



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE
Panicum coloratum VAR. *makarikariense***

ING. AGR.: MARÍA FLORENCIA MORESCO LIRUSSO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

**DIRECTORA: DRA. SILVINA A. FELITTI
CO- DIRECTOR: DR. GUILLERMO R. PRATTA**

2020

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE
Panicum coloratum VAR. *makarikariense*

María Florencia Moresco Lirusso
Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR, durante el período comprendido entre abril de 2015 y diciembre de 2020, bajo la dirección de la Doctora Silvina A. Felitti y la Co-Dirección del Doctor Guillermo R. Pratta.

Ing. Agr. María Florencia Moresco Lirusso
Doctorando

Dra. Silvina Andrea Felitti
Director

Dr. Guillermo Raúl Pratta
Co-Director

Defendida: de 20__.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Silvina Felitti, por brindarme la posibilidad de realizar y concretar un proyecto de investigación.

A mi co-director, el Dr. Guillermo Pratta, por su predisposición infinita, por su generoso apoyo y asesoría.

A mi familia, pilar fundamental, por ser mi casa, por sostenerme y acompañarme.

A la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR) y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR) por permitirme disponer de sus instalaciones.

A la Secretaría de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias por la formación recibida, especialmente a Micaela y Brenda por su ayuda y sus palabras de aliento.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) P-UE: 22920160100043CO (IICAR) por la financiar mi beca doctoral y a la Secretaría de Vinculación Tecnológica y Desarrollo Productivo “Vinculación Inclusiva” 2015 por su aporte económico.

A la EEA-INTA Rafaela, por ceder los materiales utilizados para el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Mónica Sacido, por brindarme una parcela experimental donde desarrollar mi trabajo y su colaboración continua a lo largo de todos estos años.

A todos mis compañeros de la Sala de Estudios de Posgrado, por haber contribuido a mi formación. En especial, a la Dra. Florencia Pozzi, por su mano siempre tendida en la planificación de nuevos objetivos y su ayuda invaluable.

Al Personal de Apoyo a la Investigación y Desarrollo, David y Daniel, por su incansable ayuda en las tareas de campo e invernadero.

A mis amigas, a las de siempre y a las recientes, por su inmenso cariño.

A Ignacio Peries, por sostenerme en los momentos más duros y por demostrarme que la fe es la fuerza de la vida.

A los jurados de tesis, por su lectura crítica, sugerencias y aportes al manuscrito.

“The Edge of Glory”

L.G.

Esta tesis está dedicada a mi madre.
A su esfuerzo, su dedicación y su honestidad.

Los resultados informados en este trabajo de tesis fueron volcados en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

Artículos publicados en revistas científicas

Moresco Lirusso, M. F.; Pozzi, F.; Pratta, G.; Felitti, S. (2021). Genetic diversity of two cultivars of *Panicum coloratum* var. *makarikariense* and its inheritance for the character caryopsis fall. *Acta Scientiarum* (en revisión).

Moresco Lirusso, M. F.; Sacido, M.; Pratta, G.; Felitti, S. (2020). Agronomic assessment of two cultivars of megathermic forage species *Panicum coloratum* var. *makarikariense* in a temperate environment. *Brazilian Archives of Biology and Technology* (en revisión).

Díaz, A.; Chiara Rizzo, M.; Sacido, M.; Pratta G.; Felitti S.; **Moresco Lirusso, M. F.** (2019). Analisis de germinación bajo distintos tratamientos en dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 1 (1): pp. 49. ISSN on-line 2314-1484 (Resumen).

Moresco Lirusso, M. F. (2019). Determinación de caracteres fenotípicos asociados a la pérdida de la semilla. (2019). XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 1 (1): pp. 32. ISSN on-line 2314-1484 (Resumen).

Congresos Internacionales

Moresco Lirusso, M. F.; Cicetti, G; Castagnani, L.; Sacido, M.; Pratta, G.; Felitti, S. (2018). Análisis cuantitativo de pérdida de semilla en dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* en la Pampa Ondulada, Argentina. XXVI Reunión ALPA y V Simposio Internacional de Producción Animal. Publicado en Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, Volumen 26, suplemento 1, p.45. ISSN-e: 1022-1301. (Póster).

Moresco Lirusso, M. F.; Castagnani, L.; Cicetti, G.; Pratta, G.; Felitti, S.; Sacido, M. (2018). Análisis comparativo de producción forrajera de los cultivares Kapivera y Bambatsi de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* en la Pampa Ondulada, Argentina. XXVI Reunión ALPA y V Simposio Internacional de Producción Animal. ISSN-e: 1022-1301. (Póster).

Castagnani, L.; Cicetti, G.; Masson, L.; Sacido, M.; Feldman, S.; **Moresco Lirusso, M. F.** (2018). Evolución de la producción y calidad de *Panicum coloratum* en la Región Pampeana Central, Argentina. Congreso Internacional de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA Ecuador). ISSN-e: 1022-1301. (Póster).

Moresco Lirusso, M. F.; Cirulli, J.; Sacido, M. y Felitti, S. (2017). Mejoramiento genético para incrementar la retención de semillas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* Goossens. XXIV Reunión del Grupo Técnico en forrajeras del Cono Sur, 94-95. (Conferencista y póster).

Berruhet, A.; Batistuti, M. J.; Cirulli, J.; Cicetti, G.; **Moresco Lirusso, M. F.**; Feldman, S.; Felitti, S. y Sacido, M. (2017). Evaluación de la producción de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* y *P. coloratum* var. *coloratum*. XXIV Reunión del Grupo Técnico en forrajeras del Cono Sur, 81-82. (Póster).

