron de aproximadamente 17g de MS, pero a pesar de ello fue posible diferenciar estadísticamente las poblaciones (Tabla 14 y Tabla XI). La mayoría de las ellas (60%) presentaron valores intermedios de MS (5 a 15g), dos entradas produjeron menos de 5 gramos (N5319 y CI1033) y las de MS superior a los a 15g fueron CI996, CI1022 y CIA1063. La correlación entre número de macollos del estadio juvenil y la producción de MS del mismo momento fue alta y significativa ( $r = 0,68$ ). La MS por macollo calculada en base a las anteriores variables, fue de 0,72g en promedio; los

macollos del testigo pesaron 1,47g, y el de las poblaciones de *B. brevis* variaron entre 0,36 y 1,12g de MS (Tabla XI).

Tabla 14: Valor *p* de los ANOVAS para producción de materia seca (MS) en dos fechas (F1 y F2) y acumulada, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES	Valor p	Mínimo	Máximo	<i>B. brevis</i>	<i>B. cat.</i>
MS Fecha1 (g)	0.014	3,77	21,13	11,19	8,80
MS Fecha 2 (g)	0.052	20,58	134,13	78,22	91,40
MS Acumulada (g)	0.034	28,42	148,69	86,05	100,20

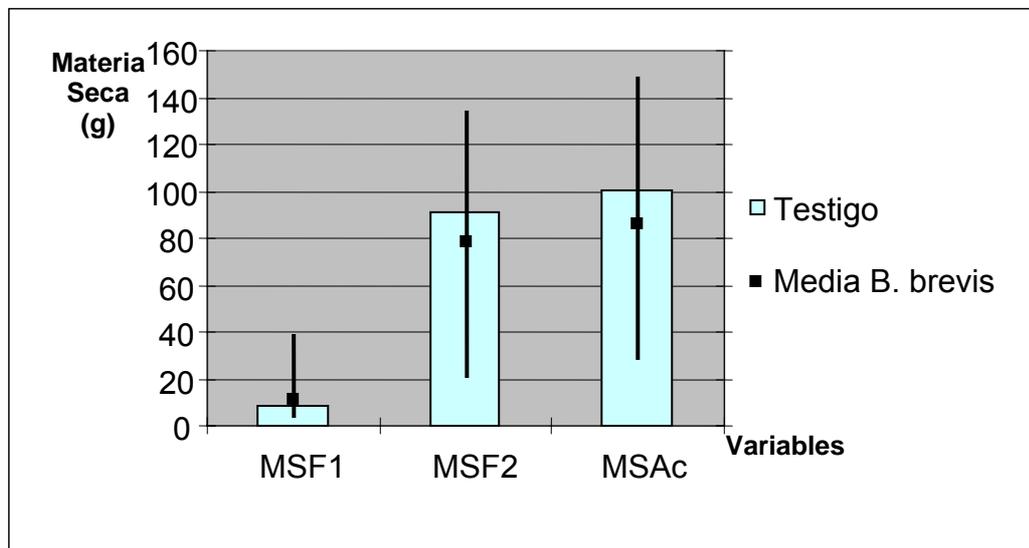


Figura 14: Promedio de la materia seca en el corte 1 (MSF1), en el corte 2 (MSF2) y de la acumulada en los dos cortes (MSAc) del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

El segundo corte fue realizado a mediados de noviembre, época en que las plantas ya presentaban macollos con inflorescencias. Aunque el rango de variación de los

promedios poblacionales fue amplio (113,5g), estrictamente hablando no se detectaron diferencias significativas para MS para un nivel de  $\alpha = 0,05$  ya que se obtuvo un valor de  $p = 0,052$  (Tabla 14). El promedio de MS obtenido para las poblaciones de *B. brevis* fue 78,22g, el cual fue superado por el promedio de la población testigo. Los promedios poblacionales de la cantidad de MS producida en el primer y el segundo corte presentaron correlación positiva ( $r = 0,76$ ) y altamente significativa ( $p < 0,01$ ). También la correlación entre el número de macollos del estadio adulto y la producción de MS para este estadio fue alta y significativa y alcanzó el mismo valor que en el estadio juvenil ( $r = 0,68$ ). Por su parte, el peso seco promedio por macollo fue de 3,21g, varió entre 1,69 y 4,26g de MS en las poblaciones de *B. brevis* (Tabla XI), y alcanzó los 7,83g en el testigo.

Para la variable materia seca acumulada sí se obtuvieron diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 14 y XI), a pesar de que la diferencia en MS entre promedios extremos fue similar a lo observado para el segundo corte (120,3g). La MS promedio para las poblaciones de *B. brevis* fue de 86,05g, y de 100,2g para el testigo. Las poblaciones de menor MS acumulada luego de los dos cortes fueron N5319 y CI1020, debido principalmente a la escasa MS aportada en el segundo de ellos. En el otro extremo se encontraron las poblaciones CI1012 y CI1022 con más de 140g de MS por planta, y luego las poblaciones CI996, CI103, CIA1063, CI1028, N5231 y el testigo, con una producción aproximada de 100 a 125g de MS por planta.

### **1.2.7. Componentes de la Panoja**

Las diferencias entre poblaciones en cuanto a número de espiguillas por panoja fueron altamente significativas (Tabla 15 y XII). El testigo presentó el valor más alto, alcanzando las 37 espiguillas por panoja, diferenciándose significativamente de las

poblaciones de *B. brevis*. Para esta especie se observó una amplia variación interpoblacional, con poblaciones que produjeron desde 11,3 hasta 29,1 espiguillas por panoja (Figura 15). Tres de ellas presentaron menos de 17 espiguillas, en otras siete registraron entre 17 y 23 espiguillas y las nueve poblaciones restantes tuvieron mas de 24 espiguillas por panoja.

Tabla 15: Valor  $p$  de los ANOVAS para número de espiguillas por panoja y de cariopses por espiguilla, valor mínimo, máximo y promedio de las poblaciones de *Bromus brevis* y promedio de la población de *Bromus catharticus* (*B.cat.*).

CARACTERES		Valor p	Mínimo	Máximo	<i>B. brevis</i>	<i>B. cat.</i>
Espiguillas por panoja	por	<0,0001	11,27	29,13	21,85	37,37
Cariopses por espiguilla	por	<0,0288	6,55	9,11	6,67	7,35

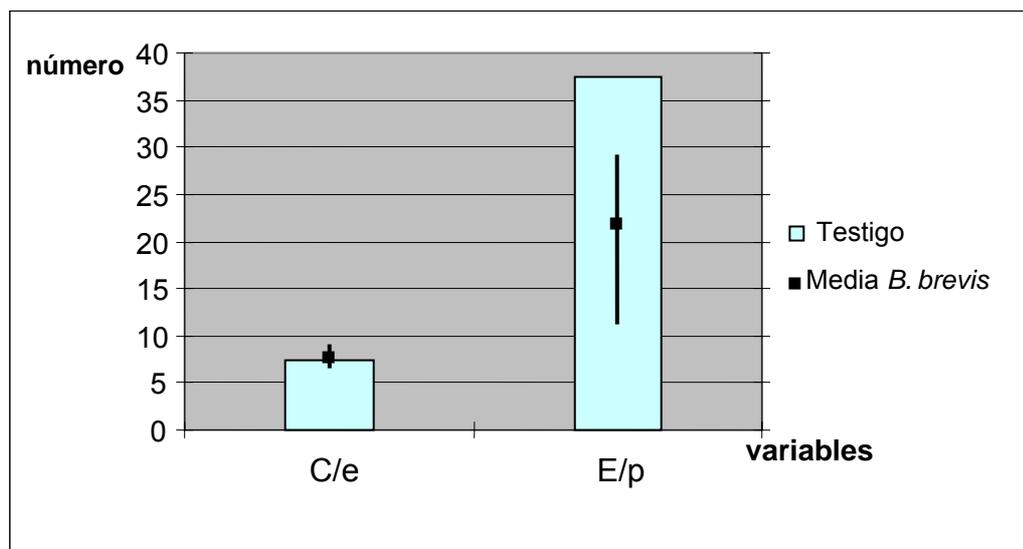


Figura 15. Promedio del número de cariopses por espiguilla (C/e) y de espiguillas por panoja (E/p) del testigo (*B. catharticus*) y valores medio, mínimo y máximo para las poblaciones de *B. brevis*.

También se detectaron diferencias significativas entre poblaciones para número de cariopses por espiguilla (Tabla 15 y XII), aunque en este caso el testigo no alcanzó el mayor registro (Figura 15). Cuatro poblaciones de *B. brevis* presentaron seis cariopses en promedio, en otras diez y el testigo se observaron siete cariopses, pero en cinco entradas de cebadilla pampeana el número de cariopses superó los 8 por espiguilla (N1029, N5226, N5229, N5319 y N5248).

## **1.2.8. Afinidad entre las Poblaciones**

### **1.2.8.1. Análisis de agrupamiento**

El ajuste de los datos a su representación gráfica fue ligeramente más alto cuando la similitud entre poblaciones se estableció en base al coeficiente de distancia taxonómica ( $r=0,73$ ), ya que con el coeficiente de distancia euclídea se obtuvo un  $r=0,72$ . La agrupación obtenida con el empleo de dichos coeficientes fue similar, por lo que sólo se presenta el dendrograma obtenido con el de distancia taxonómica (Figura 16). El testigo quedó separado a un valor de similitud de 1,87 de las poblaciones de *B. brevis*, entre las cuales la menor similitud fue de 1,52 y separó la entrada CI1022 del resto. A mayor similitud se fueron desglosando los grupos Ga1 y Ga2 con dos poblaciones cada uno, y posteriormente los grupos Ga3 y Ga4 con mayor número de integrantes (4 y 11, respectivamente).

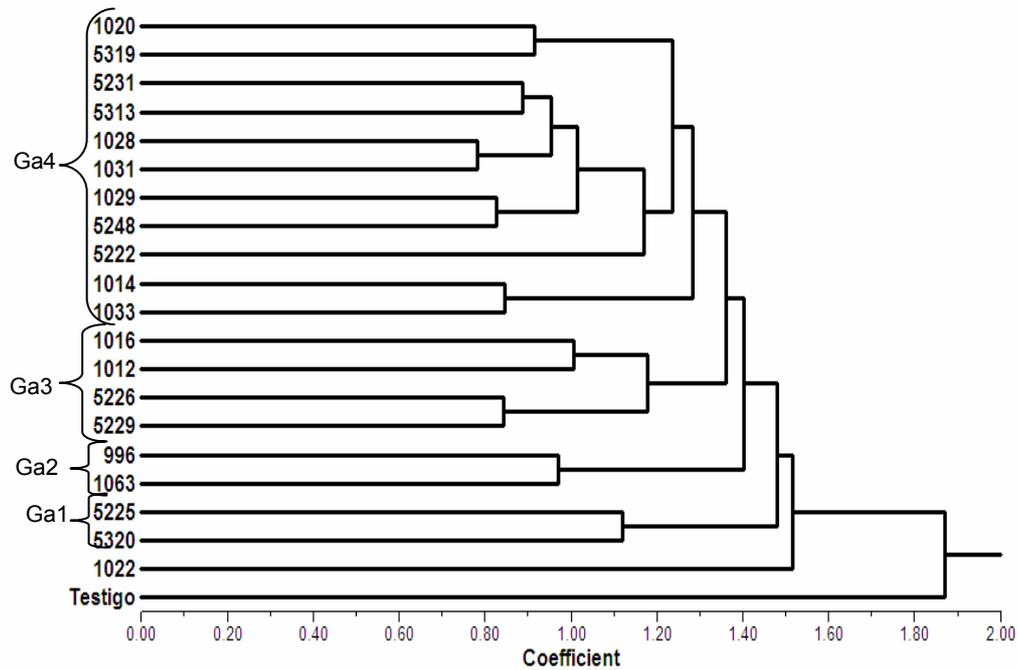


Figura 16: Dendrograma obtenido a partir de los datos morfológicos y agronómicos cuantitativos, utilizando el coeficiente de distancia taxonómica. Los grupos formados por la técnica de agrupamiento se designan con las letras Ga.

### 1.2.8.2. Análisis de ordenamiento

Los componentes principales R1 y R2 contribuyeron a explicar sólo el 43,95% de la variación contenida en las poblaciones y si bien la mayor aporte le correspondió a R1, con 24,08%, el componente R2 representó un 19,81% (Figura 17). El tercer componente (R3) aportó un 11,74% a la explicación de la variación observada; para explicar el 75% de la variación se requirió la consideración de los 5 primeros componentes y 9 de ellos para llegar al 90% (datos no mostrados).

Las variables de mayor peso en la composición del R1 fueron: número de macollos vegetativos en los estadios juvenil y adulto, y de reproductivos, altura del canopeo y producción de materia seca en el estadio juvenil. En el segundo componente intervinieron principalmente la longitud de la arista, la longitud foliar en diferentes estadios de los individuos juveniles y adultos y el ancho y largo de las láminas en las plántulas. En el componente R3 los caracteres predominantes en ese R3 fueron

emergencia de plántulas inicial y final desde semillas cosechadas en el ensayo general.

El ordenamiento establecido por R1 y R2 (Figura 17) ubica al testigo en el cuadrante III, muy separado de las poblaciones de *B. brevis* por el componente R2. El componente R1 separa en sus extremos a dos pares de entradas, a la derecha el par N5225 y N5320 (Go1) y a la izquierda el grupo Go5 con CI996 y CI1063; los integrantes de cada par se separaron a su vez por su posición en el R2. Esos mismos grupos se formaron mediante el análisis de agrupamiento, correspondiendo a los grupos Ga1 y Ga2, respectivamente.

El resto de las poblaciones se reunió en la región media del R1, aunque podrían considerarse tres grupos en función del cuadrante en el que se encontraron. El Go2 en el cuadrante II, con siete entradas, dos de ellas algo distantes, y el Go4 con 6 entradas ubicadas casi completamente en el primer cuadrante; las entradas de estos grupos se encontraban reunidas en el grupo Ga4, excepto CI1022 (Figura 16). Por último, el Go3 se ubicó entre los cuadrantes III y IV, con las cuatro poblaciones que aparecieron reunidas en el dendrograma como grupo Ga3. Al comparar este análisis de ordenamiento con el de agrupación se observó coincidencia en varios de los grupos, pero la mayor diferencia estuvo en la población CI1022 que estaba aislada en el análisis de agrupamiento, pero integrada a Go4 en el de ordenación. Sin embargo al considerar el tercer componente principal, la población CI1022 quedó separada del resto del grupo Go4 por presentar bajos porcentajes de emergencia de plántulas (datos no mostrados).

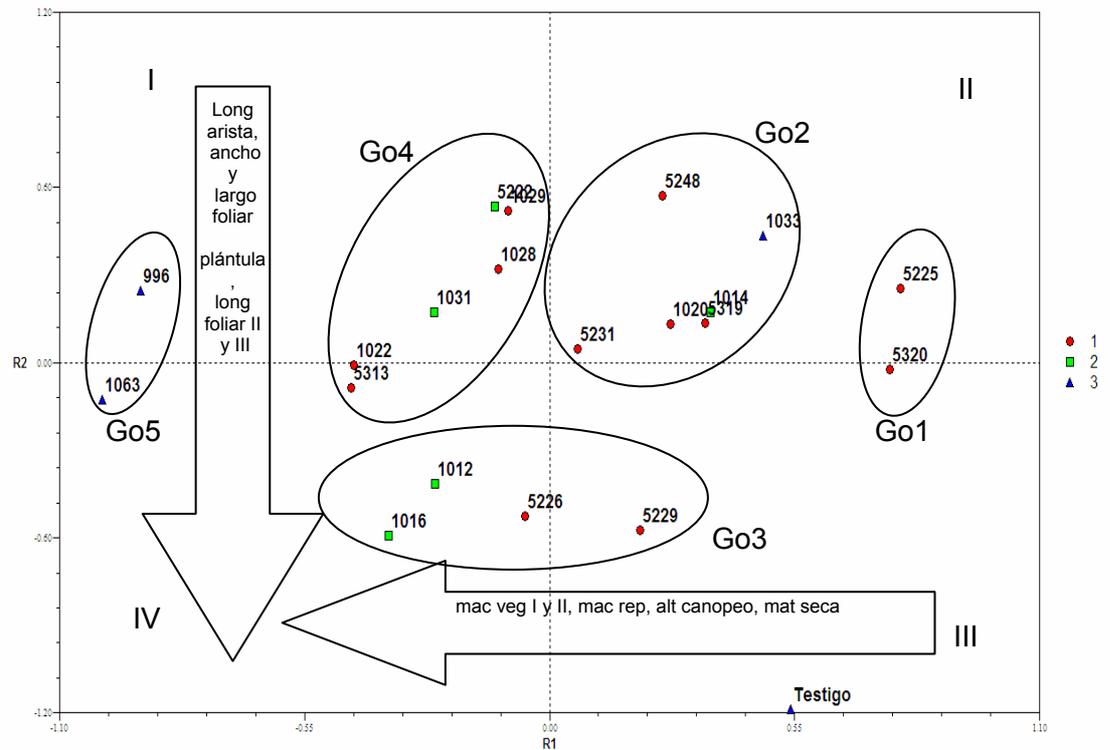


Figura 17: Ordenamiento de las poblaciones en función de los componentes principales R1 y R2, obtenido a partir de los datos morfológicos y agronómicos cuantitativos. Los grupos formados por la técnica de ordenación se designan con las letras Go. Sitios rojos = 1: Monte; sitios verdes = 2: Espinal; sitios azules = 3: Pampa. En números romanos se indican los cuadrantes.

Las poblaciones de Go5 se caracterizan por presentar altos registros en número de macollos, altura del canopeo y producción de materias seca por plantas, características opuestas a las de las poblaciones del grupo Go1. En los grupos Go3 las entradas presentaron valores intermedios en macollos, materia seca y altura del canopeo, pero se diferenció de los otros grupos por tener mayor tamaño foliar y aristas más largas. A su vez Go2 y Go4 presentaron registros próximos a la media o ligeramente opuestos a los de las poblaciones de Go3.

## **2. Caracterización molecular**

### **1. Productos de amplificación de RAPDs**

Los cinco cebadores de RAPDs utilizados no permitieron generar información relevante que permitiera separar las poblaciones ya que hubo problemas con el ajuste de la técnica, dada por el bajo número de bandas amplificadas y la repetibilidad obtenida. Debido al gran número de individuos resultó necesario utilizar entre dos y tres geles para obtener los registros completos de las poblaciones y se observó que algunas bandas registradas para un determinado individuo se visualizaban en forma inconsistente en un gel pero no en otro. Entre los marcadores que se utilizaron el que resultó mas informativo fue el marcador A10, ya que permitió obtener un mayor número de bandas con mejor resolución pero no revelaron suficiente variabilidad como para comparar las poblaciones.

### **2. Productos de amplificación de SSRs**

Los microsatélites diseñados para *B. tectorum* no resultaron informativos para *B. brevis*. El programa de amplificación mencionado por Ramakrishan (2004) no permitió obtener productos de amplificación para *B. brevis* a pesar de que se probaron además otros programas con diferentes temperaturas de apareamiento (*annealing*). Los mejores resultados se obtuvieron con los cebadores Bt 30 y Bt 33, ya que se lograron visualizar bandas pero no fueron suficientes para estimar la variabilidad presente en las poblaciones de cebadilla pampeana

### 2.3. Productos de amplificación de ISSRs

Los 3 cebadores del tipo ISSR utilizados permitieron obtener 58 bandas como producto de amplificación, 39 de ellas polimórficas. El número de bandas producto de cada cebador varió entre 16 y 23, las que permitieron obtener entre 60 y 84 patrones diferentes (Tabla 16 )

Tabla 16: Número de bandas, patrones e Índice de Diversidad (DI) para cada cebador de tipo ISSR utilizado.

ISSR	Motivo o secuencia	N° bandas	N° patrones	Índice de Diversidad (DI)
ISSR-3	(GGAGA) <sub>3</sub>	23	84	0,983
ISSR-5	(AG) <sub>8</sub> T	19	80	0,982
ISSR-6	(AC) <sub>8</sub> CT	16	60	0,972

#### 2.3.1 Índice de Diversidad (DI)

El Índice de Diversidad (diversity index; DI) varió entre 0,972 y 0,983. El número de bandas polimórficas observadas para cada uno de los cebadores fueron 15, 14 y 10 respectivamente. Al analizar el DI de cada marcador dentro de poblaciones se observaron diferencias en el grado de información generado por los mismos (Figura 18). El marcador ISSR3 detectó valores entre 0,449 y 0,857. El valor más bajo le correspondió a la población N5231 y el más alto a las poblaciones CI1028, CI1029, CI1016 y N5313. Para el marcador ISSR5 el valor más bajo detectado fue 0,571 y el más alto, 0,857, en CI1031 y N5248, respectivamente. El marcador ISSR6 detectó

valores entre 0,245 y 0,816, este último correspondiente a CI1022. Para los marcadores ISSR5 e ISSR6, el DI mas bajo correspondió a N5320. El testigo presentó valores DI superiores a 0,6 para cada uno de los marcadores.

En cinco poblaciones de *B. brevis* y el testigo, el marcador ISSR3 fue el de mayor poder discriminante, mientras que ISSR5 fue más informativo para ocho poblaciones y el marcador ISSR6 hizo lo propio en cuatro poblaciones de cebadilla pampeana.

Para la población CI1020 los 3 marcadores tuvieron el mismo valor DI (Figura 18).

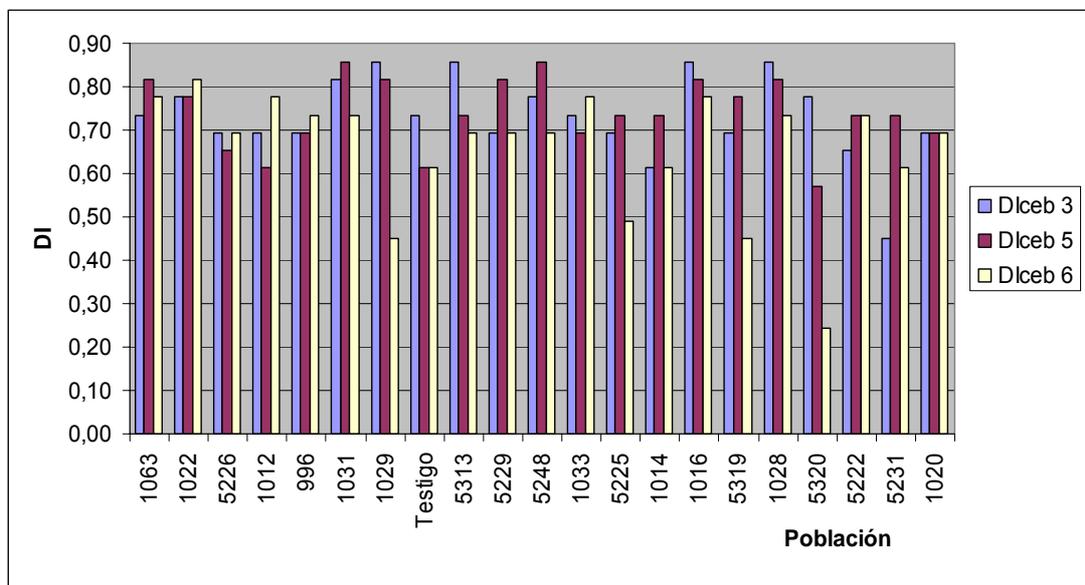


Figura 18: Índice de Diversidad (DI) por ISSR y por población.

### 2.3.2 Analisis Molecular de la Varianza (AMOVA )

A partir del Análisis Molecular de la Varianza se observó que el 56% de la variación total observada a nivel molecular correspondió a diferencias entre individuos dentro de las poblaciones y el 44% restante correspondió a diferencias entre las poblaciones estudiadas en el presente trabajo (Tabla 17).

Tabla 17: Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) para las 20 poblaciones de *B. brevis* y la población testigo de *B. catharticus* analizadas con los 3 marcadores ISSR.

Fuente de variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Componentes de la Varianza	% de variación
Entre Poblaciones	20	530.463	3.20625 Va	44.01
Dentro de poblaciones	126	514.000	4.07937 Vb	55.99
Total	146	1044.463	7.28562	
Fixation Index	FST :	0.44008		
Test de Significancia (1023 permutaciones)				
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000				
P(rand. value = obs. value) = 0.00000				
P-value = 0.00000+-0.00000				

### 2.3.3 Afinidad entre las poblaciones en base a los caracteres moleculares

#### 2.3.3.1 Análisis de agrupamiento

El dendrograma construido a partir de la matriz de similaridad calculada con el coeficiente de emparejamiento simple reveló que la similitud entre las poblaciones de *B. brevis* fue superior al 59%. El ajuste entre la representación a partir del dendrograma y los datos fue de 0,63. Mediante este análisis no fue posible separar al

testigo perteneciente a *B. catharticus* de las poblaciones de *B. brevis* (Datos no mostrados).

El testigo se agrupó en el medio de las poblaciones de *B. brevis* y seis de sus individuos conformaron un grupo con una similitud de 0,80. La similaridad entre algunas poblaciones de cebadilla pampeana y el testigo fue mayor al 68% utilizando el coeficiente de similitud de Emparejamiento Simple.

En *B. brevis* la mayor similitud fue 1, pero solamente se observó identidad en dos pares de individuos de las poblaciones N5222 y N5231, uno por población.

Los individuos de las poblaciones CI1033, N5226, CI996, N5225, CI1014, N5320, N5222 y N5231 se posicionaron juntos formando un grupo compacto. Para el resto de las poblaciones la mayor parte de sus individuos se agruparon muy próximos y el resto de los miembros de la población lo hizo pero a un menor nivel de similitud entre ellos.

### **2.3.3.2 Análisis de ordenamiento**

Cuando se efectuó el análisis de coordenadas principales en particular para cada cebador, utilizando los datos relevados con cada uno de ellos por separado, no se obtuvo un agrupamiento tan conciso como el que se resultó a partir del análisis con todos los marcadores registrados, a partir de los tres cebadores utilizados, en conjunto. A partir del análisis de Coordenadas Principales se observó que en general los individuos de la misma población tendieron a agruparse juntos (Figura 19). Las dos primeras componentes contribuyeron a explicar un 23% de la variabilidad.

En el gráfico que representa la dispersión de los individuos obtenida a partir del ACP (Figura 19) se observó que en el primer cuadrante se encontraban todos los individuos de la población N5320 y entre 4 y 6 individuos de las poblaciones de N5231, N5222 y CI1028.

Todos los individuos de las poblaciones CI1022 y CIA1063 se agruparon en el segundo cuadrante, al igual que 5 y 6 individuos de las poblaciones CI1020 y CI1012 respectivamente. En el tercer cuadrante se agruparon 6 de los 7 individuos de N5313, mientras que para las poblaciones CI1029, N5226, N5229 y N5248 lo hicieron 5 de sus individuos. En el cuarto cuadrante se congregaron 6 de los 7 individuos de CI1014 y CI1016 y 5 de N5225. En cuanto a la población testigo (CIA1658), si bien sus individuos se dispusieron entre los cuadrantes III y IV, se asociaron formando un grupo aislado del resto de las poblaciones. La población CI996 se caracterizó porque sus individuos se dispusieron alrededor de la región central de ambas coordenadas principales. Las poblaciones que presentaron una mayor dispersión de sus individuos fueron CI1028, CI1029 y N5319.

Considerando la distribución de los siete individuos de cada población se efectuó una representación simulando cual sería la ubicación media de la población (Figura 20). Se formaron 6 grupos. El primero, G1m, correspondió a las poblaciones que se ubicaron en el primer cuadrante, que fueron N5231, N5222, N5319, CI1028 y N5320. En el segundo cuadrante se ubicaron los grupos Gm2, incluyendo a CI1022 y CI1063 y el grupo G3m con las poblaciones CI1031, CI1020, CI1033 y CI996. La población CI1012 fue intermedia a estos dos grupos. En el tercer cuadrante se ubicó el grupo G4m, incluyendo a N5248, CI1029, N5229, N5313 y N5226. Por último los grupos G5m y G6m se ubicaron en el cuarto cuadrante e incluyeron a las poblaciones N5225 y CI1016 el primero y a CI1014 y al testigo el segundo.

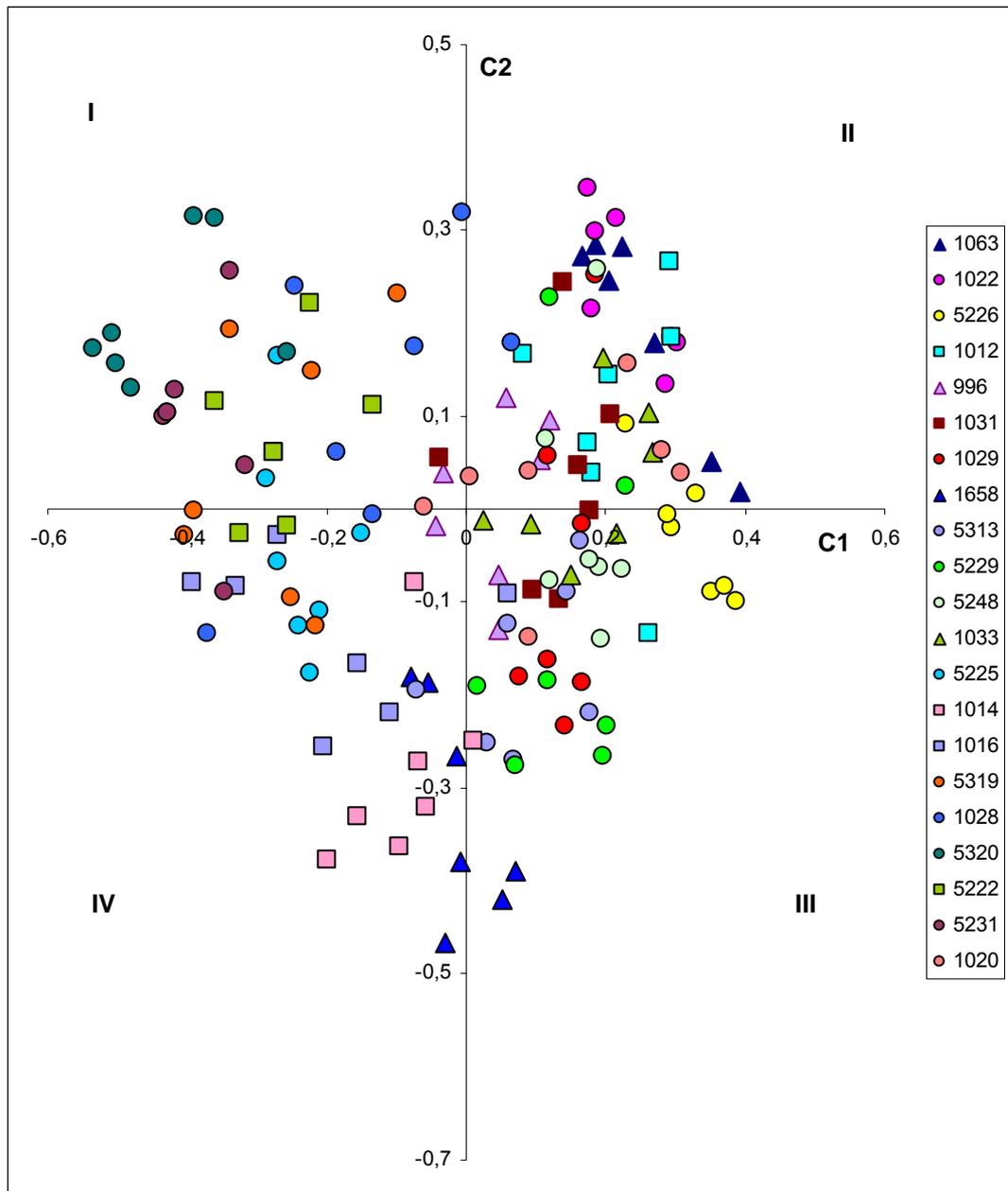


Figura 19: Análisis de coordenadas principales. Representación de la dispersión de los 147 individuos, a partir del coeficiente de similitud de emparejamiento simple calculada utilizando los datos moleculares de los 3 cebadores ISSR utilizados. En números romanos se indican los cuadrantes.

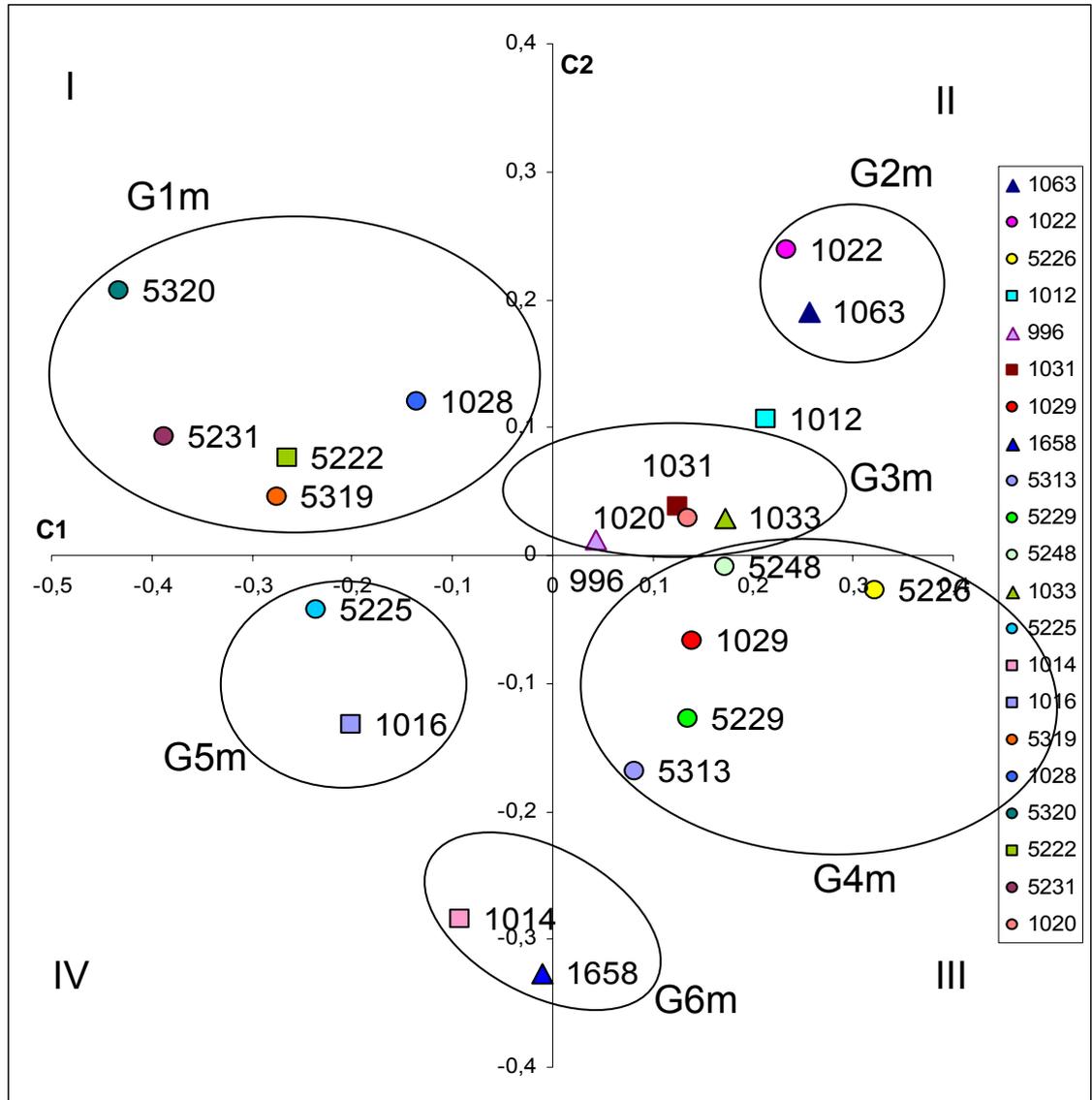


Figura 20: Representación de la ubicación media de las poblaciones sobre las dos primeras coordenadas y agrupamiento a partir de la similitud obtenida utilizando los 3 cebadores ISSR. En números romanos se indican los cuadrantes.

## **2.3.4 Relación entre los agrupamientos basados en diferentes tipos de caracteres**

### **2.3.4.1 Caracteres morfológicos cualitativos y caracteres moleculares**

Al comparar los ordenamientos obtenidos a partir de los datos cualitativos y los datos moleculares se observó que las poblaciones del grupo G1m formaban parte de los grupos G1, G3 y G4 cualitativos. Las poblaciones del grupo G2m correspondieron a poblaciones de los grupos G2 y G4 cualitativos. El grupo G3m se correspondió con entradas incluidas en los grupos G1, G3 y G4 cualitativos. Las poblaciones del grupo G4m fueron las únicas que presentaron correspondencia al estar incluidas dentro del grupo cualitativo G3. El grupo G5m incluyó a dos poblaciones que pertenecieron a los grupos G1 y G2 a partir de sus caracteres cualitativos y por último, el grupo G6m incluyó a la población testigo y a CI1014 que fue la más aislada por diferenciarse cualitativamente en gran medida de las demás poblaciones de *B. brevis* y del testigo.

### **2.3.4.2 Caracteres morfológicos cuantitativos y caracteres moleculares**

Los agrupamientos obtenidos a partir de los análisis de ordenamiento con los datos cuantitativos y moleculares no presentaron una asociación directa. Las poblaciones del grupo G1m correspondieron a las incluidas en los grupos Go1, Go2 y Go4 cuantitativos. Las poblaciones del grupo G2m correspondieron a los grupos Go4 y Go5. El grupo G3m se correspondió con todos los grupos cuantitativos exceptuando el Go1. Las poblaciones del grupo G4m se ubicaron dentro de los grupos Go2, Go3 y Go4. El grupo G5m incluyó a dos poblaciones que pertenecieron a los grupos Go1 y Go3 y por último, el grupo G6 incluyó a la población testigo y a CI1014. Esta última se incluyó dentro del grupo Go2 mientras que el testigo permaneció sin agruparse en el

ordenamiento cuantitativo, ya que se diferenci6 del resto de las poblaciones.de *B. brevis*.

### 3. Sitios de colecta

#### 3.1. Características de los sitios de colecta

Las entradas procedían de las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Neuquén y Río Negro (Tabla 1) y sus sitios de colecta correspondían de distintas eco-regiones (Figura 21). Tres entradas procedían de la eco-región Pampa, otras cinco del Espinal y las restantes eran originarias de la eco-región Monte de llanuras y mesetas (Bertonati y Corcuera, 2000).

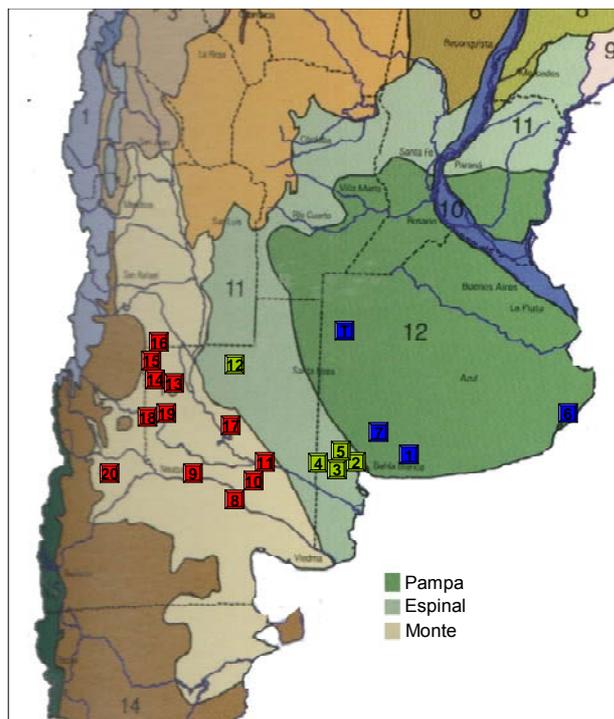


Figura 21: Eco-regiones a las que pertenecían los sitios de colecta de las entradas de *Bromus brevis* y *B. catharticus*. Mapa extraído de Bertonati y Corcuera, 2000.

De acuerdo a los datos de pasaporte del sitio de procedencia de las entradas, éstas fueron ubicadas en un distrito agroclimático (De Fina, 1992), constatándose que

perteneían a 12 diferentes distritos (Tabla I), ocho de los cuales sólo contaban con una población y otros con hasta cuatro de ellas, como el distrito 99 y el 75 A.

El análisis de ordenación (ACP) realizado en base a las características agroclimáticas y a la altura de los sitios de origen permitió reunirlos en grupos más afines (Figura 22).

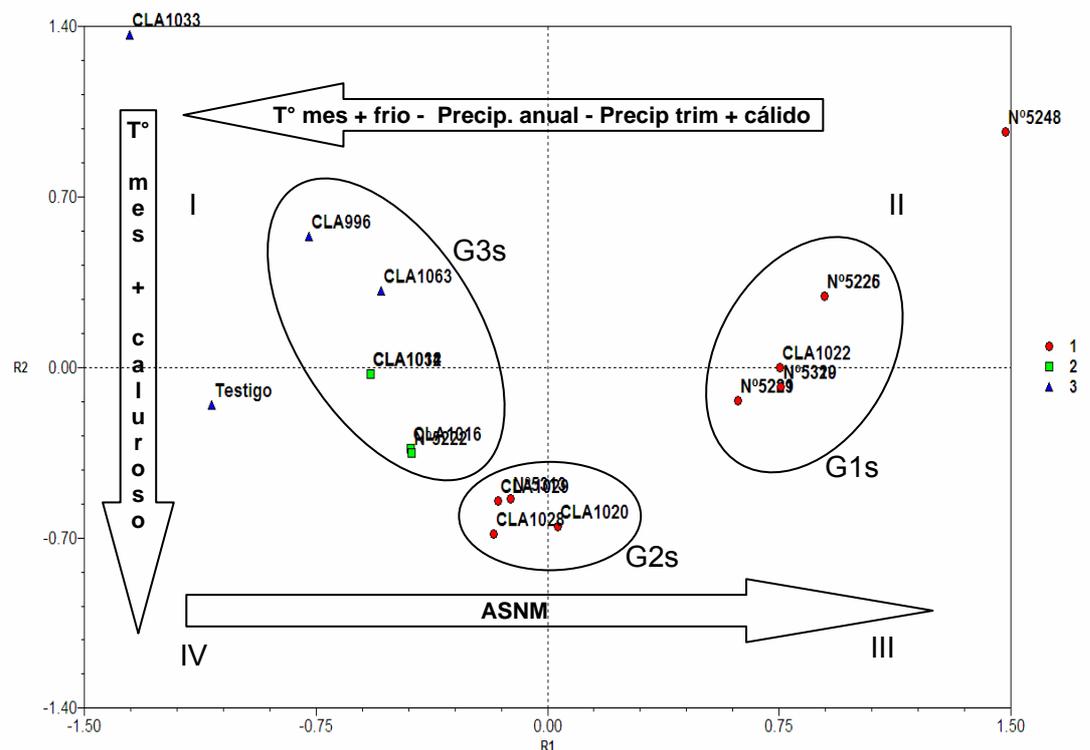


Figura 22: Agrupamiento de los sitios de origen obtenido a partir del análisis de Componentes Principales. Referencias: R1 y R2= componentes 1y 2; las flechas corresponden a las característica que explican cada componentes. Sitios rojos = 1: Monte; sitios verdes = 2: Espinal; sitios azules = 3: Pampa. En números romanos se indican los cuadrantes.