Congresos Nacionales

Moresco Lirusso, M. F.; Sacido, M.; Pratta, G.; Felitti, S. (2020). Evaluación de la dehiscencia de semillas en dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. 1º Congreso Argentino de Semillas. (Póster).

Moresco Lirusso, M. F.; Pratta, G.; Sacido, M.; Felitti, S. (2018). Evaluación de la producción estacional de forraje y análisis fenotípico y molecular de pérdida de semilla en dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. Taller Biología molecular de plantas y sus aplicaciones biotecnológicas. Sede de Gobierno UNR. (Póster).

Moresco Lirusso, M. F.; Castagnani, L.; Cicetti, G.; Pratta, G.; Sacido, M.; Felitti, S. (2018). *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv Kapivera y *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv Bambatsi: evaluación de la producción estacional de forraje y análisis de pérdida de semilla. Jornada de Jóvenes Investigadores. AUGM. Universidad Nacional de Cuyo. (Póster).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
Introducción general	7
Capítulo I	7
Capítulo II.....	8
Capítulo III.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
Introducción general	10
Capítulo I	10
Capítulo II.....	10
Capítulo III.....	10
Anexo.....	11
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	12
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	19
OBJETIVO GENERAL	31
HIPÓTESIS GENERAL	32
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE DOS POBLACIONES DE <i>Panicum coloratum</i> var. <i>makarikariense</i> EN CUANTO A LA DINÁMICA DE CAÍDA DE CARIOPSES, COMPORTAMIENTO GERMINATIVO Y MORFOLOGÍA DE PANOJA .	33
1. INTRODUCCIÓN.....	33
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.1. Material vegetal y condiciones del ensayo.....	36

2.2. Dinámica de caída de cariopses	37
2.3. Comportamiento germinativo	39
2.4. Morfología de panoja	41
3. RESULTADOS	43
3.2. Dinámica de caída de cariopses	43
3.3. Comportamiento germinativo	44
3.4. Morfología de panoja	46
4. DISCUSIÓN	51
5. CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO II. ESTIMACIÓN DE LA HEREDABILIDAD EN SENTIDO ESTRICTO (h^2) PARA LA CAÍDA DE CARIOPSES EN <i>Panicum coloratum</i> var. <i>makarikariense</i>	
1. INTRODUCCIÓN.....	56
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
2.1. Material vegetal y condiciones del ensayo.....	59
2.2. Dinámica de caída de cariopses en la progenie.....	60
2.3. Análisis de la covariancia progenie-progenitor.....	61
3. RESULTADOS	63
3.2. Dinámica de caída de cariopses en la progenie.....	63
3.3. Análisis de la covariancia progenie-progenitor.....	63
4. DISCUSIÓN	66
5. CONCLUSIONES.....	68
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE <i>Panicum coloratum</i> var. <i>makarikariense</i> MEDIANTE ISSR	
1. INTRODUCCIÓN.....	69

2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
2.1. Selección de la muestra de material vegetal.....	75
2.2. Extracción y cuantificación de ADN	75
2.3. Marcadores moleculares ISSR	77
2.4. Caracterización de la diversidad genética	79
3. RESULTADOS	81
3.2. Extracción y cuantificación de ADN	81
3.3. Marcadores moleculares ISSR	81
3.4. Caracterización de la diversidad genética	82
4. DISCUSIÓN.....	91
5. CONCLUSIONES.....	94
BIBLIOGRAFÍA	96
ANEXO	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción general

Fig. 1.a: Representación gráfica de la superficie implantada con *Panicum coloratum* en provincias de la Argentina. INDEC (2002).

Fig. 1.b: Representación gráfica de la superficie implantada con *Panicum coloratum* en provincias de la Argentina. INDEC (2018).

Capítulo I

Fig. 1.1.: *Material vegetal y condiciones del ensayo*. Siembra de semillas y crecimiento de plántulas de dos cultivares de *Panicum coloratum* previo a su trasplante al lote experimental.

Fig. 1.2: *Material vegetal y condiciones del ensayo*. Orientación geográfica del lote experimental perteneciente a los progenitores, medidas exactas de cada parcela y distribución de las plantas en el ensayo.

Fig. 1.3: *Dinámica de caída de cariopses*. Estructura de la trampa de cariopses utilizada en el ensayo.

Fig. 1.4: *Dinámica de caída de cariopses*. Planta muestreada con una panoja incorporada al interior de la trampa.

Fig. 1.5: *Dinámica de caída de cariopses*. Lote experimental con rebaje de la totalidad de las plantas a 20cm. Septiembre de 2018.

Fig. 1.6: *Comportamiento germinativo*. Fotografía en lupa de semilla con glumas, semilla sin glumas y con tegumento completo, y semilla desnuda.

Fig. 1.7: *Comportamiento germinativo*. Placas de Petri con los diferentes tratamientos evaluados para las condiciones de crecimiento: invernadero y cámara de crecimiento.

Fig. 1.8: *Morfología de panoja*. Medición de las variables morfológicas asociadas a panoja.

Fig. 1.9: *Dinámica de caída de cariopses*. Curvas referidas al porcentaje acumulado de cariopses caídos para los años 2017 y 2019.

Fig. 1.10: *Comportamiento germinativo*. Gráfica de representación del porcentaje final de semillas germinadas para cada cultivar.

Fig. 1.11: *Comportamiento germinativo*. Gráfica de representación para cada cultivar del porcentaje de semillas germinadas por cada tratamiento.

Fig. 1.12: *Morfología de panoja*. Representación del Análisis de Componentes Principales para la totalidad de los datos en evaluación.

Fig. 1.13: *Morfología de panoja*. Representación del Análisis de Componentes Principales para los datos evaluados en el año 2017.

Fig. 1.14: *Morfología de panoja*. Representación del Análisis de Componentes Principales para los datos evaluados en el año 2019.

Capítulo II

Fig. 2.1: *Material vegetal y condiciones del ensayo*. Orientación geográfica del lote experimental perteneciente a la progenie, medidas exactas de cada parcela y distribución de las plantas en el ensayo.

Fig. 2.2: *Material vegetal y condiciones del ensayo*. Organización del ensayo y trasplante de plántulas pertenecientes a individuos seleccionados durante el año 2017.

Fig. 2.3: *Dinámica de caída de cariopses en la progenie*. Lote experimental con trampas de cariopses colocadas sobre inflorescencias de plantas escogidas al azar.

Fig. 2.4: *Análisis de la covariancia progenie-progenitor*. Representación gráfica de la dispersión manifiestada por el conjunto de datos mediante las relaciones entre variables.

Capítulo III

Fig. 3.1: *Introducción*. Amplificación con un cebador (CA)_n anclado en el extremo 5'.

Fig. 3.2: *Selección de la muestra de material vegetal*. Distribución de los individuos seleccionados para la toma de muestras y posterior extracción de ADN.

Fig. 3.3: *Extracción y cuantificación de ADN*. Muestra inicial de tejido joven para extracción de ADN_g.

Fig. 3.4: *Marcadores moleculares ISSR*. Corrida de muestras con marcadores moleculares de tipo ISSR en agarosa 2,5% (m/v) a 70V.

Fig. 3.5: *Extracción y cuantificación de ADN*. Demostración de integridad del ADN en una corrida de gel de agarosa al 1,5% (m/v).

Fig. 3.6: *Marcadores moleculares ISSR*. Perfil de bandas obtenido para la totalidad de los genotipos con cebadores ISSR corridos en gel de agarosa 2,5% (m/v) a 70V (TAE 1X).

Fig. 3.7: *Análisis multivariado de los datos moleculares*. Dendrograma obtenido mediante el análisis de la matriz de datos binaria basado en la distancia Dice con la totalidad de los *loci* para obtener agrupamientos entre genotipos pertenecientes a cada cultivar.

Fig. 3.8: *Análisis multivariado de los datos moleculares*. Dendrograma obtenido mediante el análisis de la matriz de datos binaria basado en la distancia Dice con los *loci* seleccionados para obtener agrupamientos entre genotipos pertenecientes a cada cultivar.

Fig. 3.9: *Análisis multivariado de los datos moleculares*. Dendrograma obtenido mediante el análisis de la matriz de datos binaria basado en la distancia Euclídea con los *loci* seleccionados para obtener agrupamientos entre genotipos pertenecientes a cada cultivar.

Anexo

Fig. I a, b: *Dinámica de caída de cariopses*. Curvas referidas al porcentaje de cariopses caídos para los años 2017 y 2019.

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción general

Tabla 1: Superficie implantada con *Panicum coloratum* en provincias de Argentina. INDEC (2002), INDEC (2018).

Capítulo I

Tabla 1.1: *Comportamiento germinativo*. Planilla guía para determinar el n° de tratamiento de semillas.

Tabla 1.2: *Dinámica de caída de cariopses*. Caída semanal de cariopses por cultivar para los años 2017 y 2019.

Tabla 1.3: *Morfología de panoja*. Valores estadísticos medios para las variables de producción de forraje analizadas.

Tabla 1.4: *Morfología de panoja*. Auto-vectores para las variables graficadas en la Fig. 1.12.

Tabla 1.5: *Morfología de panoja*. Correlación de los datos con relación a las variables originales para los años 2017 y 2019.

Capítulo II

Tabla 2.1: *Dinámica de caída de cariopses en la progenie*. Caída semanal de cariopses sobre individuos de la progenie, por cultivar para los años 2019 y 2020.

Tabla 2.2: *Análisis de la covariancia progenie-progenitor*. Valores medios de los progenitores (por genotipos en cada año de evaluación), y de su respectiva progenie.

Capítulo III

Tabla 3.1: *Marcadores moleculares ISSR*. Secuencias de los cebadores utilizados para caracterización molecular de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera y cv. Bambatsi.

Tabla 3.2: *Marcadores moleculares ISSR*. Temperaturas óptimas de anillado (°C) determinadas para cada uno de los cebadores evaluados.

Tabla 3.3: *Análisis univariado de los datos moleculares*. Parámetros de diversidad genética evaluados para cada cebador ISSR.

Tabla 3.4: *Análisis univariado de los datos moleculares*. Número de bandas exclusivas por ISSR y por cultivar.

Tabla 3.5: *Análisis de la asociación entre la diversidad molecular y la caída de cariopses*. Análisis no paramétrico de la varianza mediante el test Kruskal Wallis.

Tabla 3.6: *Análisis de la asociación entre la diversidad molecular y la caída de cariopses*. Resultados significativos mediante el test no paramétrico Kruskal Wallis con el carácter “Total caída de cariopses -2017 y 2019-”, el p-valor y valores de presencia/ausencia.