Las dos primeras componentes principales explicaron un 84% de la variación entre sitios, tres de los cuales permanecieron aislados (CI1033, N5248 y CIA1658= testigo) y el resto se reunió en tres grupos. Las variables de mayor incidencia en la componente R1 fueron la temperatura del mes más frío, la precipitación anual y la de los meses de diciembre, enero y febrero, así como la altura s.n.m., la que se correlacionó

inversamente con las anteriores (Figura 22). La temperatura del mes más caluroso fue la que determinó en mayor medida la separación de los sitios sobre el segundo componente.

El grupo 1 (G1s) reunió 7 sitios de la eco-región del Monte que a su vez pertenecían a la provincia de La Pampa, con excepción del sitio de la entrada CI1022 que era de Río Negro; tres pares de sitios de ese grupo coincidieron exactamente en su ubicación en el plano generado por las dos componentes principales. Los sitios del G1s se caracterizan por presentar temperaturas más extremas en el mes más frío e intermedias en el más caluroso. Además reciben baja precipitación anual y en el trimestre más cálido y se hallan a elevada altura .s.n.m. Cuatro sitios, la mitad de La Pampa y la otra mitad de Río Negro integraron el G2s; todos esos sitios correspondieron a la eco-región de Monte y se caracterizaron por presentar precipitaciones, temperaturas de mes más frío y altura intermedias, pero las más altas temperaturas durante el verano.

En el G3s se reunieron 7 sitios, de los cuales 2 correspondían a la eco-región Pampa y 5 al Espinal; entre estos últimos, 3 sitios quedaron ubicados en el mismo punto del plano determinado por R1 y R2. Las características de los sitios de G3s son: temperaturas más benignas en invierno, intermedias en verano, altas precipitaciones y menor altura s.n.m que el promedio. Los sitios reunidos en G3s eran de Buenos Aires, excepto el N5222. La colección CI1033 de Bs. As y la de Neuquén permanecieron aisladas en los extremos de los cuadrantes I y II, respectivamente, diferenciándose entre sí por el componente R1 y no por el R2, mientras que el sitio de origen del testigo quedó aislado en el cuarto cuadrante, aunque bastante próximo al G3s de quien se diferencia principalmente por el R1, al presentar mayores precipitaciones y temperaturas más altas en invierno, así como por estar en una posición topográficamente más baja.

### **3.2. Sitios de colecta y características de las poblaciones**

#### **3.2.1. Relación entre sitios y caracteres cualitativos**

La correlación entre los sitios de colecta y las características cualitativas de las poblaciones fue baja y negativa ( $r = -0,14$ ;  $p = 0,06$ ), y además no fue significativa a un nivel de  $\alpha$  del 0,05. Al comparar el ordenamiento de los sitios (Figura 22) y el de las poblaciones (Figura 6), se observó una correspondencia parcial. Los sitios de cuatro poblaciones del grupo G1 (N5225, N5319, N5320 y N5231), pertenecían al G1s; los sitios de tres poblaciones del G2 (CI1022, CI1016, y CIA1658 = testigo), correspondían a sitios de los grupos G1s y G3s ubicados en los cuadrantes I y II respectivamente y al del testigo, ubicado próximo al grupo G3s. Por último, los sitios de las poblaciones CI996, CI1063, CI1031, CI1033 y N5222 reunidas en G4, se reunieron en el grupo G3s más el sitio aislado más próximo. No se observó ninguna asociación clara entre la existencia de pubescencia, color de vainas ni porte asociado a determinados agrupaciones de los sitios, ni pertenencia a las eco-regiones de donde procedían.

#### **3.2.1. Relación entre sitios y caracteres cuantitativos**

La correlación entre los sitios de colecta y las características cuantitativas de las poblaciones fue baja y no significativa ( $r = 0,34$ ;  $p = 0,9$ ). Al comparar el ordenamiento de los sitios (Figura 22) y el de las poblaciones (Figura 17), se observó una correspondencia parcial. Los sitios de las poblaciones del grupo Go1 (N5225 y N5320) pertenecían al G1s; los sitios de las cuatro poblaciones del Go3 (CI1012, CI1016, N5226 y N5229) correspondían a sitios de los grupos G3s y G1s. Los dos sitios del Go5 correspondían al G3s. Los grupos Go2 y Go4 fueron los más dispares ya que incluyeron sitios que pertenecían a los grupos G1s, G2s y G3s. El grupo Go2 incluyó

además a las poblaciones CI1033 y N5248 que tuvieron las distribuciones extremas a partir del análisis de ordenamiento de los sitios.

Los sitios de las poblaciones que presentaron un mejor comportamiento agronómico se correspondieron con el grupo G3s que a su vez agrupó a aquellos clasificados dentro de las eco-regiones del Espinal y Pampa.

### **3.2.1. Relación entre sitios y caracteres moleculares**

Al comparar los agrupamientos del análisis de ordenación de los sitios y el análisis de ordenamiento de los datos moleculares se observó que el G1m incluía a poblaciones provenientes en su mayoría de la ecoregión Monte y una sola del Espinal. El grupo G2m incluyó a una población del Monte y a una del Espinal. El grupo G3m se conformó con 2 poblaciones de la eco-región Pampa, 1 del Monte y 1 del Espinal. El grupo G4m fue el único que presentó una asociación entre la variación molecular y el origen de las poblaciones ya que todas las que se incluyeron en este grupo provenían de la eco-región Monte. Los grupos G5m y G6m incluyeron poblaciones del Monte y Espinal en el primer caso y del Espinal y Pampa en el último.

## DISCUSIÓN

### 1.1. Caracteres Cualitativos

#### 1.1.1. Pubescencia de las estructuras vegetativas y reproductivas

Algunas poblaciones de *B. brevis* y el testigo exhibieron pelos cortos o largos en sus glumas y/o en la lemma, y muy pocas resultaron completamente glabras. La pubescencia observada para la lemma del testigo no concuerda con lo reportado por Gutiérrez y Pensiero (1998) para *B. catharticus*, ya que según dichos autores esta especie se caracterizaría por presentar tanto la lemma como las glumas glabras.

Con respecto a *B. brevis* estos autores mencionan que ambas estructuras pueden ser glabras o escabrosas, pero no mencionan la posibilidad de que presenten algún tipo de pubescencia o de estructura epidérmica que determine la aspereza o escabrosidad de las estructuras. Es más, la pubescencia no es considerada como posible para *B. brevis*, ya que en la clave de identificación por ellos propuesta en la sinopsis del género, esa especie es considerada entre las que presentan glumas y lemma glabras. Las poblaciones que presentaron pelos densos y de al menos 0,3 a 0,5 mm de longitud presentaban además, lemma carinada con aristas menores de 1 mm y prefoliación conduplicada, por lo que podría afirmarse que corresponden a *B. brevis*. Lo observado en este trabajo en relación a la pubescencia de las glumas y de la glumela inferior merecería un análisis más detallado relacionado con la estimación de la densidad y tipo de pubescencia y su incorporación entre los descriptores para *B. brevis*.

Las poblaciones de cebadilla pampeana presentaron variabilidad para pubescencia de las láminas pues las hubo pubescentes y glabras, y si bien estas últimas fueron la minoría, esta característica está contemplada en la descripción presentada por Gutiérrez y Pensiero (1998), al referirse a que esta especie puede presentar tanto

láminas glabras como pubescentes. Esos autores mencionan que las hojas en *B. catharticus* son normalmente pubescentes y si bien no descartan la posibilidad de que la especie exhiba láminas glabras, esta característica, presentada por la población testigo parecería ser infrecuente.

### **1.1.2. Hábito de crecimiento**

En las entradas empleadas en este trabajo el porte de las plantas de *Bromus brevis* no fue uniforme sino que varió desde postrado a erguido, aunque la mayoría fue de porte semipostrado a erguido. En un estudio realizado sobre 16 poblaciones de cebadilla pampeana procedentes en su mayoría de Santa Rosa (La Pampa), Ruiz *et al.* (1995) también encontraron poblaciones de los tres tipos de hábito de crecimiento, siendo la mayoría de ellas de porte semierecto. Los resultados de este trabajo también coinciden con la caracterización preliminar realizada en las mismas entradas, pero sobre plántulas obtenidas de semilla original (Alonso, inédito), en cuanto a que la mayoría de las poblaciones presentaron porte semipostrado. Sin embargo de las cinco entradas que se consideraron como predominantemente erguidas en el presente trabajo (CI1020, CI1022, CI1014, N5319 y N5225), una presentó mezcla de tipos pero fue considerada preferentemente semipostrada, y de las tres preliminarmente consideradas de porte postrado (CI1033, N2522 y N5228), sólo la primera de ellas también presentó ese porte en el estadio juvenil.

Las diferencias con la caracterización efectuada sobre las mismas entradas podría deberse a un conjunto de causas determinantes de variación ambiental, como por ejemplo que se realizaron sobre individuos obtenidos de diferente lote de semilla (semilla original vs. primera multiplicación), en distinto estado fenológico (plántulas vs. juveniles), en distintos sitios de experimentación (invernáculo vs. campo), y a diferente nivel de registro (población vs. planta individual). Además, fueron establecidos por

diferentes personas y, dada la naturaleza altamente subjetiva de este carácter, es posible que tuvieran ligeras diferencias de apreciación. El hábito de crecimiento suele considerarse un carácter adecuado para integrar el conjunto de descriptores correspondientes a la caracterización de germoplasma forrajero (Breese y Tyler, 1986), debido a su fácil apreciación y generalmente alta heredabilidad. Sin embargo, en plantas con abundantes macollos no resulta sencillo determinar el ángulo que la mayoría forma con la perpendicular al sustrato y, por otra parte, no siempre es un carácter de alta heredabilidad, como lo demostró Alonso (1992) en poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* Lam..

A pesar de las diferencias señaladas entre ambas estimaciones de porte, se rescata que en ambos trabajos es coincidente la clasificación para cuatro de las poblaciones de porte erectófilo, así como de que la mayoría de las poblaciones son predominantemente semipostradas. En general las gramíneas silvestres que crecen en ambientes naturales sometidos a pastoreo o a cortes frecuentes suelen presentar hábito postrado mientras que en sitios bajo cortes infrecuentes o en plantas producto de la selección artificial, el porte tiende a ser erguido (Breese y Tyler, 1986; Alonso, 1992.) Lo observado por esos autores también podría aplicarse al germoplasma de *B. brevis*, ya que todos ellos proceden de ambientes naturales y, entre los individuos postrados y los semipostrados, totalizaron el 67% de las plantas observadas.

### **1.1.3. Color de las vainas**

La coloración púrpura de las vainas se presentó como una característica predominante en la mayoría de las poblaciones, sin embargo no en todos los individuos ya que siete entradas fueron heterogéneas para éste carácter y dos fueron homogéneas para vainas de color verde. No se encontraron menciones sobre la existencia de diferentes colores o tonalidades en las vainas de *B. brevis*, característica

que podría ser un buen descriptor para describir entradas de esta especie.

#### **1.1.4. Carbón de la Panoja**

Varias especies de *Bromus* son susceptibles en mayor o menor grado al carbón de la panoja, enfermedad fúngica causada por *Ustilago bullata*. Bajo infección artificial con ustilosporas de este patógeno, Covas *et al.* (1995) observaron que todas las líneas de *B. catharticus* fueron susceptibles, mientras que varias líneas de *B. brevis* resultaron no atacadas. En ese trabajo el ataque fue menor en las líneas procedentes de Junín, provincia de Buenos Aires, que en las que procedían de diferentes localidades de La Pampa. En este trabajo sólo dos poblaciones fueron afectadas, una de la provincia de La Pampa y otra de Río Negro. Si bien los materiales genéticos de *B. brevis* pueden presentar resistencia al carbón de la panoja (Covas *et al.*, 1995), no puede afirmarse que las restantes poblaciones hayan sido resistentes al patógeno, ya que las semillas afectadas podrían haber estado previamente infectadas y las restantes no. En base a este carácter solo quedó demostrado que las poblaciones CI1020 y N5229 son susceptibles al carbón de la panoja.

#### **1.1.5. Relación entre entradas en base a las características cualitativas**

El dendrograma obtenido a partir del coeficiente de similitud de Jaccard permitió separar a las poblaciones de *B. brevis* del testigo de *B. catharticus*, a diferencia de lo obtenido utilizando el coeficiente de emparejamiento simple. El coeficiente de Jaccard pertenece al grupo de coeficientes que no consideran que la ausencia simultánea de un mismo carácter en dos individuos contribuya a su similaridad, a diferencia del coeficiente de emparejamiento simple (SM) que sí lo hace. (Bramardi, 2000). Ello

determina que el coeficiente SM resulte más eficaz en el tratamiento de las relaciones entre individuos muy emparentados en los que la coincidencia en la ausencia de un atributo puede considerarse un indicio de su semejanza. En cambio, el coeficiente de Jaccard suele proporcionar agrupaciones más adecuadas para el tratamiento de individuos de diferente especie, ya que la similitud entre ellos se establece sólo en función de la coincidencia en la presencia del carácter. Por ello es que al emplear el coeficiente de Jaccard en el dendrograma obtenido, la entrada de *B. catharticus* es separada de las poblaciones de *B. brevis* al menor nivel de similitud (43%), en general por tener prefoliación convolutada, tener láminas glabras, no tener porte postrado ni vainas verdes en los juveniles. En cambio, utilizando SM, el testigo fue incluido en el grupo ( $B_{SM}$ ) con trece poblaciones de *B. brevis* principalmente porque entre ellas hay coincidencia en el tipo de porte (erguido y semipostrado), pero también coinciden en la ausencia de pubescencia en ambas glumas. Al considerar la ubicación del testigo en el análisis de ordenación, éste no se separa claramente de las entradas de *B. brevis*, ni a través de la coordenada principal (C1) ni de la siguiente en importancia (C2).

De todos los caracteres utilizados, en el tipo de prefoliación fue en el único en el que las poblaciones de ambas especies difirieron completamente. La importancia de la prefoliación como carácter diagnóstico para separar las dos especies fue mencionado por varios autores (Covas 1981; Cámara Hernández, 1970; Naranjo, 1985) quienes incluyeron este carácter en la clave elaborada para diferenciar *B. catharticus* de otras especies de la Sección *Ceratochloa*, entre ellas, de la cebadilla pampeana. El tipo de prefoliación también es considerado en las descripciones de las especies en la sinopsis presentada por Gutiérrez y Pensiero (1998) para *Bromus*, pero no la utilizan como un carácter diagnóstico principal dentro de la Sección *Ceratochloa*, sino a posteriori de otros caracteres cualitativos como pubescencia de las glumas, para los cuales las poblaciones de *B. brevis* pueden variar. La prefoliación es un carácter de

fácil lectura y no se halla sujeto a variación debida al ambiente, por lo que debiera continuar considerándose uno de los caracteres discriminantes de alta incidencia en la separación de especies de la Sección a la que pertenecen la cebadilla criolla y la pampeana.

Entre las poblaciones de *B. brevis*, la agrupación efectuada por ambos coeficientes presentó ligeras modificaciones en la ubicación de algunas poblaciones en los dendrogramas, pero en general los grupos formados resultaron totalmente coincidentes (Grupo I) o casi completamente como los Grupos  $IV_{SM} - III_J$  y  $V_{SM} - V_J$ , que difirieron en solo una población. Lo mismo ocurrió al compararlos con los grupos determinados por el análisis de coordenadas principales. La mayor similitud se estableció sólo en dos pares de poblaciones cuyos integrantes no pudieron ser diferenciados a nivel cualitativo, independientemente del coeficiente de similitud utilizado en los dendrogramas. No obstante, sólo se mantuvo uno de ellos en el análisis de ordenación. La razón de que el otro par quedase distanciado se debió a que una de las poblaciones presentaba un dato perdido para porte de las plantas y ese hecho es considerado de diferente forma por los programas para estimar agrupación y ordenamiento. Por lo tanto, la identidad total plasmada en el dendrograma para CI1031 y CI1033 no es real ya que no fue posible determinar si ambas coinciden en el tipo de porte, a la vez que alerta sobre el efecto que los datos perdidos pueden causar al pretender estimar la afinidad entre las unidades operativas (Bramardi, 2000).

## **1.2. Caracteres Cuantitativos**

### **1.2.1. Caracteres Morfológicos de Espiguillas y Cariopses**

Cámara Hernández (1978) establece que en *Bromus brevis* la longitud de las glumas es de 8-9mm mientras que le asigna una variación de 8 a 12mm a la longitud

de dichas piezas a *B. catharticus* (*B. uniolooides* Humb., Bonp. et Kunth). En la sinopsis posterior de las especies argentinas de *Bromus*, realizada por Gutiérrez y Pensiero (1998), se menciona que las dos especies presentan glumas desiguales en tamaño; para *Bromus brevis* especifican valores entre 5,5 y 10,5mm de longitud para la gluma inferior y de 6,5 a 11,5mm, para la superior. Todas las poblaciones de cebadilla pampeana analizadas en el presente trabajo presentaron para ambas glumas, valores comprendidos dentro del rango establecido para esa especie y citados por los autores anteriormente mencionados. En el caso de *Bromus catharticus*, Gutiérrez y Pensiero le atribuyen una longitud de las glumas comprendida entre 7 y 11mm para la inferior y 9,5 a 13mm para la superior, valores entre los que se halló comprendido el registro obtenido para el testigo. Al considerar los rangos de longitud de las glumas de ambas especies de *Bromus*, se observa que presentan solapamiento por lo que esta característica no permite separar ambas especies, hecho que también se constata en las claves de determinación que las incluyen (Cámara Hernández, 1970 y 1978; Gutiérrez y Pensiero, 1998).

La longitud de la lemma del antecio basal para *Bromus brevis* varió entre 8,52 y 12,04mm de longitud, rango que contempla el valor medio reportado por Naranjo (1985) al analizar ocho materiales de *B. brevis* en el marco de un estudio sistemático que involucró a cuatro especies de ese género. Sin embargo, los resultados del presente trabajo no resultan completamente concordantes con lo expresado por Gutiérrez y Pensiero (1998), para quienes en *B. brevis* se esperarían longitudes de lemma entre 9 y 12 mm, ya que tres poblaciones presentaron un promedio por debajo del límite inferior por ellos mencionado. En vista de los resultados presentes, el rango para la longitud de la lemma en *B. brevis* debería ser ampliado y considerar como límite inferior, valores de 8,5mm si se consideran promedios, y menores aún si se considera la variación a nivel de semilla individual (datos no mostrados). Por el contrario, la longitud promedio de la lemma del testigo (16,14mm) se correspondió con

la descripción de *B. catharticus* presentada por Gutiérrez y Pensiero (1998). Debido a que la longitud de la lemma presentada por esta entrada superó el rango establecido por esos mismos autores para *B. brevis*, esta característica por sí sola permite confirmar la no pertenencia de CIA1658 a cebadilla pampeana.

Tanto las entradas de *B. brevis* como el testigo presentaron valores de longitud de pedicelo coincidentes con lo observado por Gutiérrez y Pensiero (1998) quienes mencionan un rango de 2 a 30mm para *B. brevis* y 3 a 30mm para *B. catharticus*. Según esos autores, la variación que puede tener este carácter es muy amplia y ello podría deberse a que dentro de la panoja, el tamaño de los pedicelos varía en función de la posición de las espiguillas, siendo menor en aquellas ubicadas en el ápice de las ramificaciones (Pujol Palol, 1998). En este trabajo, la muestra poblacional de espiguillas y pedicelos no se extrajo de una posición específica, sino al azar y es probable que ello haya sido la causa del alto coeficiente de variación registrado para esta variable (Tabla V). En futuros trabajos se debería especificar la posición de la espiguilla que debe ser medida, a los fines de reducir el error experimental y tener mayor precisión en el establecimiento de las diferencias poblacionales (van de Wouw *et al.*, 1999).

Naranjo (1985) reporta un promedio de 4,24mm para el ancho de la lemma del antecio basal de *B. brevis*, valor que resulta mayor que el registrado como límite superior del rango de variabilidad hallado en este trabajo sobre antecios seleccionados al azar (2,44mm). La amplia diferencia entre ambos trabajos podría deberse a que ese autor realizó las mediciones sobre el antecio basal, el que normalmente es el de mayor tamaño en la espiguilla (Pujol Palol, 1998).

La longitud de arista en las especies de *Bromus* varía desde muy reducida a casi tan larga como la lemma (Gutiérrez y Pensiero, 1998) mientras que la variación dentro de especie es menos acentuada. A pesar de ello, Covas y colaboradores (1993) registraron variación altamente significativa en esta característica, entre materiales de

cebadilla intermedia, mientras que Aulicino y Arturi (2002) las detectaron en cebadilla criolla. Sin embargo, al estudiar 19 entradas de cebadilla pampeana, Ruiz *et al.* (1995) no detectaron diferencias significativas en la longitud de la arista, y reportaron un rango de variación de 0,75 a 1,83mm. En el presente trabajo el rango de variación de las aristas fue mucho menor (0,16 a 0,56mm) y las diferencias sí resultaron significativas. Los valores observados en este trabajo coinciden con los presentados por Naranjo (1985) y Gutiérrez y Pensiero (1998), ya que mencionaron que en *B. brevis* la arista es menor de 1mm de longitud. Otros autores consideran que el límite superior del rango de variabilidad mencionado para *B. brevis* se extendería hasta los 2mm (Cámara Hernández, 1978; Ruiz *et al.*, 1995); sin embargo, de acuerdo a la sinopsis de género (Gutiérrez y Pensiero, 1998), los ejemplares con ese tamaño de arista no serían considerados como de cebadilla pampeana.

En relación a la arista en *B. catharticus*, de acuerdo con la descripción especificada en la sinopsis presentada por Gutiérrez y Pensiero (1998), la longitud puede variar entre 0,5 a 3 (4)mm, lo que incluye al registro registrado para CIA1658 (0,68mm). Sin embargo, en la clave para la determinación de las especies de *Bromus* de Cabrera y Zardini, (1978) e incluso en la de Gutiérrez y Pensiero, *B. catharticus* es incluida dentro del grupo de especies con arista mayor de 1mm. Si esto último es tenido en cuenta, la entrada empleada como testigo y todas aquellas que presenten aristas menores a 1mm no corresponderían a *B. catharticus*. En base a otras características diagnósticas, como la prefoliación (Cámara Hernández 1970 y 1978) y el tamaño de la lemma, el testigo empleado en este trabajo pertenece sin duda a *B. catharticus*. De ello surge que deberían revisarse o ajustarse las aseveraciones empleadas en las claves de determinación de especies de *Bromus* que separan a *B. brevis* de *B. catharticus* en base a la longitud de la arista, y definir con mayor precisión los límites del rango de variación de las aristas en ambas especies.

### 1.2.2-Emergencia de plántulas

La habilidad para emerger y establecer velozmente un apropiado número de plantas contribuye a asegurar la implantación y el rápido aprovechamiento del cultivo. Lo anterior tiene mayor validez en ambientes sujetos a estrés ambiental en los que las condiciones que favorecen la germinación de las semillas y la supervivencia de las plántulas no suelen mantenerse en el tiempo (Borrajo y Alonso, 2004). Las poblaciones con alta emergencia inicial formarán un tapiz vegetal más rápidamente que las de emergencia lenta y eso permitiría un aprovechamiento del recurso con mayor anticipación que en los lotes con plantas menos desarrolladas y/o con fallas en la implantación. Varias poblaciones de cebadilla pampeana presentaron germinación inicial superior al 50% y también varias de ellas alcanzaron registros de emergencia final superiores al 70%. Al considerar conjuntamente ambas variables, sólo la población CI996 presentó una emergencia inicial superior al 50% y un 70% al mes y medio de la siembra (Tabla VI). Sin embargo no se encontró entre las que presentaron índices de emergencia inferiores a los 13 días, aunque el suyo fue de 13,2 días y las diferencias no fueron significativas al 5%. El índice de emergencia establece la velocidad en base al total de plántulas aparecidas y aquellas que aparecen tardíamente tienen gran efecto sobre el mismo (Alonso y Peretti, 1995; Guma y Alonso, 1997) Esto fue lo que ocurrió con la entrada CI996, la que presentó el mayor porcentaje de plántulas emergidas de la experiencia (90%) y varias de ellas aparecieron tardíamente en comparación con otras poblaciones de menor porcentaje de emergencia con las que obtuvo un índice similar.

Las poblaciones de cebadilla pampeana fueron más veloces para emerger, en términos absolutos, que la entrada testigo perteneciente a cebadilla criolla apreciable tanto mediante la emergencia inicial como por el índice. Sin embargo esta última población superó al 95% de las poblaciones de *B. brevis* en el porcentaje de

emergencia a los 47 días de la siembra. A diferencia de estos resultados, Ruiz *et al.* (1997) analizaron diferentes líneas de *B. catharticus* y *B. brevis* en condiciones de laboratorio y detectaron que las de esta última presentaban igual o menor energía germinativa que las líneas de *B. catharticus*. La energía germinativa o porcentaje de germinación al primer recuento es una medida del vigor de las semillas y un referente de la capacidad del lote para germinar y emerger en el campo (Carámbula, 1981). De acuerdo a los resultados de Ruiz *et al.* (1997) *B. catharticus* podría emerger con igual o mayor rapidez que *B. brevis*, pero no fue lo observado en el presente trabajo. De todos modos no es posible generalizar pues en ambos trabajos el número de materiales genéticos de cebadilla criolla empleados fue muy bajo, una población en este trabajo y dos líneas en el otro.

En los suelos de la región semiárida así como en los más arenosos de la región subhúmeda, donde la disponibilidad de agua para promocionar la germinación de las semillas es escasa, la rapidez en el establecimiento y el desarrollo inicial de las plántulas resultan críticos. Ante la variabilidad observada en las poblaciones de *B. brevis* mantenidas en los bancos de germoplasma, en los caracteres asociados con la emergencia y el crecimiento de las plántulas, algunas de estas poblaciones podrían ser consideradas como material promisorio para la obtención de variedades de cebadilla pampeana.

### **1.2.3-Tamaño de las Láminas**

#### **1.2.3.1. Longitud y Ancho foliar durante el estadio de Plántula**

La producción de materia seca en gramíneas está asociada positivamente con el índice de área foliar, en cuya conformación interviene, entre otros componentes, el tamaño de las hojas (Chapman y Lemaire, 1993). En plantas gramíneas, el mayor determinante del área de una lámina es la longitud de la lámina (Lemaire y Chapman

1996), sin embargo, el ancho de la misma también tiene importancia en la definición del área (Nelson *et al.* 1977). De ésta forma, para cada especie en particular el área foliar de la lámina puede estimarse a través de modelos lineales que incluyen sólo la longitud foliar o una combinación de ésta y el ancho foliar foliar (Nelson *et al.* 1977; Alonso y Monterubbianesi, 2006a). En especies para las cuales aún no se han establecido modelos de estimación del área foliar o no se hallan completamente validados, como en el caso de *Bromus brevis* (Alonso y Monterubbianesi, 2006b), ésta puede estimarse en forma sencilla como  $\text{ÁREA} = \frac{1}{2} (\text{Longitud} \times \text{Ancho de la lámina})$ . En este trabajo, al aplicar la anterior forma de estimación, se observó que el área foliar promedio entre poblaciones de cebadilla pampeana era de 1,7 cm<sup>2</sup>, valor alcanzado o superado al menos por nueve poblaciones (Tabla VII). Las plantas con mayor área foliar durante el estadio de plántula pueden cubrir el suelo en forma más rápida y de esta forma alcanzar altos valores de área foliar en forma anticipada (Alonso, 2004).

### **1.2.3.2. Longitud foliar durante los estadios Juvenil y Adulto**

La longitud de las hojas incrementó desde el estadio de plántula hasta la 3<sup>a</sup> fecha, momento próximo a la encañazón, pero la longitud de la hoja bandera fue menor a la de esa última fecha del estado vegetativo. Este comportamiento coincide con el modelo general observado en otras gramíneas forrajeras de zonas templadas y desarrollo invierno-primaveral (Gillet, 1984; Borrajo, 1998). La longitud de la hoja bandera es frecuentemente registrada en los trabajos relacionados con la producción de grano en cereales, dada la relación positiva que existe entre ambas variables (Pujol Palol, 1998). Con el mismo propósito la longitud de la hoja bandera ha sido analizada en forrajeras gramíneas en general y en las especies de *Bromus* en particular con resultados variables. Covas *et al.* (1993) detectaron diferencias significativas en la longitud de la hoja bandera entre materiales genéticos de cebadilla intermedia,

mientras que Aulicino y Arturi (2002) no observaron diferencias significativas entre 32 poblaciones argentinas de cebadilla criolla. En el presente trabajo, las diferencias en la longitud de la hoja bandera de las poblaciones de *B. brevis* fueron significativas, al igual que lo encontrado por Ruiz *et al.* (1995) entre 19 poblaciones de la misma especie. Estos últimos autores reportaron un rango de variación de 12,83 a 19,20 cm de longitud, el que resultó menor al registrado en este trabajo ya que se encontraron poblaciones con hojas banderas de menor y mayor longitud que las mencionadas por ellos.

Considerando la descripción de *B. brevis* presentada por Gutiérrez y Pensiero (1998), las láminas podrían medir entre 3 y 15 cm de longitud, pero en este trabajo varias poblaciones obtuvieron registros medios superiores a ese valor, tanto en la segunda como en la tercera fecha del estadio vegetativo, llegando algunos promedios poblacionales a los 21 cm de lámina a fin del estadio juvenil (Fecha 3; Tabla VIII). En las descripciones, los registros de tamaño de los órganos se efectúan generalmente sobre varias hojas de los materiales de herbario. Éstos son referentes del desarrollo de la especie en el sitio en que fueron colectados y, para *B. brevis*, tales sitios generalmente corresponden a ambientes naturales de zonas áridas a semiáridas y en menor proporción a zonas húmedas (Cámara Hernández, 1970 y 1978; Naranjo, 1985; Gutiérrez y Pensiero (1998). Los mayores registros observados en este trabajo podrían deberse a que se efectuaron sobre plantas vivas con buen desarrollo ya que estaban creciendo sobre un suelo fértil y con adecuada provisión hídrica, y además, siempre se hicieron sobre la última hoja desplegada que generalmente es la más larga de la planta. Dadas las diferencias entre la longitud foliar detectada entre fechas en este trabajo, en futuros trabajos de caracterización y evaluación de *B. brevis*, sería conveniente especificar para éste descriptor, en que hoja(s) deberían efectuarse los registros, así como en que etapa(s), a fin de que los resultados puedan ser

comparados entre entradas registradas por diferentes autores.

En relación al testigo perteneciente a *B. catharticus*, las hojas alcanzaron registros entre 10 y 23cm entre fechas. Estos resultados coinciden con los observados para largo de lámina de esta especie, por Ruiz et al. (1995). Sin embargo, al analizar 22 poblaciones de esta especie, Rosso (2001) obtuvo registros de hasta 29 cm para largo de las hojas vegetativas. Gutiérrez y Pensiero (1998) también mencionan que la variación en longitud esperable en *B. catharticus* es entre 5 a 30-(35) cm, valores dentro de los cuales se ubicaron los registros del testigo de esa especie, a través de todas las fechas consideradas. De acuerdo con las descripciones presentadas por diferentes autores (Cámara Hernández, 1970; Gutiérrez y Pensiero (1998) el tamaño foliar de las hojas de *B. catharticus* es mayor al de *B. brevis*, aunque existe cierto solapamiento. Al comparar el testigo con las poblaciones de *B. brevis*, se destaca que el primero presentó longitudes de lámina inferiores al promedio de éstas, durante el estadio de plántula y la primera fecha del juvenil, situación que luego se revirtió. El menor crecimiento foliar inicial de los individuos del testigo podría ser debido a que emergieron con posterioridad que la mayoría de los de cebadilla pampeana. Considerando las últimas fechas, se observó que en general las entradas de cebadilla pampeana presentaron similar o menor longitud foliar que la cebadilla criolla, (Tabla VIII). Si bien esto concuerda con lo mencionado por los autores anteriormente citados que describen a *B. brevis* como una especie con menor longitud de láminas que *B. catharticus*, la variabilidad presente en aquella puede determinar que algunos materiales genéticos exhiban similar longitud foliar que los de cebadilla criolla.

Varias poblaciones de cebadilla pampeana presentaron hojas más largas que el resto independientemente de la fecha de registro, pero otras variaron su comportamiento en el tiempo, especialmente entre el registro al estado de plántula y el del estadio juvenil. La longitud foliar está determinada por la tasa de elongación foliar,

variable morfogénica que es afectada por diferentes factores del ambiente (Bélanger *et al.*, 1992; Whitehead, 1995). Si bien los registros de longitud foliar se efectuaron sobre las mismas plantas, la medición de las plántulas se efectuó en el invernáculo, previo a ser trasplantadas al ensayo en el campo; las diferentes condiciones ambientales de los dos sitios podrían haber afectado en forma diferencial el crecimiento foliar, de tal forma que la tendencia presentada por algunas entradas en el invernáculo no pudieran mantenerse cuando se llevaron a condiciones de campo. Las diferencias entre poblaciones permiten establecer que existe variabilidad para longitud foliar del estadio vegetativo y también para la hoja bandera. En función del ideotipo perseguido por el mejorador, tanto las entradas de hojas largas como las de hojas cortas podrían constituir materiales de interés para incluir en planes de mejora varietal que pretendan maximizar la producción de forraje, previo análisis de la asociación de la longitud foliar con la densidad de macollos y del comportamiento a través del tiempo y los ambientes de prueba. En cambio, las entradas con mayor longitud de hoja bandera serían las más convenientes cuando se busque alta producción de semilla, característica de interés tanto para las empresas semilleras como para los productores que pretenden lograr la resiembra natural del recurso.

#### **1.2.4. Número de Macollos**

El número de macollos vegetativos registrado en las plántulas logradas a los dos meses de la siembra fue superado en aproximadamente cuatro veces por el que presentaron los juveniles a mediados de primavera. Sin embargo, un mes después el número de macollos que continuaba sin panoja visible decayó en alta proporción. Durante el ciclo de desarrollo de una gramínea, el número de macollos va incrementando a lo largo de la etapa vegetativa hasta alcanzar la etapa reproductiva. En ese momento cesa la formación de macollos y parte de los ya formados pasan a

reproductivos o mueren, especialmente los más jóvenes en lo que suele denominarse “crisis del ahijamiento”, la que es causada por la competencia por luz y nutrientes, entre otros factores, (Gillet, 1984; Pujol Palol, 1998). En las poblaciones de *B. brevis* no se constató que el número total de macollos disminuyera en la etapa reproductiva, sino todo lo contrario, pues éstos superaron ampliamente los valores medios observados en el estadio de plántula y juvenil. La razón de la no disminución del número de macollos en esa etapa se debería a que el recuento correspondió al momento de encañazón, etapa inicial dentro estadio reproductivo en la cual la demanda nutricional no es tan acentuada como en el momento de floración y llenado de grano (Gillet, 1984). Además, como las plantas se cultivaron bajo el sistema de planta aislada, la competencia por luz es mucho menor que en céspedes densos.

La diferencia a favor de los macollos con panoja visible en relación a los restantes, indica que la mayoría de los macollos tendieron a florecer. Lo observado concuerda con Gillet (1984), quien menciona que las forrajeras del género *Bromus* se caracterizan porque en la fase reproductiva casi no hay vástagos vegetativos. Lo anterior también se visualiza a través de los valores de prolificidad, la cual fue elevada en todas las poblaciones, con un promedio general de 81%. Es más, como el registro se efectuó en forma temprana dentro de la etapa adulta, es posible que el número de macollos reproductivos se acentuara hacia el fin de la estación y permaneciesen pocos o ninguno de ellos sin florecer, lo cual comprometería seriamente la perennidad de la planta. Lamentablemente la experiencia no se continuó luego de ese primer año y no pudo determinarse el ciclo de vida de las entradas. De todos modos, en las cinco poblaciones de *B. brevis* y el testigo, cuyos promedios poblacionales indicaron la presencia de menos de cuatro macollos, es probable que se comportaran como anuales ya que los macollos remanentes para iniciar el segundo año de vida eran muy pocos. De hecho, Gillet (1984) considera a los *Bromus* como especies de persistencia

media, mientras que Covas e Itria (1969) y Cámara Hernández (1970) expresan que en función de la zona y de la población, *B. brevis* puede comportarse como anual.

La densidad de macollos es una variable estructural del canopeo y es comúnmente considerada uno de los componentes del rendimiento de forraje, dada su contribución a la definición del área foliar (Davies, 1988; Chapman y Lemaire, 1993). Cuando mayor sea el área foliar de una pastura, mayor será la proporción de la radiación incidente interceptada por el canopeo, lo cuál se relaciona directamente con la productividad de forraje. En todos los recuentos realizados en este trabajo, el número de macollos por planta difirió entre poblaciones. Algunas poblaciones mantuvieron un comportamiento errático en el tiempo, pero otras en todas las fechas estuvieron entre las de pocos macollos (CI1020, N5225 y N5319) o entre las muy macolladoras (CI1012, CI1016, CI1031 y N5222), las que pueden ser consideradas como entradas promisorias. Sin embargo, no siempre una alta densidad de macollos asegura mayor producción de forraje, lo que dependerá del peso de los macollos, que depende a su vez de tamaño de las hojas (Gillet, 1984). La longitud foliar también es una variable estructural del canopeo relacionada positivamente con el área foliar (Chapman y Lemaire, 1993), pero que suele relacionarse inversamente con el número de macollos, como fuera observado en varias especies y en entradas silvestres de raigrás anual y agropiro (Alonso, 1992; Borrajo, 1998). De este modo, los materiales genéticos con diferentes combinaciones de estas variables, pueden alcanzar similar área foliar por compensación (Alonso, 2004 y Alonso y Monterubbianesi, 2006a). A pesar de ello, en algunas poblaciones la correlación negativa puede ser baja e incluso resultar positiva y de esta forma las poblaciones con registros altos a intermedios en ambas variables, podrían componer un área foliar mayor. En este trabajo, los coeficientes de correlación entre los promedios poblacionales de esas variables, para los estadios de plántula, juvenil y adulto, fueron -0,15, -0,09 y 0,01, respectivamente, por lo que la correlación

no fue significativa en ningún caso ( $\alpha = 0,05$ ;  $gl = 19$ ). Teniendo en cuenta las mejores combinaciones de longitud foliar y número de macollos total al inicio de la etapa reproductiva, las poblaciones más promisorias podrían ser N 5313, CI996, CI1012, CI1016, CI1022, CI1031 y CIA1063 (Tablas VIII y IX), si se pretende maximizar el área foliar por planta.

En todos los recuentos, el número de macollos promedio obtenido por las poblaciones de *B. brevis* fue mayor al de las plantas del testigo, al menos en valores absolutos, ya que en primavera, durante el estadio juvenil solo alcanzó 6 mac/planta y en el segundo recuento llegó a 11,7 macollos. Estos promedios son bajos comparados con lo reportado por Rosso (2001), ya que las 22 poblaciones de *B. catharticus* que analizó en Pergamino variaron entre 8 y 21 macollos por planta, en un registro efectuado a la salida del invierno. Es probable que el bajo número de macollos del testigo se deba a que fue la población que más tardó en emerger y por lo tanto en iniciar el macollaje. No obstante no es posible determinar que esa entrada presentó baja capacidad de macollaje, porque no se disponía de un testigo de la especie de aptitud conocida en la zona, a fin de relativizar su desempeño.

En poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* L. en el estadio de plántulas, Alonso (2004) observó que aquellas que presentaron hábito postrado tendieron a producir más macollos por planta. Esta asociación no se constató en las poblaciones de cebadilla pampeana, pues las cuatro poblaciones con mayoría de individuos erguidos no fueron las de menor número de macollos (Figura 2 y Tabla IX).

### **1.2.5. Altura del canopeo, hasta la hoja bandera y máxima**

La altura hasta la hoja bandera, así como la altura máxima de las plantas no constituyen como tales un indicador de la capacidad forrajera de una población, línea o cultivar, pero sí son importantes descriptores a la hora de establecer diferencias entre

entradas de un banco de germoplasma o en etapas posteriores, entre las variedades ya inscritas y las recién obtenidas (Borrajo *et al.*, 1997). En este trabajo, las poblaciones no han podido diferenciarse estadísticamente por la altura máxima alcanzada, a pesar de que los promedios extremos variaron en 30cm; de todos modos, los valores absolutos cumplen igualmente su finalidad descriptiva. En las descripciones de *B. brevis* se han mencionado alturas de la caña florífera de hasta 70cm (Cámara Hernández, 1970; Gutiérrez y Pensiero, 1998). Por su parte, Ruiz *et al.* (1995) en un estudio sobre variabilidad en esa especie observaron diferencias altamente significativas para altura de planta entre poblaciones, con una variación entre ellas de 50,3 a 97,7cm. La altura máxima en ese trabajo fue similar al promedio de todas las poblaciones cultivadas en Balcarce y aproximadamente 10cm menor que la altura de la población más alta empleada en el presente trabajo. La diferencia entre promedios y/o valores extremos puede deberse tanto a que las poblaciones empleadas en ambos trabajos eran diferentes, como a que Ruiz y colaboradores obtuvieron esos registros en Anguil (La Pampa), sobre un suelo Haplustol éntico de menor aptitud agrícola que los Argiudoles y bajo condiciones climáticas menos favorables para el crecimiento de las plantas que las de Balcarce.

La altura del follaje podría considerarse como una medida indirecta del volumen de pasto producido, aunque esta apreciación sería válida si se aplica en plantas de similar porte. En este trabajo las poblaciones presentaron diferente porte e incluso mezcla de tipos, pero igualmente, al comparar la altura de las seis poblaciones que presentaban del 75 al 100% de sus plantas erguidas (Figura 2), se observó que sólo la mitad alcanzó una altura del canopeo superior al promedio, por lo que la relación entre porte juvenil y altura del follaje a floración no estaría tan relacionada en los materiales usados en este trabajo.

Covas *et al.* (1993) no obtuvieron diferencias significativas para longitud de la

panoja en *Bromus parodii*, mientras que sí lo hicieron Aulicino y Arturi (2002) en *B. catharticus* y Ruiz *et al.* (1995) en *B. brevis*. En este trabajo no se registró específicamente la longitud de la panoja, pero se cuenta con el registro correspondiente a la longitud del pedúnculo más el raquis de la inflorescencia, carácter que podría ser utilizado como estimador de la longitud de la inflorescencia. Las plantas de las poblaciones de *B. brevis* y la entrada de *B. catharticus*, si bien no se diferenciaron estadísticamente en altura total, sí lo hicieron en la altura hasta la hoja bandera, lo que implica que la longitud de la inflorescencia por encima de la hoja bandera, también sería diferente entre poblaciones. De esta forma, a similar altura total, las entradas de mayor altura hasta la hoja bandera tendrían alta probabilidad de presentar panojas más cortas. Sin embargo como esta variable está relacionada con la potencialidad de una planta para formar semilla, este carácter debe ser adecuadamente medido y en ensayos que permitan su estimación bajo condiciones de competencia y no bajo un sistema de planta aislada (Toledo y Thomas, 1990).