Anexo

Tabla I a, b, c, d: *Dinámica de caída de cariopses*. Planillas utilizadas para la toma de datos sobre caída de cariopses para los dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* 2019 y 2020.

Tabla II a, b: *Dinámica de caída de cariopses*. Planilla utilizada para la toma de datos de variables meteorológicas 2017 y 2019.

Tabla III a, b, c, d, e, f: *Comportamiento germinativo*. Planillas utilizadas para la determinación absoluta y porcentual de semillas germinadas.

Tabla IV a, b, c, d: *Dinámica de caída de cariopses en la progenie*. Planillas utilizadas para la toma de datos de caída de cariopses sobre la progenie seleccionada de dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* 2019 y 2020.

Tabla V a, b: *Dinámica de caída de cariopses en la progenie*. Planilla utilizada para la toma de datos de variables meteorológicas 2019 y 2020.

Tabla VI. *Extracción y cuantificación de ADN*. Valores de concentración, integridad y pureza medidos en espectrofotómetro en función de la longitud de onda sobre muestras de ADN genómico.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN _g	ADN genómico
ANOVA	Análisis de la varianza
AMOVA	Análisis molecular de la varianza
C ₄	Vía de 4 carbonos
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CPs	Componentes Principales
Cv	Cultivar
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético, del inglés <i>ethylene-diamine-tetraacetic acid</i>
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
GL	Grados de Libertad
H	Hora
h ²	Heredabilidad en sentido estricto
HCl	Ácido clorhídrico
INASE	Instituto Nacional de Semillas
ISSR	Secuencias entre Repeticiones Simples, del inglés <i>Interspread Single Sequence Repeats</i>
kg/ha	Kilogramo/Hectárea
kg/ha/día	Kilogramo/Hectárea/Día

km ²	Kilómetro cuadrado
m	Metro
M	Masa molar
MAS	Selección Asistida por Marcadores, del inglés <i>Marker Assisted Selection</i>
	Miligramo
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
m/v	Masa/Volumen
NaAc	Acetato de sodio
ng	Nanogramo
NS	No significativo, del inglés <i>not significant</i>
P	Probabilidad
Pb	Pares de bases
PBI	Producto Bruto Interno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
S	Significativo, del inglés <i>significant</i>
S _x	Semana (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)
SDS	Dodecilsulfato sódico

TAE	Tris-Acetato-EDTA buffer (tampón de electrofóresis)
TBE	Tris-Borato-EDTA buffer (tampón de electrofóresis)
Tris	Trisaminometano
v/v	Volumen/Volumen
V	Voltios
Var	Variedad
Vs	Versus
mg	Microgramo
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro
$^{\circ}$ C	Grado centígrado
$^{\circ}$ H	Humedad Relativa
$^{\circ}$ T	Temperatura
χ^2	Chi cuadrado
α	Nivel de significación
>	Mayor
<	Menor
%	Por ciento
=	Igual
+	Más

RESUMEN

Panicum coloratum es una especie de gramínea de tipo C₄ nativa de Sudáfrica. En Argentina es ampliamente valorada por su producción de forraje de buena calidad en ambientes donde los recursos son limitantes, aunque es escasamente difundida en los sistemas ganaderos actuales. El propósito de este estudio fue evaluar el potencial agronómico de dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* respecto a la caída de sus cariopses, germinación y morfología de panoja. La caída fue evaluada semanalmente mediante la utilización de trampas de cariopses, los resultados demostraron la existencia de diferencias significativas entre cultivares en ambos años. El pico de caída se dio en la misma fecha para ambos cultivares, aunque eso significó semanas distintas. Ambos picos no estuvieron influenciados por condiciones ambientales y produjeron semilla con altos porcentajes de germinación en los diferentes tratamientos. Dentro del Análisis de Componentes Principales para los años 2017, 2019 y para la totalidad de los datos en conjunto se hallaron correlaciones positivas, altas y significativas para diversas variables referidas a la morfología de panoja. En todos los casos, las dos primeras Componentes Principales fueron capaces de explicar un alto porcentaje de la variabilidad total. También se realizaron estimaciones de heredabilidad en sentido estricto mediante el método de Regresión Progenie-Progenitor para el carácter “caída de cariopses” a lo largo de dos años. Las estimaciones se realizaron sobre el carácter morfológico mencionado habiendo seleccionado previamente el 18,75% de los individuos del cultivar Kapivera y el 28,57% de los individuos del cultivar Bambatsi. El único valor significativo obtenido fue en la semana 5, lo que da un indicio de la existencia de variancia genética aditiva y también de su estabilidad. Los resultados alcanzados respecto a la h^2 para las demás semanas en estudio resultaron estadísticamente no significativos, indicando la ausencia de variancia aditiva para el carácter en estudio frente al contexto genético. Los marcadores moleculares ISSR permitieron confirmar la existencia de variabilidad genética entre cultivares y dentro de individuos del mismo cultivar a través de bandas y alelos únicos por genotipo. Los individuos del cultivar Kapivera han podido diferenciarse genéticamente de los individuos del cultivar Bambatsi al detectarse *loci* y alelos que diferencian a ambos cultivares. Estos marcadores demostraron ser eficaces para la distinción de los cultivares analizados y se ha observado una amplia variabilidad en la especie.

La información brindada en este trabajo enriquece el conocimiento del comportamiento de los principales caracteres fenotípicos asociados al rendimiento de *Panicum coloratum* var.

makarikariense, ofreciendo herramientas para asistir al mejoramiento genético en la búsqueda de un incremento en el rendimiento de cultivos. La caracterización de la diversidad genética dentro de los cultivares de *P. coloratum* var. *makarikariense* mediante marcadores ISSR ampliamente utilizados en gramíneas constituye un paso fundamental para su potencial incorporación a programas de mejoramiento desarrollados en la especie.