#### **1.2.6- Producción de Forraje**

La acumulación neta de materia seca está determinada por la densidad de macollos y el peso de éstos, por lo que en sistemas con diferente número de macollos se puede alcanzar la misma producción de forraje por la compensación entre esos caracteres (Grant *et al.*, 1981), ya que el número de macollos se correlaciona inversamente con su peso (Nelson *et al.*, 1977; Sugiyama, 1985). En el corte de inicios de octubre, la cantidad de materia seca (MS) producida por las plantas fue escasa, ya que no sobrepasó los 21g; ese corte se efectuó en el estadio juvenil y en esa fecha la densidad de macollos por planta también fue baja, por lo que la asociación entre ambas variables resultó del 68%, coincidiendo con lo mencionado por Chapman y Lemaire (1993) al incluir a la densidad entre las variables estructurales que conforman

el tapiz vegetal en una pastura en estado vegetativo. En algunos casos las poblaciones que alcanzaron similar MS en el primer corte presentaron similar número de macollos (N5222 y N5229) coincidiendo con la asociación entre variables mencionada anteriormente. Sin embargo, también se observó que poblaciones con diferente número de macollos alcanzaron similar MS (CI1020 y N5331 o CI1012 y CI1016) y en estos casos habría operado la compensación entre número y peso de los macollos mencionada por Grant *et al.* (1981).

La MS producida al segundo corte fue mucho mayor que la del primero, ya que el promedio general alcanzó los 79g; el peso de los macollos también fue mucho mayor que en la etapa juvenil debido a que los mismos no sólo estaban formados por hojas, sino también por cañas y estructuras reproductivas, las que son más pesadas que los órganos foliares. En la etapa reproductiva el número de macollos también fue más alto que en la etapa juvenil, y ambas variables presentaron la misma asociación. En este caso también se observó que en algunas poblaciones, como por ejemplo en N5320, N5313 y CI1029, la MS producida se lograba a través de diferentes combinaciones de densidad y peso de los macollos. La producción de MS en *B. brevis* fue estudiada por Ruiz *et al.* (1995) mediante un ensayo comparativo de rendimiento realizado en Anguil (LP), que incluyó 19 entradas de germoplasma. El corte que realizaron a principios de primavera indicó que las poblaciones variaban en producción de MS desde 456 a 1345Kg/ha, y que las diferencias entre ellas eran significativas al 5%. El rango de variación en producción de MS reportado por esos autores es muy amplio y eso, sumado a los resultados encontrados en este trabajo a nivel de planta aislada, indica que hay amplia variabilidad fenotípica entre poblaciones de *B. brevis* para producción potencial de MS por planta.

En ambos estados de desarrollo la producción de MS registrada para el testigo se encontró comprendida dentro del rango presentado por las poblaciones de *B. brevis*,

pero el peso de los macollos individuales fue muy superior. La producción de forraje en diferentes especies de *Bromus*, incluida *B. brevis* fue analizada por Perczaz *et al.* (2001) en la localidad de Cinco Saltos (Río Negro); ellos encontraron que en ese ambiente, la cebadilla pampeana alcanzaba a producir aproximadamente 600Kg/ha/año, mientras que *B. catharticus* se aproximaba a los 2500Kg /ha. La mayor producción de la cebadilla criolla en comparación con la cebadilla pampeana también había sido observada en La Pampa (Covas e Itria, 1969; Covas, 1981). Sin embargo, en este trabajo como la entrada de cebadilla criolla desarrolló pocos macollos, por más que éstos fueron pesados, no logró alcanzar la producción de MS presentada por algunas poblaciones de *B.brevis*. Esto último coincide con lo observado por Covas y Ruiz (1999) quienes compararon la producción de diferentes cebadilla sembradas en líneas y no encontraron diferencias entre algunas líneas de cebadilla criolla y cebadilla pampeana. Las razones de las diferencias en el comportamiento de las dos especies en relación a la de los otros autores anteriormente mencionados pueden ser varias, entre ellas se pueden mencionar las distintas condiciones ambientales en que se efectuaron las experiencias (climáticas, edáficas y de espaciamiento de las plantas), el diferente material genético empleado y el bajo número de plantas utilizado en esta experiencia, ya que se emplearon cinco plantas por repetición, considerado un “n” mínimo para lograr una adecuada precisión de las estimaciones (van de Wouw *et al.*, 1999). La determinación de la producción de forraje no es sencilla por tratarse de una característica compleja generalmente de baja heredabilidad, que es afectada por numerosos factores del ambiente en interacción con el genotipo (Mariotti, 1986; Aulicino y Arturi, 2002). De todos modos en este trabajo, la producción de MS fue abordada como un estudio preliminar y a los fines de determinar el potencial productivo que podían presentar las poblaciones, de allí el empleo de plantas aisladas. Este sistema de cultivo permite establecer la potencialidad del germoplasma, pero para determinar la real condición forrajera de un material, se requieren pruebas

agronómicas en las que los diferentes materiales genéticos se cultiven en parcelas convencionales bajo corte o pastoreo (Tyler *et al.*, 1987; Schultze-Kraft, 1990; Toledo y Thomas, 1990).

### **1.2.7. Componentes de la Panoja**

Cámara Hernández (1970) y Gutiérrez y Pensiero (1998) mencionan que las espiguillas de *B. brevis* pueden tener entre 5 y 12 antecios, y ser de (3) 5 a 9 (10) en *B. catharticus*. Las entradas analizadas en este trabajo presentaron diferencias entre sí, pero estuvieron dentro del rango mencionados para ambas especies. Dicho autores no presentan en las descripciones, indicaciones sobre el número de espiguillas de la panoja, carácter muy sujeto a variación ambiental. De todos modos, el número de espiguillas por panoja en *B. brevis* fue analizado en 19 accesiones por Ruiz *et al.* (1995). Esos autores reportaron una variación entre entradas comprendida entre 10,8 y 26,3 espiguillas por panoja, siendo las diferencias poblacionales estadísticamente significativas. También registraron el número de cariopses por espiguilla y mencionaron una variación de 6,5 a 9,1 cariopses por espiguilla, aunque en este caso tales diferencias no fueron significativas. En este trabajo el rango de variación observado en ambas variables coincidió con el presentado por Ruiz *et al.* (1995), sólo que las diferencias fueron significativas.

En base al número de espiguillas que forman la panoja en cada población y el número de cariopses integrantes de esas espiguillas, se puede efectuar una estimación del potencial de producción de semilla que tendría cada población. En tal sentido la variación poblacional observada en cebadilla pampeana fue de aproximadamente 80 a 230 semillas por planta, mientras que el testigo podría producir hasta 270 semillas por planta. Si bien es necesario mencionar que el ambiente en que las plantas se desarrollan tiene un impacto determinante en la producción de semillas,

se menciona que en La Pampa, *B. brevis* produce mayor cantidad de semilla que *B. catharticus* y *B. parodii* ya que la primera es de menor perennidad que las otras especies (Covas y Ruiz, 1999), y suele comportarse como anual (Covas e Itria, 1969). No sería el caso en este trabajo donde el testigo se presentó como el de mayor potencial productivo de semillas. Nuevamente, estos resultados deben considerarse como preliminares de la potencial producción de semillas, y su evaluación, por ser una variable compleja, debe ser efectuada en condiciones de cultivo similares a las que emplearía el productor o la empresa semillera.

#### **1.2.8. Afinidad entre las Poblaciones**

El análisis de agrupamiento basado en los caracteres morfológicos y agronómicos cuantitativos presentó un ajuste adecuado y separó a la población de *B. catharticus* de las poblaciones de *B. brevis*, al menor valor de similitud. Lo mismo ocurrió cuando se efectuó el ordenamiento de las 21 poblaciones en base a un análisis de componentes principales. En este trabajo se comparó una sola población de cebadilla criolla contra 20 de la otra especie, y en muchos casos se observó que los registros que presentaba ese testigo no diferían significativamente de los de algunas poblaciones de cebadilla pampeana. Sin embargo la consideración conjunta de su comportamiento a través de 31 caracteres permitió la separación de ambas entidades. La separación a nivel de especies se debió principalmente a que la entrada de *B. catharticus* presentó aristas mayores de 0,5mm y en general, un tamaño de las lámina mayor al promedio de *B. brevis*, tanto en plántulas como en individuos juveniles y adultos. Varios autores mencionaron en las descripciones de estas especies, que *B. catharticus* presentaba mayor longitud de aristas y hojas más largas que *B. brevis* (Cámara Hernández, 1970 y 1978; Gutiérrez y Pensiero, 1998), mientras que otros le atribuyen mayor productividad (Covas, 1981), característica que depende en gran medida del tamaño

de las hojas.

Las poblaciones de *B. brevis* presentaron variabilidad para los caracteres cuantitativos analizados, demostrado por la amplitud de los rangos de variación y la detección de diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones. Ruiz *et al.* (1995) también detectó variabilidad en esta especie a través del registro de 18 caracteres en 19 entradas. Empleando menor cantidad de líneas, Covas y Ruiz (1999) encontraron diferencias en producción de forraje y de semillas. La magnitud de la variabilidad presente en ese conjunto de entradas queda demostrada por que en ningún par de poblaciones la distancia taxonómica fue cero (similitud total), sino que varió entre un mínimo cercano a 0,7 y un máximo de 1,5; además. También se demuestra a través del análisis de ordenación, ya que la variación entre poblaciones fue explicada en baja proporción por los dos e incluso los tres componentes principales y se requirió un alto número de componentes para poder explicar al menos un 90% de la variación entre entradas. La representación bidimensional en base a los dos primeros componentes, complementada con el aporte del tercer componente determinó la formación de grupos similares a los obtenidos en el agrupamiento y permitió sintetizar la variabilidad presente en las entradas a través de unas pocas variables morfológicas y agronómicas.

En el primer componente tuvieron mayor influencia los caracteres agronómicos relacionados con el volumen del forraje por planta, como ser altura del canopeo, materia seca producida en individuos juveniles y número de macollos en diferentes fechas. En el segundo componente predominaron caracteres morfológicos tales como longitud de arista y tamaño foliar definido por ancho y largo de las láminas, aunque estos últimos caracteres también tienen gran influencia en la producción de forraje. Aspectos agronómicos relacionados con el éxito en la implantación y medido a través de emergencia inicial y final, resultaron los atributos de mayor importancia en el tercer

componente. De esta forma, las poblaciones ubicadas en el cuadrante IV de la Figura 17 serían las de mejor comportamiento agronómico desde el punto de vista relacionado con la implantación y la producción de forraje, y posteriormente, las ubicadas en el cuadrante I. La variabilidad detectada entre las entradas de germoplasma de los Bancos de Anguil y de Balcarce (INTA) ofrece poblaciones con una gran variedad de combinaciones interesantes para su inclusión en planes de mejoramiento.

## 2.1. Productos de amplificación de RAPDs

Este tipo de marcadores ha sido ampliamente utilizado en distintos géneros y especies vegetales para efectuar la caracterización, identificación y variabilidad genética presente en poblaciones naturales y cultivadas. En el género *Bromus* Puecher *et al.* (2001b) utilizaron 34 cebadores RAPDs y 9 combinaciones de cebadores AFLPs para determinar la variabilidad genética de 18 entradas de *B. catharticus*. A partir de los RAPDs las accesiones mostraron altos valores de similaridad (>94%) indicando la existencia de una base genética muy estrecha. Estos marcadores sin embargo permitieron separar algunos materiales cercanamente emparentados. Por otro lado la técnica de AFLP fue mas eficiente para detectar polimorfismos y genotipos unicos entre los materiales analizados. Por otro lado, Ferdinandez y Coulman (2002) utilizaron estos mismos tipos de marcadores para evaluar la variación genética entre las poblaciones de *Bromus inermis*, *B. riparius* y sus híbridos interespecíficos. Estos autores utilizaron 21 cebadores RAPDs y 7 combinaciones de cebadores para el análisis de AFLPs. De acuerdo a sus resultados, ambos tipos de marcadores permitieron establecer las relaciones genéticas entre las poblaciones y clasificar los individuos dentro de la población a la que pertenecían, pero los marcadores AFLP resultaron más informativos debido a que detectaron un mayor número de marcadores polimórficos. Diaby y Casler (2003) utilizaron 19 cebadores RAPDs para caracterizar cultivares y poblaciones experimentales de *B. inermis* y obtuvieron 153 bandas polimórficas. Estos datos les permitieron observar que la variabilidad genética entre los cultivares y poblaciones fue relativamente alta y que la misma se debió principalmente a diferencias entre individuos dentro de poblaciones. Estos marcadores resultaron útiles para calcular los niveles de diversidad genética y para discriminar entre poblaciones de la especie *B. inermis*. Por otro lado, Cuyeu *et al.* (2005) utilizaron RAPDs para caracterizar 8 poblaciones de *B. brevis* y lograron

diferenciar a las poblaciones que presentaron valores de similitud entre 0,5 y 0,8 y separar a la especie de otras pertenecientes al mismo género. A pesar de estos resultados, los marcadores RAPDs no fueron utilizados para la caracterización de las poblaciones de este estudio porque se consideró que el número de bandas amplificadas resultaba poco informativo para separar un mayor número de poblaciones y por la baja repetibilidad obtenida entre una amplificación y otra, lo que constituye una de las principales desventajas que presentan este tipo de marcadores (Spooner *et al.*, 2005).

## **2.2. Productos de amplificación de SSRs**

La única mención que se tiene sobre el uso de estos marcadores en el género es el trabajo realizado por Ramakrishnan *et al.* (2004) en poblaciones de *B. tectorum*. Este tipo de marcadores requiere que los cebadores hayan sido previamente diseñados, lo que constituye una tarea ardua y honerosa porque cada locus debe ser caracterizado individualmente. Esto constituye una de sus principales desventajas, ya que dificulta su aplicación a especies o grupos taxonómicos que no han sido muy estudiados (Spooner *et al.*, 2005). Ramakrishnan *et al.* (2004) lograron amplificar 24 alelos a partir de siete cebadores que habían diseñado previamente para esta especie. Estos revelaron polimorfismos que les permitió obtener valores de diversidad genética entre 0 y 0,82, indicando la existencia de variabilidad entre esas poblaciones. Algunos cebadores diseñados para una especie determinada pueden ser utilizados en especies emparentadas (Wunsch y Hormaza, 2002) a diferencia de los resultados del presente trabajo. Cuando se utilizaron los cebadores diseñados para *B. tectorum* no fue posible obtener suficientes bandas polimórficas que permitieran caracterizar a las 20 poblaciones de cebadilla pampeana y la población testigo de *B. catharticus*. Esto puede deberse a que al tratarse de especies pertenecientes a distintas secciones

taxonómicas no compartan las mismas secuencias de ADN a partir de las cuales se diseñaron los cebadores de *B. tectorum*. Además, al tratarse de especies que habitan en distintos continentes, podrían tener una gran cantidad de diferencias en sus secuencias de material genético lo que también podría ser la causa de que dichos marcadores tengan mayor especificidad y por lo tanto mejores resultados cuando se utilizan para caracterizar poblaciones de *B. tectorum* de América del Norte.

### **2.3. Productos de amplificación de ISSRs**

Debido a que los ISSRs son marcadores de tipo dominante, no fue posible realizar un análisis en términos de loci y alelos. Sin embargo los 3 marcadores utilizados permitieron detectar un gran nivel de variabilidad y polimorfismo en las poblaciones.

El número de patrones de bandas obtenidos con cada uno de los marcadores fue importante, revelando la existencia de variabilidad entre y dentro de poblaciones, a pesar de que hubo bandas que fueron comunes en individuos de distintas poblaciones.

El marcador ISSR3 permitió detectar el mayor número de bandas y de patrones en general aunque para algunas de las poblaciones los otros dos marcadores fueron más informativos, por lo que la elección del marcador dependerá de la población que se desee relevar y en futuras experiencias los tres cebadores podrían ser utilizados debido a que permiten obtener información complementaria.

Ninguna de las poblaciones resultó genéticamente igual para ninguno de los tres marcadores utilizados. En algunas poblaciones se observaron individuos con bandas que se presentaron con muy baja frecuencia pero en ninguna entrada pudo detectarse una banda que permitiera diferenciarla y que estuviera presente en sus siete individuos analizados. Los siete individuos de la población CI1020 al ser analizados con el marcador ISSR3 presentaron una banda que se encontró únicamente en cuatro individuos de la población CI1028. Estas dos poblaciones fueron coleccionadas en

localidades próximas, separadas aproximadamente por 140km. Esta banda podría estar asociada con alguna característica relacionada con la adaptación a ese tipo de ambiente que corresponde a la eco-región del monte y al distrito agroclimático 51. Esta variante puede haberse originado también por alguna mutación bastante reciente o que no se haya extendido a distancias mayores, o simplemente revelar la existencia de deriva génica.

El elevado número de patrones observados para las poblaciones de cebadilla pampeana puede tener su origen en su tipo de reproducción. Covas (1981) menciona que en *B. brevis* ocurre alternancia de cleistogamia y chasmogamia. Las plantas a partir de las cuales se colectaron las semillas originales pueden haber sido generadas a partir de polinización cruzada, por lo que podría esperarse encontrar una gran cantidad de genotipos diferentes. En el mismo sentido, Diaby y Casler (2003) mencionan que en especies con polinización cruzada como *B. inermis*, no se han encontrado dos individuos que fueran idénticos cuando se realizó la caracterización molecular con RAPDs, a diferencia de lo obtenido en este trabajo, aunque la identidad solamente se observó en 4 individuos.

Si las poblaciones originarias de las entradas aquí analizadas hubieran sido cleistógamas, las diferencias observadas podrían deberse a que las panojas colectadas provinieron de plantas con genotipos distintos, con lo cuál las diferencias genéticas entre poblaciones serían mayores que en plantas chasmógamas. El número de genotipos podría ser considerable si se tiene en cuenta que la cebadilla pampeana es una especie generalmente anual o bienal, y al tener ciclos más cortos los individuos pueden generar por mutación nuevas variantes, o acumular los cambios en el tiempo y así diferenciarse. Según Naranjo (1985), *B. brevis* siempre inicia la floración con chasmogamia y al finalizar el período de este tipo de floración se han observado inflorescencias con ambos tipos de flores (cleistógamas y chasmógamas) incluso entre flores de la misma espiguilla, por lo cual resulta más complejo atribuir las diferencias

observadas al tipo de reproducción predominante. Para ello deberían efectuarse estudios tendientes a determinar cual es el tipo de reproducción predominante en materiales de la especie y tener en cuenta la fecha de siembra y el fotoperíodo, ya que se ha mencionado que estos factores tendrían implicancia en los periodos de floración, al menos en *B. catharticus* (Naranjo, 1992).

El testigo no presentó ningún patrón o banda específica por lo que estos cebadores no permitieron detectar diferencias a nivel de especies. Diaby y Casler (2003) tampoco encontraron fragmentos específicos para separar *B. inermis* y *B. pumpellianus* utilizando RAPDs. Para ello sería necesario diseñar cebadores específicos que permitan distinguir las especies de la sección *Ceratochloa*.

### **2.3.2 Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA )**

La mayor proporción de variabilidad observada correspondió a diferencias entre individuos pertenecientes a la misma población, como se observó a partir del AMOVA. Estos resultados coinciden con lo observado en poblaciones de *B. inermis*, en las cuales las diferencias dentro de poblaciones variaron entre 82 y 86% (Diaby y Casler, 2003). Fernandez y Coulman (2002) encontraron una partición de la varianza molecular similar utilizando AFLPs y RAPDs en poblaciones de *B. inermis* y *B. riparius*. El porcentaje de variación dentro de poblaciones que obtuvieron estos autores fue del 56 % cuando utilizaron marcadores AFLPs, coincidiendo con los resultados de este trabajo. Este porcentaje fue solamente un poco mas bajo (40%) que el que obtuvieron con AFLPs, cuando utilizaron RAPDs. Pagano *et al.* (2005) en el estudio de la variabilidad en especies del género *Bromus* mencionan que la aplicación de ambos tipos de marcadores AFLP y RAPD, generaron información semejante por lo que decidieron continuar el estudio con el último tipo de marcadores mencionados, por la simplicidad de la técnica. Esto avala la elección realizada de utilizar marcadores del

tipo ISSR, ya que estos son similares a los RAPDs pero con la ventaja de ser más reproducibles (Nuez y Carrillo, 2000). Sin embargo Ramakrishnan *et al.* (2004) encontraron que el 56% de la variación molecular correspondía a diferencias entre poblaciones de *B. tectorum* caracterizadas con AFLPs. Estas diferencias pueden deberse a que los autores mencionados utilizaron 13 combinaciones de cebadores, mientras que la caracterización de las poblaciones en este trabajo se realizó con 3 cebadores. Por otro lado, *B. brevis* y *B. tectorum* presentan diferentes modos de reproducción. *B. tectorum* es una especie con autopolinización obligada, y éstas presentan mayores diferencias entre poblaciones que entre individuos de la misma población, mientras que *B. brevis* se clasificaría como una alógama facultativa (Naranjo, 1992). Además, los marcadores ISSR y los AFLP pueden estar detectando diferentes tipos de variación de la secuencia de ADN, las que podrían estar acentuadas ya que se trata de trabajos efectuados en dos especies pertenecientes a distintas secciones dentro del género.

En poblaciones naturales de *B. auleticus*, Yanaka *et al.* (2005) mediante la utilización de isoenzimas encontraron mayor variabilidad media dentro de poblaciones que entre las poblaciones. Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, a pesar de haber utilizado metodologías diferentes para la caracterización, y estar explorando una porción diferente del genoma, ya que los ISSRs se localizan con mayor probabilidad en regiones no codificantes, mientras que las isoenzimas revelan variación génica.

No obstante, la proporción de variabilidad detectada entre las poblaciones de *B. brevis* en este trabajo fue relativamente alta (44%) y el AMOVA determinó que estas diferencias eran significativas. Esto indicaría que las 20 poblaciones de *B. brevis* analizadas tendrían un alto potencial genético para el mejoramiento de germoplasma, tanto por la variabilidad dentro como entre poblaciones.