Palabras clave: forraje, caída de cariopses, germinación, morfología de panoja, heredabilidad, diversidad molecular, marcadores ISSR.

ABSTRACT

Panicum coloratum is a species of C₄ type grass native to South Africa. In Argentina it is valued for its production of good quality forage in environments where resources are limiting, although it is scarcely diffused in current livestock systems. The purpose of this study was to evaluate the potential of two cultivars of *Panicum coloratum* var. *makarikariense* with respect to caryopses drop, germination and panicle morphology. Drop was evaluated weekly using caryopse traps. The results showed significant differences between cultivars in both years. The caryopses fall peak occurred on the same date for both cultivars, although that occurred in different weeks. The behavior was not influenced by environmental conditions and both cultivars produced seeds with high germination percentages in the different treatments. High variance and positive, high and significant correlations were found for various variables referring to panicle morphology, by means of the Principal Component Analysis for both years and for all the data as a whole. In all cases, the first two Principal Components were able to explain a high percentage of the total variability. Heritability estimates in the narrow sense were also made using the progeny-parent regression method for the trait "caryopsis drop" over two years. The estimates were made on the aforementioned morphological character, having previously selected 18.75% of the individuals of the Kapivera cultivar and 28.57% of the individuals of the Bambatsi cultivar. The only significant value obtained was in week 5, which gives an indication of the existence of additive genetic variance and also its stability. The results achieved with respect to h^2 for the other weeks under study were statistically non-significant, indicating the absence of additive variance for the trait under study compared to the genetic context. The ISSR molecular markers allowed to confirm the existence of genetic variability between cultivars and within individuals of the same cultivar through bands and unique alleles per genotype. The individuals of the Kapivera cultivar have been able to genetically differentiate themselves from the individuals of the Bambatsi cultivar by detecting *loci* and alleles that differentiate both cultivars. These markers proved to be effective for the distinction of the cultivars analyzed and a wide variability has been observed in the species.

The information provided in this work enriches the knowledge of the behavior of the main phenotypic characters associated with the performance of *Panicum coloratum* var. *makarikariense*, offering tools to assist genetic improvement in the search for an increase in crop yield. The characterization of the genetic diversity within the cultivars of *P. coloratum*

var. *makarikariense* using ISSR markers widely used in grasses constitutes a fundamental step for its potential incorporation into breeding programs developed in the species.

Keywords: forage, caryopsis fall, germination, panicle morphology, heritability, molecular diversity, ISSR markers.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La República Argentina es el país más austral de Sudamérica, sus 2,76 millones de km² abarcan latitudes que van desde los 22° a los 55° (norte a sur). Su economía de base agropecuaria representa el 6,14% del PBI nacional. Debido a su vasta extensión, abarca una gran variedad de climas, relieves y situaciones productivas. Los suelos argentinos son de diversos tipos, de amplia distribución y de distintas aptitudes productivas. La franja central correspondiente a la Pampa Húmeda es poseedora de los suelos con mejor aptitud para el desarrollo de actividades agrícolas y ganaderas, fenómeno que coincide con aquellas zonas donde tradicionalmente se ha desarrollado la ganadería basada en especies forrajeras templadas.

A partir del año 1980, el avance de la agricultura ha provocado un corrimiento de la actividad ganadera hacia zonas marginales con menores aptitudes productivas por tener limitantes tanto climáticas como edáficas. Dicho proceso se ha iniciado con una relocalización y posterior desplazamiento de la hacienda (cría e invernada) a suelos con mayores restricciones en cuanto a drenaje, anegamiento, alcalinidad, etc. que resultan menos productivos y presentan una distribución de la producción de forraje marcadamente estacional, lo que ha llevado a un intenso proceso de sobrecarga de las pasturas y de los pastizales naturales. Como consecuencia, los pastizales naturales se han degradado o su productividad actualmente es escasa, con problemas de salinidad y/o alcalinidad, y en algunos casos con anegamientos temporarios o sequías (Monti et al., 2012).

Condiciones de altas temperaturas, lluvias concentradas y alta evapotranspiración en el verano; bajas temperaturas y carencia de lluvias en el invierno son particularidades que restringen la elección de especies forrajeras a aquellas que por su origen presentan características de adaptación a nivel fisiológico, morfológico y productivo (calidad y cantidad de forraje producido) (De León, 2004). A esto también se adiciona la presencia de suelos poco desarrollados, con bajo contenido de materia orgánica, sin estructura, con baja retención de humedad y en muchos ambientes suelos salinos y/o encharcados (Pérez, 2005).

La modificación de dichos ambientes como respuesta al cambio climático ocasionado por el calentamiento global ha fortalecido un marcado interés en evaluar las características productivas y reproductivas de nuevas especies megatérmicas. Frente al actual escenario, se ha planteado la necesidad de recomendar especies forrajeras tolerantes a condiciones

ambientales marginales que permitan aumentar la productividad. Algunas especies introducidas han permitido incrementar el potencial productivo de los pastizales naturales, evento fortalecido gracias a la tolerancia a estreses abióticos necesarios para desarrollarse en zonas poco productivas. En general, las especies forrajeras poseen semillas pequeñas, embriones poco vigorosos con serias dificultades en la implantación. Por otro lado, su utilización e incorporación en los sistemas es relativamente reciente, lo que implica que aún conserven algunas de sus características silvestres (especies poco domesticadas).