### **2.3.3 Afinidad entre las poblaciones**

Los agrupamientos obtenidos a partir del Análisis de Coordenadas Principales fueron similares cuando se utilizaron los coeficientes de emparejamiento simple y de Jaccard para calcular la similitud entre individuos. Si bien los individuos de la población testigo se posicionaron formando un grupo, mediante este análisis no fue posible diferenciarlos de la especie *B. brevis*. Los dendrogramas obtenidas a partir de las matrices de similitud calculada utilizando los coeficientes de emparejamiento simple y de Jaccard presentaron coincidencias en el agrupamiento de algunas poblaciones, pero ninguno de ellos permitió separar al testigo de las poblaciones de *B. brevis*.

La similitud observada entre las poblaciones de *B. brevis* analizadas en este trabajo coincide parcialmente con el rango mencionado por Cuyeu *et al.* (2005) quienes obtuvieron un rango de similitud comprendido entre 0,5 y 0,8 en la caracterización molecular de 8 poblaciones de *B. brevis* utilizando RAPDs. El rango de similitud para las 20 poblaciones de cebadilla pampeana del presente trabajo se extendió entre 0,59 y 1, ya que cuatro individuos se presentaron como idénticos. Esto puede deberse a que el número de cebadores utilizados fue insuficiente para detectar la variabilidad existente. Por ello, en futuros trabajos debería considerarse utilizar un mayor número de cebadores de manera de separar todos los individuos o confirmar su identidad total.

### **2.3.4 Asociación entre los caracteres morfológicos y los caracteres moleculares**

No fue posible realizar la correlación entre los caracteres morfológicos y los caracteres moleculares debido a que los análisis para cada tipo de datos se efectuaron a distintos niveles. La caracterización morfológica se efectuó a partir de datos

poblacionales mientras que la caracterización molecular se hizo a nivel de individuo. Para poder realizar dichas comparaciones sería necesario efectuar la caracterización molecular a partir de *bulks* representativos de cada población.

Los grupos formados a partir de la caracterización molecular no presentaron una relación directa con la presencia de caracteres cualitativos que permitieran diferenciarlos. Sin embargo se observó que el grupo G1m se caracterizó por presentar poblaciones que solo tenían vainas púrpuras. El grupo G2m presentó lemmas pubescentes y porte semipostrado. Las poblaciones del grupo G3m no tuvieron características cualitativas comunes. El grupo G4m coincidió con el grupo cualitativo que presentó glumas y lemmas glabras y porte semipostrado a erguido, mientras que el grupo G5m tuvo glumas superiores y lemmas pubescentes y porte semipostrado a erguido. El grupo G6m tuvo solamente vainas púrpuras, lemmas pubescentes y porte semipostrado.

En cuanto a los grupos obtenidos mediante los caracteres cuantitativos, no pudieron asociarse el agrupamiento obtenido a partir de los caracteres moleculares, ya que éstos incluyeron a poblaciones con potencial forrajero bajo, intermedio y alto o promisorio. El único grupo en el que se observó cierta correspondencia fue en G2m que incluyó a las poblaciones CI1022 y CIA1063 que se incluyeron dentro de los grupos Go4 y Go5 del ordenamiento cuantitativo, los que presentaron el mejor comportamiento agronómico en relación al número de macollo, la altura del canopeo y la producción de materia seca. La población CI1012 se ubicó cercana al grupo G2m y también fue una de las que se destacó por presentar características agronómicas similares y además, mayor tamaño foliar. Por otro lado, otras poblaciones promisorias como CI1016 y N5226 se ubicaron en otros 2 grupos, en diferentes cuadrantes.

El análisis realizado a partir de los fragmentos generadas por los 3 cebadores ISSR indican que existe variabilidad genética en las poblaciones de *Bromus brevis*

conservadas en los bancos de germoplasma de las EEA de Balcarce y Anguil, lo que concuerda con los resultados previos que indican la existencia de variabilidad morfológica y agronómica.

El nivel de variabilidad encontrado a partir del análisis de caracteres morfoagronómicos y marcadores moleculares sugieren que estas poblaciones de *B. brevis* pueden ser fuente de genes a utilizarse en el mejoramiento de dicha especie. Además, debido a la posibilidad de actuar como puente con *Bromus catharticus* (Naranjo, 1985), se podría ampliar la base genética esta última cebadilla mediante el aporte de caracteres de interés relacionados con el establecimiento de la pastura y la producción de forraje y de semilla.

### **3. Sitios de colecta**

#### **3.1. Características de los sitios de colecta**

Los sitios de colecta de las entradas utilizadas procedían de cuatro provincias políticas de la región centro-sur de la Argentina, los que correspondían a tres Provincias Fitogeográficas: Monte, Espinal y Pampeana (Cabrera, 1976). Morello y Matteucci (1999, en Bertonati y Corcuera, 2000) dividen al territorio de la Argentina en 18 eco-regiones, las que tienen particularidades tanto físicas como bióticas, sociales e históricas, que las hacen distintas entre sí. Las eco-regiones a las que pertenecían los sitios de colecta reciben la misma denominación que las Provincias Fitogeográficas de Cabrera (1976) aunque no tienen exactamente los mismos límites. La mayoría de las entradas de *B. brevis* pertenecía a la eco-región del Monte y las menos abundantes a la eco-región Pampa, de la cual procedía también la entrada de *B.catharticus*. A pesar de ello, los sitios dentro de cada eco-región presentaban diferencias en la altura sobre el nivel del mar y/o las condiciones climáticas, y debido a esto último pertenecían a diferentes distritos agroclimáticos.

Además de la problemática social e histórica, las características consideradas por Matteucci (1999) para efectuar la división del territorio argentino en eco-regiones, corresponden a características de tipo macroambiental. Éstas suelen imprimir características distintivas a las especies y/o poblaciones adaptadas a cada una de ellas, especialmente en los extremos de un gradiente o cline; sin embargo, dentro de esas macro-regiones, es posible diferenciar zonas con características climáticas y edáficas más específicas, y esa variación microambiental también sería capaz de determinar adaptaciones especiales en las poblaciones, las que forman mosaicos por sobre la variación clinal (Breese y Tyler, 1986; Alonso 1992).

### 3.2. Relación entre los Sitios y los caracteres cualitativos de las Poblaciones

La correlación entre las matrices de distancia euclídea entre los sitios y la de similitud entre las poblaciones en base a los caracteres cualitativos, fue mucho más baja que la correlación entre los sitios y los caracteres cuantitativos, y tampoco fue significativa. No se encontró ninguna asociación con las características cualitativas de las poblaciones y los sitios de procedencia, ya que algunos caracteres como pubescencia de las láminas se encontró tanto en sitios con condiciones áridas, como en los sitios con mayores precipitaciones. Además, dos poblaciones provenientes del mismo sitio presentaron diferencias en pubescencia de glumas y lemmas, en el tipo de porte y en la presencia de vainas púrpuras. Ninguna de las características cualitativas estuvo relacionada con la eco-región de la que provenían las poblaciones ya que las dos variantes (presencia y ausencia) se observaron tanto en poblaciones del Monte como del Espinal y/o de la eco-región Pampa. El testigo, CI1020 y CI1012 fueron las únicas poblaciones que no tuvieron láminas pubescentes y cada una de ellas provenía de una eco-región diferente. El grupo1 obtenido a partir del análisis de ordenamiento con los datos cualitativos incluyó a poblaciones que se nuclearon dentro de los grupos G1s y G2s del análisis de componentes principales efectuado con los datos de los sitios, los que presentaban diferencias en altura sobre el nivel del mar, en las temperaturas en los meses de enero y julio y en los valores de las precipitaciones. Todo esto indicaría que la variabilidad de los caracteres cualitativos no estaría asociada con el origen y que ninguno de los caracteres analizados confiere por sí solo mayor adaptación a las condiciones ambientales de un determinado sitio. La falta de asociación entre la variación genotípica y el origen geográfico, ha sido mencionada por varios autores, pero la mayor parte de esos trabajos han cuantificado la variación mediante caracterización morfológica cuantitativa (Ram, 2004) o molecular (Guma, 2006, Ursula *et al.*, 1997) Por otro lado, Oja (2002) cita a Wu y Jain (1978) quienes

encontraron que alrededor del 90% de la variación geográfica entre poblaciones naturales de *Bromus rubens* se debió a plasticidad fenotípica. También Oja (2002) cita a Jain *et al.* (1970) quienes encontraron que, las diferencias morfológicas entre plantas autógamias de *B. mollis* colectadas en diferentes ambientes, no se apreciaron en sus progenies cultivadas en un invernáculo simulando un ambiente común. Estos autores concluyeron que las amplias diferencias morfológicas observadas entre las plantas progenitoras podrían atribuirse a la respuesta plástica a diferencias ambientales en sus habitats de crecimiento original.

### **3.3. Relación entre los Sitios y los caracteres cuantitativos de las Poblaciones**

La correlación entre las matrices de distancia euclídea entre los sitios y de distancia entre las poblaciones, basada en los caracteres cuantitativos, fue baja y no significativa. Relaciones claras entre características morfológicas y origen geográfico de los materiales genéticos no siempre se logran, tal como mencionaran en un estudio sobre 37 entradas sudamericanas de *Distichlis spicata* (Ram *et al.*, 2004) o entre poblaciones italianas de *Festuca arundinacea* (Veronesi y Falcinelli, 1988). De todos modos, si bien la relación entre los sitios de origen y las características morfológicas y agronómicas de las poblaciones, no fue pronunciada, se observó que la mayoría de las poblaciones con mejor comportamiento agronómico procedían de sitios correspondientes a la provincia de Buenos Aires y de las eco-regiones Pampa y Espinal (Figura 17), con excepción de las poblaciones CI1022 y N5313. Por otra parte, las entradas de menores dimensiones de lámina, escasos macollos y baja producción de materia seca aparecían asociadas a sitios de la eco-región Monte, preferentemente de las provincias de La Pampa, Río Negro y Neuquén, exceptuado las entradas CI1014 y CI1033. Las diferencias en comportamiento entre las poblaciones de las zonas más áridas comparadas con las de ambientes más favorables para el crecimiento de las plantas, estaría indicando cierto grado de adaptación diferencial en

función al sitio de origen, de tal forma que aunque todas se cultiven en condiciones favorables, las diferencias persisten.

### **3.4. Relación entre los Sitios y los caracteres moleculares de las Poblaciones**

No fue posible realizar la correlación entre los sitios de procedencia de las entradas y los datos de la caracterización molecular debido a que los análisis para cada tipo de datos se efectuaron a distintos niveles. La caracterización de los sitios de procedencia se efectuó a partir de datos poblacionales mientras que la caracterización molecular se hizo a nivel de individuo. Para poder realizar dichas comparaciones sería necesario efectuar la caracterización molecular a partir de *bulks* representativos de cada población.

A partir de la comparación entre los análisis de ordenamiento de los sitios y de los datos moleculares no se encontró una relación directa entre la dispersión de los individuos obtenida a partir de los datos moleculares y las eco-regiones de las que provenían, con excepción del grupo G4m que incluyó a poblaciones que provenían de la eco-región Monte. Sin embargo los sitios de donde procedían presentaban amplias diferencias en cuanto a los parámetros ambientales y topográficos considerados, además de estar separados por amplias distancias geográficas. El hecho de que otras poblaciones correspondientes a la eco-región Monte se incluyeron en otros grupos, y junto a poblaciones de otras eco-regiones indica que estos marcadores no permiten separar las poblaciones en base a su procedencia. Esto puede deberse a que entre la variabilidad genética contenida en estas poblaciones no hay variantes específicas para las condiciones ambientales de una eco-región determinada o bien, que los marcadores utilizados en este trabajo fueron insuficientes o inadecuados para detectar dichas variantes. Si bien poblaciones que habitan sitios con condiciones

ambientales similares pueden ser más parecidas desde el punto de vista genético también es probable que las poblaciones de *B. brevis* no estén compuestas por genotipos preadaptados sino más bien que puedan estar constituidas por una variabilidad general que les permita comportarse diferente frente a distintas condiciones ambientales.

Yanaka *et al.* (2005) no encontraron correlación entre los grupos de similaridad genética que obtuvieron a partir de poblaciones naturales de *B. auleticus* con las distancias geográficas de los sitios de colecta. Massa *et al.* (2001) encontraron resultados dispares entre dos grupos de poblaciones de la sección *Ceratochloa* de la Patagonia que no incluyeron a *B. brevis* ni a *B. catharticus*. A partir del análisis de fragmentos amplificados con AFLPs obtuvieron dos grupos. Para uno de ellos encontraron una fuerte correlación entre las similitudes genéticas y las distancias geográficas, sucediendo lo contrario para el otro grupo.

Por lo tanto debería ampliarse el número y tipo de marcadores moleculares utilizados para efectuar la caracterización molecular de las poblaciones de cebadilla pampeana y analizar si es que pueden encontrarse alelos o genotipos relacionados con adaptaciones específicas para determinados ambientes.

## CONCLUSIONES

- Existe variabilidad morfológica entre las poblaciones de *B. brevis* conservadas en los bancos de germoplasma de las Estaciones Experimentales del INTA de Balcarce y de Anguil, tanto en caracteres cualitativos como cuantitativos morfológicos y agronómicos.
- Las poblaciones de cebadilla pampeana analizadas en el presente trabajo presentan diferente comportamiento agronómico en condiciones potenciales, evidenciado a través de la capacidad de implantación y de producción de forraje y de semillas por planta.
- Existe variabilidad genética intra e interpoblacional entre las poblaciones de *B. brevis* que puede ser detectada mediante marcadores ISSR. La mayor proporción de la diversidad genética se distribuye entre individuos dentro de poblaciones.
- No se encontró asociación entre los caracteres de los sitios de procedencia de las poblaciones y la variabilidad morfológica y genética encontrada entre las poblaciones de cebadilla pampeana.

## BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, S.I.1992.Variabilidad en poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam. naturalizadas en los pastizales de la provincia de Buenos Aires.Tesis M.Sc.Escuela Postgrado en Prod. Veg., UNMdP.Unidad Integrada Balcarce: EEA Balcarce, INTA y Facultad de Ciencias Agrarias.132p.
- ALONSO, S. I.2004.Evaluation of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations naturalized in the flooding pampa of Argentina.I- Morphological and physiological characters at juvenile stage.Genet. Resour. Crop Ev. 51:747-758.
- ALONSO, S.I. y PERETTI, A.1995.Germination studies in *Briza subaristata* seeds.Seed Sci. Technol. 23(3):793-800.
- ALONSO, S.I., I.R. GUMA and CLAUSEN, A.M.1999.Variability for salt tolerance during germination in *Lolium multiflorum* Lam. naturalized in the pampean grasslands.Genet. Resour. Crop Ev. 46:87-94.
- ALONSO, S.I. and MONTERUBBIANESI, M.G.2006a.Phenotypic variability in leaf area and its components in clones of two subspecies of *Paspalum dilatatum* during summer and autumn.New Zeal. J. Agr. Res. 49:25-33.
- ALONSO, S.I. and MONTERUBBIANESI, M.G.2006b.Estimación del área foliar en cebadilla pampeana a través de sus componentes.Rev. Argent. Prod. Anim. 26(1):246-247.
- ALONSO, S.I., FERREYRA, M.J. y CLAUSEN, A.M.2005.Variabilidad fenotípica en caracteres morfológicos y emergencia de plantulas en poblaciones de *Bromus brevis*.Rev. Argent. Prod. Anim. 25:38-139.
- ALONSO, S.I., GARCÍA GARCÍA, P. and BORRAJO, C.I.2000.An Argentinean germplasm collection of slender wild oat (*Avena barbata*).Genet. Resour. Newsl. 121:42-46.
- ALONSO, S.I. e ISPIZÚA, V.1996.Catálogo del material del Herbario BAL. *Poaceas* (Gramíneas). Unidad Integrada Balcarce: EEA Balcarce, INTA y Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP.66 p.
- ANDRES, A.2001.El pastizal natural.En: Forrajeras y Pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina.Maddaloni , J y Ferrari, L. eds.520 p.
- ARTURI, J., MARCHETTA, M., RAPELA, M. y MUJICA, M.1983.Variabilidad y correlaciones en cebadilla criolla.Revista de la Facultad de Agronomía UNLP. Buenos Aires.pp 191-195.
- AULICINO, M. B. and ARTURI, M. J.2002.Phenotypic diversity in Argentinian populations of *Bromus catharticus* (*Poaceae*). Genetic and environmental components of quantitative traits.New Zeal. J. Bot. 40:223-234.
- BÉLANGER, G., GASTAL, F. and WARENBOURG, F.R.1992.The effects of nitrogen fertilization and the growing season on carbon partitioning in a sward of tall fescue (*Festuca arundinacea* Scrib.).Ann. Bot. 70:239-244.

- BELLOZAS, M.E.; SCOLES, G.E.; PATTACINI, S.H.; COVAS, G.F. y RUIZ, M.A.2000.Composición química de los antecios maduros de tres líneas experimentales del género *Bromus* (*Gramineae*).An. Asoc. Quím. Argent. 88(5/6):103-106.
- BERTONATTI, C. y CORCUERA, J.2001.Situación ambiental Argentina 2000.Fundación Vida Silvestre.440 p.
- BHATTACHARYA, S.; DAS, M. RADHARAMAN, B. and PAL, A.2006.Morphological and molecular characterization of *Bambusa tulda* with a note on flowering. Ann. Bot. 98:529-535.
- BILENCA, D. y MIÑARRO, F.2004.Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil. Fundación Vida Silvestre.Buenos Aires.Argentina.323 p.
- BOGGIANO, P. y ZANONIANI, R.A.2001.Producción de semilla de *Bromus auleticus* Trinius. Consideraciones generales. Dialogo LVI: Los Recursos Fitogénéticos del Género *Bromus* en el Cono Sur.pp 29-33.
- BORRAJO, C.I.1998.Generación y expansión de los órganos foliares de agropiro alargado en función del material genético y la disponibilidad de nitrógeno.Tesis de Magister Scientiae.Facultad de Ciencias Agrarias.UNMdP.Balcarce, Argentina.75 p.
- BORRAJO, C.I. y ALONSO, S.I.2004.Germinación, emergencia e implantación de variedades experimentales de agropiro alargado.Rev. Argent. Prod. Anim. 24: 29-40.
- BORRAJO, C.I., ALONSO, S.I. y ECHEVERRÍA, H.E.2000.Evolución del pseudotallo y la foliosidad en materiales de agropiro.Actas 16° Congreso Latinoamericano de Producción Animal y 3° Congreso Uruguayo de Producción Animal (Montevideo, 2000, mar 28-31).En CD, Trabajo N°242.
- BORRAJO, C.I.; ALONSO, S.I. y MONTERUBBIANESI, G.1997.Caracterización de poblaciones naturalizadas de Agropiro alargado. I Porte, color y altura.Rev. Argent. Prod. Anim. 17(4):395-403.
- BORRAJO, C.I.; ALONSO, S.I. y ECHEVERRÍA, H.E.2001.Materiales genéticos de agropiro alargado: Producción y calidad del forraje acumulado de primavera.Rev. Argent. Prod. Anim. 21(3):159-170.
- BORRAJO, C.I.; ALONSO, S.I., MAZZANTI, A. y MONTERUBBIANESI, G.1998.Caracterización de poblaciones naturalizadas de Agropiro alargado. 2. Macollaje y caracteres reproductivos.Rev. Argent. Prod. Anim. 18:183-192.
- BRAMARDI, S.J.2000.Estrategias para el análisis de datos en la caracterización de recursos filogenéticos. Tesis Doct. Univ. Politécnica de Valencia. Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Valencia.390 p.
- BREESE, E.L. and TYLER, B.F.1986.Patterns of variation and the underlying genetic and cytological architecture in grasses with particular reference to *Lolium*.In: Styles, B.T. ed. Intraspecific classification of wild and cultivated plants.Clarendon Press.Oxford, United Kingdom.pp 53-69.

- CABRERA, A.L.1976.Regiones Fitogeográficas Argentinas.Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería.2° ed.T. II.85 p.
- CABRERA, A. y ZARDINI, M.1978.Manual de la Flora de los alrededores de Buenos Aires.2° ed. ACME S.A.c.l., Buenos Aires.755 p.
- CABRERA, A.L.1970.Flora de la provincia de Buenos Aires t. IV pte II.Gramíneas.Colección científica del INTA, Buenos Aires.624 p.
- CAGAS, B.1991.Genetic resources of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and *Acremonium coenophialum*.In: Report of a working group on forages (fourth meeting). IBPGR, Hungría.pp 76-78.
- CÁMARA HERNÁNDEZ, J.1970.*Bromus*.En: Flora de la provincia de Buenos Aires t. IV pte II. Gramíneas.Cabrera, A.L. ed.Colección científica del INTA, Buenos Aires.pp 85-101.
- CÁMARA HERNÁNDEZ, J.1978.*Bromus* L.En: Flora Patagónica t. VIII pte. III. Correa, M.N. ed.Colección científica del INTA, Buenos Aires.pp 77-93.
- CARÁMBULA, M.1981.Producción de semillas de plantas forrajeras.Hemisferio Sur, Buenos Aires.518 p.
- CHAPMAN, D. F. and LEMAIRE, G.1993.Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation.In: Baker, M. J. ed.Grassland for Our World.SIR Publishing, Wellington.pp. 55-64.
- CHARMET, G.1991.Geographically constrained clustering: a tool for establishing a core from a large collection of wild populations in forage grasses.In: Report of a working group on forages (fourth meeting).IBPGR, Hungría.pp 59-62.
- CLAUSEN, A.M.1997.Informe Especial:Agrobiodiversidad: La red de bancos del INTA.Campo y Tecnología 27:14-15.
- CLATZLE, A.2007.Especies exóticas para el Chaco, adaptación y potencialidades.Brangus 29(54):88-92. <<http://www.produccion-animal.com.ar>> [consulta: 13/02/08].
- COVAS, G.2006.Plantas pampeanas.El libro de Guillermo Covas. <<http://www.notaspampeanas.com.ar/plantas/cebadillas.htm>> [consulta: 01/09/2006].
- COVAS, G. e ITRIA, C.1969.Cebadillas: Gramíneas de elevado valor forrajero, integrantes insustituibles de pasturas cultivadas asociadas.INTA, EEA Anguil. pp 1-3.Circular de extensión n°28.
- COVAS, G.F.1981.Las especies pampeanas de *Bromus* (Gramineae).Apuntes para la flora de La Pampa.pp 247:256.
- COVAS, G.F. y RUIZ, M.A.1999.Producción de forraje y semilla de tres especies de *Bromus*. Revista de la Facultad de Agronomía UNLaPam 10(1):1-19.
- COVAS, G.F.; RUIZ, M.A. y PÉREZ FERNÁNDEZ, J.1995.Resistencia al carbón de la panoja en líneas de cebadillas (*Bromus* spp.).INTA, EEA Anguil.pp 1-11.Publicación Técnica n°44.