La mayoría de las especies que componen las pasturas perennes poseen reproducción asexual, ya sea por propagación vegetativa o por apomixis. En la mayoría de los taxones, la reproducción vegetativa puede ser de tipo facultativa y combinarse en cierto grado con la reproducción sexual (Eckert & Barrett, 1993). Durante la reproducción sexual, una célula madre de la megaspora se diferencia iniciando la megasporogénesis, generando una reducción meiótica para producir cuatro megasporas haploides, de las cuales tres degeneran (Hanna & Bashaw, 1987; Ortiz et al., 2013). La megaspora sobreviviente sufre megagametogénesis, que implica tres rondas de mitosis sin citocinesis, generando un sincitio de ocho núcleos. Eventos posteriores de diferenciación celular resultan en la formación de un gametofito femenino maduro (saco embrionario) que contiene una oófera u ovocélula, dos sinérgidas, tres antípodas y una célula central con dos núcleos (Koltunow & Ozias-Akins, 2013). En *Panicum coloratum* var. *makarikariense* también se reconoce la existencia de reproducción apomíctica en una muy baja proporción (Hutchison & Bashaw, 1964), se considera que este tipo de reproducción ha evolucionado como un sistema alternativo a la sexualidad a través de la desregulación de las vías de desarrollo sexual preexistentes en el ovario (Grimanelli et al., 2001).

La formación de semillas es un proceso esencial en el ciclo de vida de las angiospermas (plantas con flores) que asegura la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones. El desarrollo se inicia con la doble fecundación, donde uno de los gametos masculinos fecunda la ovocélula y el otro gameto fecunda a la célula central binucleada (Chaudhury et al., 2001). El primer gameto masculino se une a la célula huevo para formar un cigoto que posteriormente resultará en la planta embrionaria diploide. El segundo gameto masculino se une con los dos núcleos polares para formar una célula triploide en la que luego se desarrolla el endospermo (reserva nutricia para el embrión en crecimiento). Para que la semilla

desarrollada sea viable es necesario que se produzca satisfactoriamente tanto la fecundación de la célula huevo como la fusión con los núcleos polares.

La producción de semilla comercial de especies tropicales y subtropicales perennes ha sido realmente compleja debido a que las mismas conservan características silvestres que afectan la cosecha (Hacker & Loch, 1997) tales como mecanismos de dispersión activos que generan caída de cariopses y reducido tamaño de los mismos (Hayes et al., 1989; Kennard et al., 2002; Cubero, 2003). En Argentina, las especies megatérmicas usualmente son utilizadas como alimento para el ganado de carne, por este motivo la demanda de semillas se encuentra en constantes fluctuaciones de precios al estar directamente relacionada al precio de la carne.

Desde el comienzo de la humanidad, las plantas han sido manipuladas por los seres humanos mediante selección artificial para obtener grandes modificaciones en sus características. Este avance se ha logrado mediante la domesticación de las especies. Algunos rasgos comúnmente modificados se basan en el tamaño de los frutos, en las alteraciones de los mecanismos de dispersión de semillas y en la reducción o la pérdida de dormición de las mismas (De Wet & Harlan, 1975; Hillman & Stuart Davies, 1990; Bai & Lindhout, 2007). La dormición se define como la falta de germinación de una semilla bajo condiciones ambientales favorables (Bewley, 1997). Los embriones pueden ser incapaces de activar su crecimiento debido a la presencia de inhibidores químicos o encontrarse en estadios llamados inmaduros o subdesarrollados (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). En otros casos, aunque el embrión tenga la capacidad de germinar, la existencia de cubiertas duras detiene o retrasa la germinación. Tanto los inhibidores como la presencia de cubiertas mecánicas provoca limitaciones en la difusión del agua y el aire (Bewley, 1997; Steinbrecher & Leubner-Metzger, 2017).

Panicum coloratum es una de las especies incluidas en el Proyecto Nacional de Mejoramiento de Especies Forrajeras del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) que tiene como objetivo incrementar la información contenida en los registros de los bancos de germoplasma de especies forrajeras. En particular, la EEA-INTA Rafaela se focalizó en la variedad botánica *makarikariense*, ya que se adapta principalmente a suelos arcillosos pesados y a la variabilidad climática con ciclos alternados de excesos hídricos y sequía (Armando, 2014). La recolección y recopilación de información sobre la variabilidad morfo-genética de cada material y las relaciones genéticas entre genotipos resulta sumamente

necesaria para la planificación de colectas, para la conservación y el uso eficiente de los recursos (Laurentin, 2009). Dentro de la diversidad de herramientas que permiten la caracterización de la variabilidad existente en una especie, los marcadores morfológicos basados en descriptores fenotípicos han sido reconocidos por los mejoradores como un primer paso en la caracterización de la diversidad genética presente. Sin embargo, dicha caracterización presenta algunas limitaciones, por lo que suele recomendarse la utilización de otras herramientas que permitan complementar los resultados. Los marcadores moleculares que detectan la variabilidad directamente a nivel de ADN en combinación con los caracteres morfológicos permiten identificar materiales contrastantes necesarios para localizar regiones genómicas que controlen caracteres de interés. Dado que las variaciones existentes entre individuos son el resultado de la variación genética y también del efecto ambiental, en todo proceso de selección es necesario estimar los componentes genéticos y la estabilidad de los materiales evaluados. La respuesta de las poblaciones a la selección dependen de la magnitud de la variación genética para el rasgo en estudio, de la heredabilidad y de la intensidad de selección aplicada (Falconer, 1986; Walker Rose, 2005). Las escasas estimaciones realizadas en *Panicum coloratum* sobre variabilidad genética en caracteres morfológicos se han realizado mayoritariamente en colecciones de la var. *coloratum* (Young, 1994), siendo significativamente menor la información disponible de la var. *makarikariense*.