- COVAS, G.F.; RUIZ, M.A.; ERNST, R.D. y BABINEC, F.J.1993.Variabilidad en cebadilla intermedia (*Bromus parodii* Covas et Itria).5° Jornadas de Ciencias Naturales UNLPam.pp 37-44.
- CRISCI, J.V. y LÓPEZ ARMENGOL, M.F.1983.Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica.OEA.Washington, DC.132 p.Serie de Biología, Monografía n°26.
- CUYEU, A.R; PAGANO, E.M.; ROSSO, B.; TRAVERSO, J. y RIOS, R.2005.Caracterización molecular de poblaciones de *Bromus brevis*.Journal of Basic and applied genetics.v. 17 (Supplement).Actas 34° Congreso Argentino de Genética (Chubut, 2005, sep 11-14).p 163.
- DALLA RIZZA, M.; REAL, D. y VIDAL, S.2003.Desarrollo y aplicación de marcadores codominantes para la determinación del sistema reproductivo en plantas.INIA Uruguay, Montevideo.39 p.Serie Técnica n°37.
- DAVIES, A.1988.The regrowth of grass sward.In: Jones, M.B. and Lazenby, A. ed.The grass crop: the physiological basis of production.Chapman and Hall.pp 85-127
- DE FINA, A. L.1992.Aptitud agroclimática de la República Argentina.Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria.INTA, Buenos Aires.428 p
- DIABY, M. and CASLER, M.D.2003.RAPD marker variation among smooth bromegrass cultivars.Crop Sci. 43: 1538-1547.
- ECHEVERRÍA, I., MADDALONI, J. y ALONSO, S.I.2001.Especies nativas e introducidas con Valor forrajero.En: Forrajeras y Pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. Maddaloni , J y Ferrari, L. ed.Universidad Nacional de Lomas de Zamora.Facultad Ciencias Agrarias. Buenos Aires.pp 29-75.
- ECHEVERRÍA, I.; MADDALONI, J. y ALONSO, S.2005.Lista de las especies con valor forrajero presentes el ecosistema Templado Húmedo de la Argentina.En: Maddaloni, J. y Ferrari, L. eds.Forrajeras y pasturas del ecosistema Templado Húmedo de la Argentina. 2ª ed. INTA-Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires.pp. 29-75.
- EXCOFFIER, L. SMOUSE, P. and QUATTRO, J.1992.Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.Genetics 131: 479-491.
- FEINGOLD, S., LLOYD, J., NORERO, N., BONIERBALE, M. and LORENZEN, J.2005.Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.).Theor. Appl. Genet. 111: 456-466.
- FERDINANDEZ, Y.S. and COULMAN, B.E.2002.Evaluating genetic variation and relationships among two bromegrass species and their hybrid using RAPD and AFLP markers.Euphytica 125: 281-291.
- GIECO, L. 2002.Caracterización genética y agronómica de genotipos de cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.) con morfotipos diferentes para delinear criterios de selección. Tesis Maestría en Genética Vegetal.Facultad Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario

<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Docencia/escgraduados/cursos/maestrias/7.htm> [consulta: 01/09/2006].

- GILLET, M.1984.Las gramíneas forrajeras.ACRIBIA, Zaragoza, España.pp 11-232.
- GOROSTEGUI, J.1971.Variedades vegetales del INTA.Cultivares creados o introducidos desde 1958. Ministerio de agricultura y Ganadería de la Nación.Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.pp 137-138.
- GOULÃO, L., VALDIVIESO, T., SANTANA, C. and MONIZ OLIVEIRA, C.2001.Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.).Genet. Resour. Crop Ev. 48: 329-338.
- GRANT, S.A., BARTHAM, G.T. and TORVELL, L.1981.Components of regrowth in grazed and cut *Lolium perenne* swards.Grass Forage Sci. 36: 155-168.
- GUMA, I.R. and ALONSO S.I.1997.Germination and seedling growth in *Elitrigia scabrifolia* and *E. scabriglumis*.Seed Sci. Technol. 25: 343-350.
- GUMA, I.R., PEREZ DE LA VEGA, M. and GARCÍA, P.2006.Isozyme variation and genetic structure of populations of *Avena barbata* from Argentina.Genet. Resour. Crop Ev. 53: 587-601.
- GUTIÉRREZ, H.F. y PENSIERO, J.F.1998.Sinopsis de las especies argentinas del género *Bromus* (*Poaceae*).Darwiniana. 35: 75-114.
- HAYMES, H.1996.Mini-prep method suitable for plant breeding program.Plant Mol. Biol. Rep. 14(3):280-284.
- HORMAZA, J.2002.Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats.Theor. Appl. Genet. 104: 321-328
- INASE.2006.Agropiro alargado "RAYO INTA-FCA". Resol. INASE 18/10/06, Exp. 0127612/06. Inscryp.Reg. Nac. de la Propiedad de Cultivares nº2231.
- JACCARD, P.1908.Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 44:223-270.
- JAIN, S., MARSHALL, D. and WU, K.1970.Genetic variability in natural populations of softchess (*Bromus mollis* L.).Evolution 24: 649-659.
- JAIN, S.K.1975.Population structure and the effects of breeding system. In: Frankel, O.H. and Hawkes, J.G.Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge University Press.Cambridge, England.pp. 15-36.
- KARP, A.; KRESOVICH, S.; BAHT, K.V.; AYARD, W.G. and HODGKIN, T.1997.Molecular tools in plant resources conservation.IPGRI.47 p.Technical Bulletin nº2.
- LEMAIRE, G. and CHAPMAN, D.1996.Tissue flows in grazed plants communities.*In*: Hodgson. J.; Illius, A.W. ed.The Ecology and Management of Grazing.CAB International.pp. 3-35.

- MADDALONI, J. y FERRARI, L.2001.Forrajeras y pasturas del ecosistema Templado Húmedo de la Argentina.Universidad Nacional de Lomas de Zamora.Facultad Ciencias Agrarias.Buenos Aires.520 p.
- MANTEL, N.1967.The detection of disease clustering and generalized regression approach.Cancer Res. 27: 209-220.
- MARIOTTI, J.1986.Fundamentos de genética biométrica.Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal.OEA.Washington, DC.152 p.Serie de Biología, Monografía n°32.
- MARSHALL, D.R. and BROWN, A.H.D.1975.Optimum sampling strategies in genetic conservation.In: O.H. Frankel and J.G.Hawkes eds.Crop Genetic resources for today and tomorrow.Cambridge Univ. Press.Cambridge, England.pp 53-80.
- MARZOCCA, A.1994.Guía descriptiva de malezas del Cono Sur.INTA, Buenos Aires, Argentina.295 p.
- MASSA, A.N.; JENSEN, K.B., LARSON, S.R. and HOLE, D.J.2004.Morphological variation in *Bromus* sect. *Ceratochloa* germplasm of Patagonia.Can.J. Bot. 82:136-144.
- MASSA, A.N.; LARSON, S.R.; JENSEN, K.B. and HOLE, D.J.2001.AFLP variation in *Bromus* Section *Ceratochloa* Germplasm of Patagonia.Crop Sci. 41:1609-1616.
- MATTHEI, O.1986.El género *Bromus* L. (Poaceae) en Chile.Gayana Bot.43:47-110.
- MAZZANTI, A., CASTAÑO, J., SEVILLA, G.H.; ORBCA, J. L.1992.Características agronomicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la provincia de Buenos Aires.Manual de descripción. CERBAS, INTA. Balcarce, Buenos Aires.pp 36-38.
- MILBOURNE, D.; MEYER, R.; BRADSHAW, J.; BAIRD, E., BONAR, N.; PROVAN, J.; POWELL W. and WAUGH, R.1997.Comparison of PCR- based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato.Mol. Breeding 3:127-136.
- MILLOT, J.C.1969.Mejoramiento de gramíneas forrajeras. En: Reunión Técnica: Producción y Conservación de Forraje.La Estanzuela, Colonia, Plan Agropecuario.pp 101-110.
- MORELLO, J. y MATTEUCCI, S.D.1999.Biodiversidad y fragmentación de los bosques en la Argentina.En: MATTEUCCI, S.D., SOLBRIG, O.T., MORELLO, J. y HALFFTER, G. Biodiversidad y uso de la tierra.Conceptos y ejemplos de Latinoamérica.Eudeba, Buenos Aires.pp 463-498.
- NARANJO, C. A.1985.Estudios citogenéticas, bioquímicos y sistemáticos en algunas especies americanas del genero *Bromus* (Gramineae).Tesis de doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.Universidad de Buenos Aires.243 p.
- NARANJO, C.A.1992.Estudios biosistemáticos en especies de *Bromus* (Sección *Ceratochloa*, *Poaceae*). I. Sistemas reproductivos y barreras de aislamiento.Darwiniana 31(1-4):173-183.
- NELSON, C.J., ASAY, K.H. and SLEEPER, D.A.1977.Mechanism of canopy development of tall fescue genotypes.Crop Sci. 17: 449-452.

- NICORA, E.G. y RÚGOLO DE AGRASAR, Z.1987.Los géneros de gramíneas de America del Sur.Hemisferio Sur.611 p.
- NUEZ, F. y CARRILLO, J. M.2000.Los marcadores genéticos en la mejora vegetal.Sociedad española de genética.Sociedad Española de Ciencias Hortícolas.Universidad Politécnica de Valencia.U.P.V.Valencia.579 p.
- OJA, T.2002.Genetic divergent and interspecific differentiation in the *Bromus madritensis* complex (*Poaceae*) based on isozyme data.Biochem. Syst. Ecol. 30: 433-449.
- PAGANO, E. y RIMIERY, P.1989.Genética y mejoramiento de especies forrajeras. En: Forrajeras y pasturas del ecosistema Templado Húmedo de la Argentina.Maddaloni, J y L. Ferrari ed.Universidad Nacional de Lomas de Zamora.Facultad Ciencias Agrarias.Buenos Aires.520 p.
- PERCAZ, J.C.; MAZA, A.; ZAPPE, A. y BUCKI, P.2000.Evaluación forrajera preliminar de germoplasma de *Bromus* de diversos orígenes.Dialogo LV: Avances de Investigación en Recursos Genéticos en el Cono Sur.pp 109-113.
- PUECHER, D., ROBREDO, C., PAGANO, E., RIMIERY, P. y RIOS, R.2001a.Evaluación de la variabilidad genética en poblaciones naturales de cebadilla criolla a través de RAPD.4° Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO (Goiania, 2001, jun 4-8).<[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/03/03\\_020.htm](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03_020.htm)> [consulta: 17/12/2004].
- PUECHER, D.; ROBREDO, C.; RÍOS, R. and RIMIERY, P.2001b.Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl.Populations and cultivars with RAPD and AFLP markers.Euphytica 121:229-236.
- PUJOL PALOL, M.1998.Gramíneas.Aplicaciones Agronómicas.Politex 67.Ediciones UPC, Universitat Politecnica de Catalunya, España.219 p.
- RAKER, C. and SPOONER, D.2002.Chilean tetraploid cultivated potato *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data.Crop Sci. 42:1451-1458-
- RAM, A, ZACCAI, M.; PASTERNAK, D. and BUSTAN, A.2004.Análisis of phenotypic and genetic polymorphism among accessions of saltgrass (*Distichlis spicata*).Genet. Resour. Crop Ev. 51:687-699.
- RAMAKRISHNAN, A., MEYER, S., WATERS, J., STEVENS, M., COLEMAN, C. and FAIRBANKS, D.2004.Correlation between molecular markers and adaptively significant genetic variation in *Bromus tectorum* (*Poaceae*), an inbreeding annual grass.Am. J. Bot. 91 (6):797-803.
- RIVAS, M.2001a.El cultivar "Potrillo" de *Bromus auleticus* Trinius ex Nees. Dialogo LVI: Los Recursos Fitogénéticos del Género *Bromus* en el Cono Sur.pp 105-108.
- RIVAS, M.2001b.Modo de reproducción y estructura genética de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinius ex Nees (*Poaceae*). I. Biología reproductiva y variación fenotípica. Dialogo LVI: Los Recursos Fitogénéticos del Género *Bromus* en el Cono Sur.pp 45-49.

- RIVAS, M.2001c.Sistema reproductivo y estructura genética de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinius ex Ness (*Poaceae*).Estudio mediante isoenzimas.Agrociencia 5(1):32-40.
- RIVAS, M.; PINTO OLIVEIRA, J.C.2001.Dialogo LVI: Los Recursos Fitogenéticos del Género *Bromus* en el Cono Sur. p 1.
- RODRÍGUEZ, J.A.1981.Conceptos para el mejoramiento de especies forrajeras.12° Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Genética (Salta, 1981, oct).19 p.
- ROHLF, F.J.2000.Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System NTSYS-pc.Versión 2.1.Esxeter Software.New York, United States.44 p.
- ROSENGURTT, B., ARRILLAGA DE MAFFEI, B.R. e IZAGUIRRE DE ARTUCIO, P.1970.Gramíneas Uruguayas.Universidad de la República.Montevideo, Uruguay.490 p.
- ROSSO, B.S.1989.Recursos genéticos de especies forrajeras templadas.En: Forrajeras y pasturas del ecosistema Templado Húmedo de la Argentina. Maddaloni, J. y L. Ferrari ed.Universidad Nacional de Lomas de Zamora.Facultad Ciencias Agrarias.Buenos Aires.pp 389-394
- ROSSO, B.S.2001.Colecta y caracterización de cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.)en la región central de Argentina.Dialogo LVI: Los Recursos Fitogenéticos del Género *Bromus* en el Cono Sur.pp 99-101.
- RUIZ, M.; CARRILLO, J.M. and VARELA, F.1997.Relationships between some geographical parameters and agro/morphological and biochemical characters in a simple of Spanish landraces of barley (*Hordeum vulgare* L.).Plant Genet. Resour. Newsl 112:86-89.
- RUIZ, M.A.; ADEMA, E.O. y RUCCI, T.2004.Gramíneas de invierno: producción y calidad de forraje en diferentes ambientes del Caldenal. INTA, EEA Anguil. Capítulo 5.Investigación en Producción Animal 2002-2003.Región subhúmeda y semiárida pampeana.pp 25-31.Boletín n°79.
- RUIZ, M.A.; COVAS, G.F. y BABINEC, F.J.1997.Dormición de la semilla de tres especies de *Bromus*.RIA. 28 (1): 37-46.
- RUIZ, M.A.; ERNST, R.D.; COVAS, G.F. y BABINEC, F.J.1995.Variabilidad en *Bromus brevis* Ness. (Cebadilla pampeana).Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam. 8(2):11-20.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. and EXCOFFIER, L.2000.Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data análisis.Genetics and Biometry Laboratory,University of Geneva, Suiza.111 p.
- SCHULTZE-KRAFT, R.1990.Caracterización y evaluación preliminar de germoplasma de plantas forrajeras.En: Puignau, J.Dialogo XXVIII: Introducción, Conservación y Evaluación de Germoplasma Forrajero en el Cono Sur.IICA.PROCISUR.pp 319-326.
- SEGUEL, I., ORTEGA, F., ROMERO, O. y MATTHEI, O.2001.Regeneración y caracterización de *Bromus* sp. en Chile.Dialogo LVI: Los Recursos Fitogenéticos del Género *Bromus* en el Cono Sur.IICA.PROCISUR.pp 19-27.

- SELLARO R., PAGANO E., ROSSO B., RIMIERI P. y RÍOS, R.2003.Aplicación de marcadores moleculares al estudio de la variabilidad genética en el género *Bromus* (*Poaceae*). I. Análisis mediante RAPD.4° SIRGEALC (Mar del Plata, 2003, nov 10-14).p 132.
- SMITH, P.M.1970.Taxonomy and nomenclature of the Brome-grasses (*Bromus* L.).Notes Roy. Bot. Gard. Edimburgh 30:361-375.
- SPOONER, D., VAN TREUREN, R. and DE VICENTE, M.C.2005.Molecular markers for genebank management.IPGRI, Roma, Italia.126 p.Technical Bulletin N°10.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM.2001.SAS/STAT user's guide.Version 8.2.Cary, Carolina del Norte.373 p.
- STEBBINS, G.L.1981.Chromosome and evolution in the genus *Bromus* (*Gramineae*).Bot. Jahrb. Syst. 102:359-379.
- STEEL, R.G.D. and TORRIE, J.H.1980.Principles and procedures of Statistics.MacGraw Hill Book Co; New York, United States.633 p.
- STEWART, A.V.1996.Potencial value of some *Bromus* species of the section *Ceratochloa*.New Zeal. J. Agr. Res. 39: 611-618.
- SUGIYAMA, S., YONEYAMA, M., TAKAHASHI, N. and GOTOH, K.1985.Canopy structure and productivity of *Festuca arundinacea* Schreb. swards during vegetative and reproductive growth.Grass Forage Sci. 40:49-55.
- TOLEDO, J. y THOMAS, D.1990.Evaluación agronómica de forrajeras: principios y práctica.Dialogo XXVIII: Introducción, conservación y evaluación de germoplasma forrajero en el cono Sur.IICA.PROCISUR.pp 327-336.
- TRAVERSO, J.E.2001.Colecta, conservación y utilización de recursos genéticos de interés forrajero nativo y naturalizado. *Bromus auleticus* Trin. ex Ness (Cebadilla chaqueña). Dialogo LVI: Los Recursos Fitogénéticos del Género *Bromus* en el Cono Sur.IICA.PROCISUR.pp 7-18.
- TRAVERSO, J.E. y VON DER PAHLEN, A.1982.Variabilidad en *Bromus auleticus* (Trin. ex Ness.).INTA, EEA Pergamino.12 p.Publicación Técnica n°41.
- TRAVERSO, J.E.; TROIANI, H. y BABINEC, F.J.2005.Colección y conservación de las especies forrajeras nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa.INTA, EEA Anguil. 20 p.Publicación Técnica n°63.
- TYLER, B.F., CHORLTON, K.H. and THOMAS, I.D.1987.Collection and field sampling techniques for forages.In: Tyler, B.F. ed.Collection, characterization and utilization of genetic resources of temperate forage grass and clover.IBPGR Training courses: Lecture Series 1. IBPGR, Rome.69 p.
- TYLER, B.F.; HAYES, J.D. and ELLIS DAVIES, W.1985.Descriptor for forage grasses.International Board For Plant Genetic Resources.Commission of European Communities: Committee on disease resistance breeding and use of genebanks. IBGPR Secretariat, Rome.30 p.

- URSLA, F.W.M., HAYWARD, M.D. and KEARSEY, M.J.1997.Isozyme and quantitative traits polymorphisms in European provenances of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.).*Euphytica* 93:263-269.
- VAN DE WOUW, M., HANSON, J. and NOKOE, S.1999.Observation strategies for morphological characterization of forages.*Genet. Resour. Crop. Ev.* 46:63-71.
- VERONESI, F. and FALCINELLI, M.1988.Evaluation of an Italian germplasm collection of *Festuca arundinacea* Schreb. through a multivariate analysis.*Euphytica* 38:211-220.
- VIVERO VIDAL, J.L.1979.Iniciación a la mejora genética del ray-gras italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) para crecimiento invernal.*An. INIA/Secr. Prod. Vegetal/N.* 10:23-37.
- WHITEHEAD, D.C.1995.Grassland Nitrogen.CAB International.Oxon, United Kingdom.397 p.
- WU, K. and JAIN, S.1978.Genetic and plastic responses in geographic differentiation of *Bromus rubens* populations.*Can. J. Bot.* 56:873-879.
- WUNSCH, A. and HORMAZA, J.I.2002.Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch ] SSR sequences.*Heredity* 89: 56-63.
- YANAKA, F., DALL'AGNOL, M., SCHIFINO-WITTMANN, M., MENNA BARRETO DÍAS, P. and ELLERA GOMES, K.2005.Genetic variability in natural populations of *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) using isozymes and RAPD markers.*R. Bras. Zootec.* 4(6):1897-1904.
- ZOMLEFER, W. B.1994.Flowering Plant Families.Chapel Hill NC.University of North Carolina Press.430 p.
- ZULOAGA, F.O., NICORA, E.G., RÚGOLO DE AGRASAR, Z.E., MORRONE, O., PENSIERO, J.F. y CIALDELLA, A.M.1994.Catálogo de la familia *Poaceae* en la República Argentina. Monogr. in *Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 47:1-178.

## APÉNDICE

Tabla I Distritos agroclimáticos (DA) de los sitios en que fueron colectadas las poblaciones y características climáticas de los mismos: altura sobre el nivel del mar (ASNM), temperatura (T°) media de mes más caluroso y del más frío, precipitación (ppt) anual y de los trimestres más calurosos y más fríos, y precipitación en el semestre restante (De Fina, 1992).