LA ESPECIE EN ESTUDIO

Las especies pertenecientes al género *Panicum* poseen su origen en distintas partes del mundo, que incluyen África, América del Norte, América del Sur y China. Si bien la gran mayoría crece en regiones tropicales y subtropicales, existen algunas especies adaptadas a climas templados, variando su establecimiento en hábitats como sabanas, pastizales y bosques (Zuloaga, 1987; Van De Wouw et al., 2008).

Panicum es un género marcadamente uniforme respecto a la morfología de sus espiguillas pero es considerablemente variable en rasgos morfológicos, anatómicos, fisiológicos y citológicos (Crins, 1991; Giussani et al., 2001). El género incluye especies de producción forrajera anual y perenne, estructuras cespitosas, estoloníferas, rizomatosas, erguidas y decumbentes. Las panojas son en su mayoría abiertas con espiguillas en largos pedicelos, que

poseen una flor basal estéril y otra fértil; el fruto es de tipo cariopse con pericarpio adherido (Aliscioni et al., 2003; Bhandari et al., 2011).

El número cromosómico básico del género varía entre 8, 9, 10, 11 y 15, siendo los más frecuentes 9 y 10 (Jauhar & Joshi, 1966; Aliscioni et al., 2003). En particular, la especie *Panicum coloratum* presenta un número básico y uniforme de cromosomas de $x=9$. Si bien se informaron diferentes niveles de ploidía en el subgénero *Panicum* y en la especie, el nivel tetraploide es uno de los más frecuentemente descritos (Hutchison & Bashaw, 1964; Pritchard & De Lacy, 1974; Komatsu & Suzuki, 1987). Hutchison & Bashaw (1964) sugirieron la posibilidad de que los individuos tetraploides de *P. coloratum* estén conformados por dos genomas diferentes. Sin embargo, en la var. *makarikariense*, fueron observados cromosomas cuadrivalentes y de tamaño homogéneo, de acuerdo con un origen autotetraploide. El modo reproductivo de las especies varía con formas alógamas, autógamas y apomíticas (Brown & Emery, 1958). Estudios realizados sobre los individuos de la var. *makarikariense* en INTA Rafaela permitieron observar una significativa variabilidad morfológica entre plantas medio-hermanas, lo que torna la hipótesis del modo reproductivo apomítico, menos probable (Maina, 2012).

El estudio del nivel de ploidía en *P. coloratum* formó parte de la caracterización de los materiales que integran el germoplasma en EEA INTA Rafaela. En plantas provenientes de diferentes accesiones de *P. coloratum* var. *makarikariense* fueron contabilizados 36 cromosomas mitóticos. Considerando el número básico de cromosomas de $x=9$ mencionado por Hutchison y Bashaw (1964), corresponderían a un nivel tetraploide.

Las especies más conocidas son *P. maximum* y *P. coloratum* L. utilizadas para forraje, *P. virgatum* L. utilizada como forrajera y para la producción de biocombustible, *P. miliaceum* utilizada como alimento para aves y humanos, y como forraje, y *P. obtusum* K. también utilizada como alimento para aves, cerdos, y producción de forraje (Tischler & Ocumpaugh, 2004; Bhandari et al., 2011).

La especie mencionada en el presente trabajo de tesis se denomina *Panicum coloratum* var. *makarikariense* Goossens, reconocida también como mijo perenne. De acuerdo al sistema de clasificación taxonómica de Linneo (Linnaeus, 1753), pertenece a la Familia de las gramíneas (Gramineae) o poáceas (Poaceae), Subfamilia Panicoideae, Tribu Paniceae, Género *Panicum*

y se ubica entre los géneros de mayor importancia, con alrededor de 470 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales.

Panicum coloratum es una especie de gramínea perenne estival de lento establecimiento (su crecimiento inicia en septiembre y finaliza con las primeras heladas otoñales), tolera encharcamiento, frío y suelos levemente salinos. La misma se trata de una especie variable fenotípicamente, constituida por un número de ecotipos o biotipos con diferentes morfologías y formas de crecimiento. Las plantas forman matas erectas de 1 a 2 metros de altura, robustas con rizomas cortos (rara vez estolonífera), tallos erectos con nudos glabros o levemente pubescentes, posee hábito de crecimiento cespitoso, lígulas membranosas-ciliadas o ciliadas, láminas lanceoladas a linear-lanceoladas de 10 a 30 centímetros de longitud, panojas laxas abiertas, espiguillas elipsoides a lanceoladas, glumas glabras, pequeñas y desiguales. Posee dos flores por espiguilla, la inferior estaminada con palea bien desarrollada y la flor superior bisexual con lemma lisa, dura y amarilla. Los cariopses miden alrededor de 1,5 milímetros de longitud y 0,8 milímetros de ancho, color marrón a la madurez (Gould, 1975; Freckmann & Lelong, 2003; Valdes-Reyna et al., 2009).