Entrada	DA	ASNM (metros)	T° media		Precipitación media			% ppt Sem restante
			Mes + caluroso	Mes + frío	Anual	Trim + caluroso	Trim + frío	
CI1020	51	133	24,6	7,4	262	59	52	134
N5225	109	910	21,6	5,1	268	85	38	118
CI1016	71	47	23,3	7,1	454	128	58	145
CI1014	99	19	21,9	7	511	140	66	148
N5231	75 A	687	22,8	5,9	278	100	24	123
N5226	109	910	21,6	5,1	268	85	38	118
N5313	72 A	180	24,1	6,9	370	113	41	140
CI1028	51	78	24,1	6,9	344	92	44	153
N5228	109	910	21,6	5,1	268	85	38	118
N5229	75 A	687	22,8	5,9	278	100	24	123
CI1012	99	19	21,9	7	511	140	66	148
N5222	48	302	24,3	7,7	498	176	44	126
CI996	99	113	20,3	7	620	162	92	144
CIA1063	107	285	21	6,1	615	173	70	153
CI1034	98	253	20,7	6,4	705	201	108	128
CI1033	121	24	19,7	8,1	768	207	161	109
CI1031	99	19	21,9	7	511	140	66	148
CI1022	81	204	22,3	5,6	178	48	39	105
CI1029	72 A	102	23,8	6,8	363	102	45	147
N5248	138	1012	19,6	4,2	161	27	58	92
N5319	75 A	500	22,5	5,8	197	56	35	117
N5320	75 A	500	22,5	5,8	197	56	35	117
Testigo	38	102	24,3	8,2	681	230	70	127

Tabla II: Secuencias de marcadores (M) de tipo SSR utilizados ("forward" y "reverse") y peso molecular (PM) de los productos de amplificación.

M	forward primer (3'-5')	reverse primer (5'-3')	PM
<i>Bt03</i>	GCATGTCCACCTCCATGGCCACGCC	CTGTCTTCCTCCCTCCCTCACTTGTGTTCC	112-114
<i>Bt04</i>	ACAGAGCTACCTATCTATGTGCAA	GGTATGTTACCATGTTGCTTCC	114-117
<i>Bt05</i>	GGGAAAGCAAGCCGTTTCCGCGTTG	CGGTGGACGACGGGAAAGCGGAGCA	167-178
<i>Bt12</i>	ATATTGTGGTGGCCAGTGC	GAAAAGAAAATGAAACACCTTGC	252-262
<i>Bt26</i>	ATCCGTCCCTCTTTCTTTGCGCTGC	GGAGGAAGAAGAATGACCGAGAGAG	152-156
<i>Bt30</i>	GCCACTTTTTTTCCGAACAGACACC	AAAAGCAGAGTGCAGATGTAAATGAAATT	114-118
<i>Bt33</i>	CTGCTATATCATGAGGCCATTGGGA	AGTTTGTACAGCAGCCTGAGGCATG	221-223

Tabla III: Caracteres morfoagronómicos cuantitativos utilizados para realizar el análisis multivariado de las poblaciones. El asterisco indica las variables complementarias medidas por otros investigadores del grupo de trabajo

N°	Carácter	
1	Ancho foliar en estadio de plántula	*
2	Longitud foliar en estadio de plántula	*
3	Número de macollos en el estadio de plántula	*
4	Longitud de gluma inferior	
5	Longitud de gluma superior	
6	Longitud de la lemma	
7	Longitud de la arista de la lemma	
8	Longitud del pedicelo	
9	Ancho del cariopse	
10	Emergencia inicial (primera multiplicación de semilla original)	
11	Emergencia final (primera multiplicación de semilla original)	
12	Índice de emergencia (primera multiplicación de semilla original)	
13	Ancho foliar en estadio vegetativo	*
14	Longitud foliar en estadio vegetativo	*
15	Número de macollos en el estadio vegetativo en la primera fecha	
16	Número de macollos en el estadio vegetativo en la segunda fecha	
17	Número de macollos reproductivos	
18	Prolificidad	
19	Longitud foliar en la fecha 1	
20	Longitud foliar en la fecha 2	
21	Longitud foliar en la fecha 3	
22	Longitud foliar de la hoja bandera	
23	Altura del canopeo	
24	Altura total	
25	Longitud de la panoja	
26	Materia seca en el corte 1	
27	Materia seca acumulada	
28	Energía germinativa	
29	Índice de emergencia (de semilla cosechada de las plantas caracterizadas)	*
30	Emergencia inicial (de semilla cosechada de las plantas caracterizadas)	*
31	Emergencia final (de semilla cosechada de las plantas caracterizadas)	*

Tabla IV: Presencia (1) o ausencia (0) de pubescencia en las glumas y la lemma

Población	Pelos cortos en el dorso de la gluma	Pelos cortos en dorso, nervaduras y borde de la gluma	Pelos cortos y ralos en la lemma	Pelos largos y densos en la lemma
CI996	0	1	0	1
CI1012	1	0	1	0
CI1014	0	0	1	0
CI1016	0	0	1	0
CI1031	1	0	1	0
CI1033	1	0	1	0
CIA1063	1	0	1	0
CI1020	0	0	0	1
CI1022	0	1	1	1
CI1028	1	0	1	0
CI1029	1	0	1	0
N5222	1	0	1	0
N5225	1	0	0	1
N5226	0	0	1	0
N5229	0	0	1	1
N5231	1	0	1	1
N5313	1	0	1	0
N5319	0	0	0	1
N5320	0	1	0	1
N5248	1	0	1	0
Testigo	1	0	1	0

Tabla V: Promedios poblacionales para longitud (L) y ancho de las estructuras de la espiguilla y el cariopse. Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	L gluma inferior (mm)	L gluma superior (mm)	L Lemma (mm)	L Arista (mm)	L Pedicelo (mm)	Ancho cariopse (mm)
CI996	6,12 fghi	7,48 ghij	8,52 i	0,30 defgh	5,86 bcdef	1,9,80
CI1012	7,10 cdefgh	9,56 abcd	12,04 b	0,38 cde	7,90 abcd	2,00 cd
CI1014	7,82 bcd	9,62 abc	11,22 bcd	0,34 def	8,08 abc	1,96 def
CI1016	6,52 defghi	7,82 efghij	10,12 defg	0,32 defg	7,74 abcd	1,98 de
CI1031	7,50 bcde	8,98 bcde	9,96 defgh	0,18 gh	6,56 bcde	2,02 cd
CI1033	9,43 a	10,13 ab	11,80 bc	0,33 defg	6,38 bcdef	1,97 def
CIA1063	5,74 l	6,72 j	8,60 hi	0,26 efgh	4,98 cdef	1,74 f
CI1020	6,44 efghi	7,66 fghij	9,14 fghi	0,44 bcd	9,76 a	1,76 ef
CI1022	5,90 ghi	7,12 hij	8,74 ghi	0,22 fgh	4,36 ef	1,98 de
CI1028	6,28 efghi	7,46 ghij	9,14 fghi	0,26 efgh	6,50 bcde	1,96 def
CI1029	7,88 bc	8,50 cdefg	10,60 cde	0,18 gh	4,80 def	2,08 cd
N5222	6,92 cdefghi	8,36 defgh	10,18 def	0,44 bcd	8,86 ab	2,18 bcd
N5225	6,68 cdefghi	8,04 efghi	10,66 bcde	0,34 def	5,38 cdef	2,40 ab
N5226	6,08 fghi	7,04 ij	10,28 def	0,56 ab	3,32 f	2,04 cd
N5229	7,28 cdef	8,84 cdef	11,36 bcd	0,50 bc	7,24 abcde	2,42 a
N5231	6,68 cdefghi	7,74 efghij	10,20 def	0,34 def	7,00 abcde	2,12 cd
N5313	5,78 hi	7,64 fghij	9,46 efghi	0,36 cdef	6,40 bcdef	2,00 cd
N5319	7,50 bcde	8,38 cdefg	10,62 bcde	0,28 efgh	7,46 abcde	2,22 abc
N5320	7,22 cdefg	8,20 efghi	9,96 defgh	0,28 efgh	6,44 bcdef	2,10 cd
N5248	7,48 bcde	8,70 cdefg	11,14 bcd	0,16 h	5,08 cdef	2,44 a
Testigo	8,76 ab	10,60 a	16,14 a	0,68 a	7,22 abcde	2,38 ab
Media gral	6,98	8,3	10,46	0,34	6,54	2,08
Valor p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0188	< 0,0001
Dms	1,379	1,2764	1,4571	0,1541	3,1381	0,2389
CV %	15,6	12,1	11,01	35,7	37,9	9,07

Tabla VI: Promedios poblacionales para caracteres relacionados con la emergencia de plántulas. Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	Emergencia inicial (%)	Emergencia final (%)	Índice de emergencia (días)
CI996	76,00 a	90,00 a	13,22 bcde
CI1012	32,00 efg	64,00 cd	15,15 abcd
CI1014	35,00 cdef	68,00 bcd	16,58 abc
CI1016	16,00 h	65,00 cd	15,22abcd
CI1031	42,00 bcde	70,00 bcd	13,84 bcde
CI1033	22,40 fgh	64,80 cd	16,81 ab
CIA1063	42,67 bcde	78,67 abc	15,10abcd
CI1020	48 bcd	68,00 bcd	12,61 de
CI1022	22,00 fgh	37,00 e	12,86 cde
CI1028	46 bcde	63,00 d	13,77 bcde
CI1029	53,00 b	68,00 bcd	10,52 e
N5222	39 bcde	74,00 bcd	13,44 bcde
N5225	12,00 h	36,00 e	13,39 bcde
N5226	18,00 gh	59,00 d	14,57 bcd
N5229	22,00 fgh	62,00 d	15,91 abcd
N5231	50,00 bc	69,00 bcd	13,14 bcde
N5313	46 bcde	82,00 ab	13,38 bcde
N5319	34,00 def	72,00 bcd	13,35 bcde
N5320	18,00 gh	39,00 e	13,15 bcde
N5248	48 bcd	62,00 d	12,87 cde
Testigo	12 h	82,00 ab	18,46 a
Media gral	34,71	65,24	16,81
Valor p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
D.M.S	15,35	15,6	3,78
C.V. %	31,17	16,86	18,89

Tabla VII: Promedios poblacionales para el tamaño foliar de las plántulas. Las poblaciones marcadas con ★ presentan área foliar superior a 1,7 cm<sup>2</sup>. Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	Longitud foliar (cm)	Ancho foliar (mm)
CI996	10,08 gh	2,48 k
CI1012 ★	11,78 abcde	3,3 cd
CI1014 ★	11,76 abcde	3,10 defg
CI1016	10,05 gh	3,25 cde
CI1031 ★	11,44 bcdef	3,07 defgh
CI1033 ★	12,47 ab	4,08 b
CIA1063	11,63 abcde	2,91 fghi
CI1020 ★	11,99 abcd	2,99 efghi
CI1022	10,27 fgh	2,90 fghi
CI1028	10,63 efgh	2,96 efghi
CI1029	10,01 gh	2,97 efghi
N5222	9,42 h	3,20 cdef
N5225 ★	12,21 abc	2,97 efghi
N5226	11,05 cdefg	2,55 jk
N5229	10,62 efgh	3,02 defghi
N5231 ★	12,85 a	2,77 ijk
N5313	10,65 defgh	2,79 hij
N5319 ★	12,03 abc	2,87 ghi
N5320 ★	12,81 a	3,5 c
N5248	9,72 gh	3,11 defg
Testigo	10,23 fgh	5,35 a
Media gral	11,13	3,15
Valor p	< 0,0001	< 0,0001
D.M.S	1,33	0,30
C.V. %	16,27	13,36

Tabla VIII: Longitud foliar en diferentes fecha (F) y longitud de la hoja bandera.

Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	Long. foliar F1 (cm)	Long. Foliar F2 (cm)	Long. Foliar F3 (cm)	Long. H. bandera (cm)
CI996	9,36	15,02 bcde	18,22 cdefg	15,33 cdefg
CI1012	10,35	16,01 abc	19,04 bcde	15,41 cdef
CI1014	9,30	13,84 bcde	15,32 h	11,90 gh
CI1016	10,75	16,32 ab	20,37 bc	17,91 abc
CI1031	9,68	14,86 bcde	19,53 bcd	14,34 defg
CI1033	8,67 cd	12,28 e	15,59 h	13,66 efg
CIA1063	9,55	16,02 abc	20,33 bc	17,37 abcd
CI1020	12,24	16,08 abc	18,10 cdefg	9,90 h
CI1022	11,68	15,28 bcd	20,98 ab	13,84 efg
CI1028	8,68	13,27 cde	17,38 defgh	14,77 cdefg
CI1029	8,34	13,68 bcde	17,31 defgh	14,99 cdefg
N5222	6,90	12,27 e	16,10 fgh	16,68 bcde
N5225	8,85	13,43 cde	15,91 gh	13,04 fgh
N5226	9,06	14,95 bcde	19,54 bcd	19,36 ab
N5229	10,00	15,76 abc	20,12 bc	19,47 ab
N5231	9,41	14,41 bcde	18,88 bcde	15,53 cdef
N5313	9,61	16,12 abc	19,81 bcd	19,21 ab
N5319	10,79	15,46 bcd	18,54 bcdef	14,33 defg
N5320	10,85	15,02 bcde	19,08 bcde	14,07 defg
N5248	8,21	12,74 de	16,85 efgh	13,29 efgh
Testigo	10,35	18,54 a	23,03 a	20,84 a
Media gral	9,61	14,84	18,57	15,64
Valor p	0,081	0,0066	< 0,0001	< 0,0001
Dms	2,825	2,85	2,51	3,47
CV %	17	11	7,9	12,8

Tabla IX: Número de macollos vegetativos (Veget) en el estadio de plántula y en dos fechas y macollos reproductivos (Repr.), totales y prolificidad en fecha 2. Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	Plántula	Veget F1	Veget. F2	Repr. F2	Total F2	Prolificidad
CI996	3,33 efgh	19,14 ab	7,14 b	33,64 a	40,786 a	0,838 bcde
CI1012	4,13 bc	18,64 abc	3,93 fghij	32,36 ab	36,29 ab	0,886 ab
CI1014	3,27 efgh	10,00 ghi	5,07bcdefg	14,50 jkl	19,57 fg	0,767 efg
CI1016	4,33 bc	14,73 def	7,40 b	19,53 fghij	26,93 cde	0,735 fg
CI1031	3,80 cde	17,20 abcd	4,53 defgh	30,87 abc	35,40 ab	0,877 abc
CI1033	3,80 cde	10,60 ghi	6,67 bcde	20,80fgh	27,47 cde	0,770 efg
CIA1063	3,27 efgh	19,8 a	11,87 a	28,20 bcd	40,07 a	0,723 g
CI1020	3,00 fgh	7,86 ij	1,29 k	10,93 kl	12,21 h	0,891 ab
CI1022	4,6 b	18,80 ab	5,50 bcdef	26,10 cde	31,60 bc	0,830 bcde
CI1028	3,07 fgh	13,00 efg	4,80cdefgh	20,07 fghi	24,87 def	0,806 cdef
CI1029	4,00 bcd	13,00 efg	6,60 bcde	21,07 efgh	27,67 cde	0,787 defg
N5222	6,2 a	15,36 cde	6,79 bcd	23,57 def	30,36 bcd	0,777 defg
N5225	3,40 defg	11,00 ghi	2,60 ghijk	16,30 hij	18,90 fg	0,882 abc
N5226	2,20 i	16,08 bcde	4,42 defgh	15,17 ijk	19,58 fg	0,770 efg
N5229	2,80 ghi	15,08 de	4,14 efghi	18,29 ghij	22,43 efg	0,826 bcde
N5231	3,47 def	11,07 ghi	4,80cdefgh	17,53 hij	22,33 efg	0,789 defg
N5313	3,13 fgh	17,07 abcd	5,47 bcdef	23,07 defg	28,53 cde	0,806 cdef
N5319	3,20 efgh	8,93 hij	1,40 jk	17,40 hij	18,80 fg	0,919 a
N5320	4,27 bc	11,50 fgh	2,30 hijk	14,90 ijkl	17,20 gh	0,866 abc
N5248	2,73 hi	11,40 gh	6,20 bcdef	18,40 fghij	24,60 def	0,746 fg
Testigo	2,38 i	6,00 j	1,80 ijk	9,87 l	11,67 h	0,849 abcd
Media gral	3,54	13,58	5,07	20,7	25,77	0,814
Valor p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Dms	0,62	5,75	2,93	6,8	8,45	0,08
CV %	23,63	27,06	65,15	31,47	31,57	12,42

Tabla X: Altura total, hasta la hoja bandera y hasta el canopeo. Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	Altura total	Alt h hoja band	Alt h follaje
CIA 996	97,86 abc	41,83 defg	14,98 ab
CIA 1012	100,65 ab	44,09 bcde	14,76 ab
CIA 1014	94,25 abcd	41,12 defg	12,05 cdef
CIA 1016	108,39 a	51,02 ab	15,15 ab
CIA 1031	95,43 abcd	40,62 defg	14,7 ab
CIA 1033	82,93 cd	35,52 fgh	14,05 bcd
CIA 1063	108,93 a	53,08 a	16,78 a
CIA 1020	90,58 bcd	29,11 h	9,8 f
CIA 1022	92,16 abcd	42,29 cdef	16,87 a
CIA 1028	90,14 bcd	39,88 defg	13,38 bcde
CIA 1029	95,31abcd	37,74 efg	15,05 ab
Nº 5222	100,44 ab	41,32 defg	13,78 bcd
Nº 5225	91,93 abcd	38,83 defg	12,05 cdef
Nº 5226	108,37 a	54,08 a	14,83 ab
Nº 5229	105,54 ab	50,61 abc	14,41 abc
Nº 5231	98,57 abc	46,79 abcd	11,65 def
Nº 5313	101,41 ab	41,15 defg	15,42 ab
Nº 5319	93,41 abcd	40,73 defg	15,08 ab
Nº 5320	93,32 abcd	51,27 ab	11,1 ef
Nº 5248	78,66 d	33,75 gh	13,02 bcde
Testigo	101,05 ab	45,99 abcde	13,45 bcde
Media gral	96,84	42,83	13,95
Valor p	0,0673	< 0,0001	0,0003
Dms	17,44	8,51	2,64
CV %	10,5	11,6	11,04

Tabla XI: Materia seca (MS) por planta en dos fechas (F1 y F2) y acumulada, y peso de los macollos (PM) en F1 y F2. Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	MS F1 (g)	MS F2 (g)	MS Acumulada (g)	PM F1 (g)	PM F2 (g)
CIA 996	16,03 ab	109,53	125,57 ab	0,84	2,69
CIA 1012	13,88 abcd	134,13	148,02 a	0,74	3,7
CIA 1014	9,2 bcdefg	74,3	83,5 bcde	0,92	3,8
CIA 1016	13,17 bcde	76,34	89,51 abcde	0,89	2,83
CIA 1031	12,43 bcdef	99,47	111,9 abc	0,72	2,81
CIA 1033	3,77 g	67,49	71,26 bcde	0,36	2,46
CIA 1063	15 abc	102,87	117,87 ab	0,76	2,57
CIA 1020	7,83 cdefg	20,58	28,42 e	1,00	1,69
CIA 1022	21,13 a	127,57	148,70 a	1,12	4,04
CIA 1028	9,3 bcdefg	95,97	105,27 abc	0,72	3,86
CIA 1029	8,98 bcdefg	64,88	73,85 bcde	0,69	2,34
Nº 5222	8,23 cdefg	79,8	88,03 abcde	0,54	2,63
Nº 5225	6,05 efg	55,5	61,55 bcde	0,55	2,94
Nº 5226	6,09 efg	63,44	69,54 bcde	0,38	3,24
Nº 5229	8,13 cdefg	59,99	68,12 bcde	0,54	2,67
Nº 5231	7,9 cdefg	95,03	102,93 abc	0,71	4,26
Nº 5313	7,57 cdefg	64,85	72,42 bcde	0,44	2,27
Nº 5319	4,9 fg	45,5	49,4 cde	0,55	2,42
Nº 5320	7,05 defg	64,5	69,20 bcde	0,61	3,75
Nº 5248	6,4 defg	62,63	69,03 bcde	0,56	2,55
Testigo	8,8 bcdefg	91,4	100,2 abcd	1,47	7,83
Media gral.	11,11	78,98	86,73	0,72	3,21
Valor p	0,014	0,052	0,034		
Dms	7,77	57,61	62,03		
CV %	47,7	43,55	41,87		

Tabla XII: Número de cariopses por espiguilla, de espiguillas por panoja y longitud de la panoja, Letras iguales dentro de cada columna indican diferencias no significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Población	Nº cariopses/espig	Nº espig/panoja	Long. panoja
CIA 996	7,79 abcde	20,17 defgh	97,86 abc
CIA 1012	6,88 de	18,63 efghi	100,65 ab
CIA 1014	7,90 abcd	17,23 ghij	94,25 abcd
CIA 1016	7,29 bcde	26,67 bc	108,39 a
CIA 1031	7,85 abcde	24,07 bcdef	95,43 abcd
CIA 1033	7,70 bcde	26,33 bc	82,93 cd
CIA 1063	7,93 abcd	29,13 b	108,93 a
CIA 1020	7,16 bcde	11,27 j	90,58 bcd
CIA 1022	6,91 cde	27,57 bc	92,16 abcd
CIA 1028	7,52 bcde	22,67 cdefg	90,14 bcd
CIA 1029	8,41 ab	24,30 bcde	95,31 abcd
Nº 5222	6,95 cde	25,43 bcd	100,44 ab
Nº 5225	7,33 bcde	13,35 ij	91,93 abcd
Nº 5226	8,21 abc	24,37 bcde	108,37 a
Nº 5229	8,15 abcd	22,73 cdefg	105,54 ab
Nº 5231	6,55 e	18,17 fghi	98,57 abc
Nº 5313	7,33 bcde	25,57 bcd	101,41 ab
Nº 5319	8,31 ab	15,70 hij	93,41 abcd
Nº 5320	*	*	93,32 abcd
Nº 5248	9,11 a	21,77 cdefg	78,66 d
Testigo	7,35 bcde	37,37 a	101,05 ab
Media gral	7,66	22,78	23,12
Valor p	0,0288	< 0,0001	< 0,0001
Dms	1,32	6,02	3,41
CV %	10	16	8,61

\* = dato perdido