La característica de ser una pastura marcadamente megatérmica con un metabolismo fotosintético de tipo C₄ le confiere mayores eficiencias en la captura del CO₂ en condiciones de altas temperaturas e intensidad lumínica (temperatura óptima de fotosíntesis a 30-35°C), y su mayor resistencia estomática a la pérdida de agua las hace menos propensas a sufrir estrés térmico y/o hídrico. Muestra un buen comportamiento en regiones con ciclos de sequía y anegamientos periódicos (Fossati & Bruno, 1982). Su origen africano le ha permitido evolucionar sobre un ambiente tropical y subtropical desarrollando adaptaciones fisiológicas y morfológicas que las hacen más eficientes en el uso de los recursos luz, temperatura y agua. Sumado a que posee una notable adaptación a un amplio rango de suelos y condiciones climáticas, estas características la convierten en una especie de distribución mundial. Por este motivo, es considerada una especie promisoría para superar la escasez de forraje en ambientes poco productivos con suelos pobres y condiciones ambientales desfavorables (Stritzler, 2008). Tiene una buena producción y presenta alta calidad del forraje en diciembre comparada con otras gramíneas C₄, lo que permite conservarla como forraje diferida hacia el invierno (Petruzzi et al., 2003). Las hojas y los tallos son altamente palatables aún en estadios maduros. Su modo reproductivo es predominantemente sexual (Hutchison & Bashaw, 1964) y de polinización abierta o cruzada (Pritchard & De Lacy, 1974), aunque un cierto nivel de

autofecundación y apomixis ha sido mencionado (Hutchison & Bashaw, 1964). Brown y Emery (1958) encontraron que el desarrollo del saco embrionario de *Panicum coloratum* era del tipo normal de 8 núcleos que revela la reproducción sexual. Posteriormente, Hutchison y Bashaw (1964) observaron en óvulos maduros (aunque en una muy baja frecuencia) células similares a los sacos embrionarios múltiples de las especies apomícticas apospóricas. Como consecuencia de lo mencionado, se considera a *P. coloratum* como una especie principalmente alógama con múltiples sacos embrionarios, si bien estos no parecen formar embriones, podrían sugerir la posibilidad de una reproducción apomíctica ocasional. La forma de diseminación más común es por semillas, pero también puede ser por medio de propagación vegetativa mediante rizomas cortos que tienen capacidad de emitir raíces cuando los nudos entran en contacto con el suelo (Petruzzi et al., 2003).

P. coloratum es utilizada como forrajera en varias partes del mundo. Se introdujo en Argentina durante la década de los '90 a partir de eventos no debidamente registrados. Se reconocen principalmente dos variedades: *P. coloratum* var. *coloratum* (Bogdan, 1977) y *P. coloratum* var. *makarikariense* Gooss. (Goossens, 1934); sin embargo, la variedad *kabumlabula* también es mencionada en la literatura (Tischler & Ocumpaugh, 2004).

En nuestro país, las zonas de cultivo de *P. coloratum* se extienden desde climas templados semiáridos, subhúmedos a tropicales, y en suelos desde arenosos a franco arcillosos. Las especies forrajeras megatérmicas son buenas productoras en cantidad de forraje y a su vez, poseedoras de relativamente buena calidad. La producción promedio de materia seca anual ronda entre las 8 toneladas por hectárea y ofrece valores de proteína cruda superiores a 14% durante la época de verano argentino. En Argentina se sembraban alrededor de 7,8 millones de hectáreas con pasturas forrajeras, de las cuales 1,4 millones eran cultivadas con gramíneas tipo C₄ y de estas, 130.514,5 hectáreas fueron sembradas con *Panicum coloratum* (INDEC, 2002). En los últimos años, la superficie sembrada con pasturas forrajeras se redujo a 3,8 millones de hectáreas, de las cuales solo 18.182 hectáreas son sembradas con *Panicum coloratum* (INDEC, 2018). Su distribución abarca principalmente las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Entre Ríos, La Pampa, San Luis y Santa Fe (Tabla 1 y Fig. 1a). Sin embargo en los últimos años ha cobrado mayor difusión y reconocimiento en otras regiones pertenecientes al norte del país (Tabla 1 y Fig. 1b).

Tabla 1. Superficie implantada con *Panicum coloratum* en provincias de la República Argentina. INDEC (2018), INDEC (2002).

Provincia	CNA 2018		CNA 2002	
	Total (Hectáreas)	<i>Panicum coloratum</i>	Total (Hectáreas)	<i>Panicum coloratum</i>
Buenos Aires	1.070.574,3	1.955,0	2.986.768,2	20,0
Catamarca	14.909,4	4,0	74.238,1	-
Chaco	86.612,9	120,0	1.580.745,8	120.603,5
Chubut	22.998,8	-	42.731,4	-
Córdoba	632.940,7	4.581,5	86.481,3	-
Corrientes	31.383,4	22,5	17.777,9	-
Entre Ríos	206.373,0	-	275.884,4	35,0
Formosa	220.825,0	-	70.070,3	-
Jujuy	3.846,6	-	6.289,1	-
La Pampa	367.913,9	4.779,0	992.383,2	2.221,0
La Rioja	11.235,0	-	23.141,9	-
Mendoza	29.732,5	-	15.792,4	-
Misiones	42.062,9	10,0	75.617,2	-
Neuquén	8.133,9	-	6.030,6	-
Río Negro	29.459,2	-	24.320,1	-
Salta	128.289,7	1.855,0	102.958,3	-
San Juan	7.129,4	-	3.623,4	-
San Luis	215.762,1	1.034,0	485.680,6	7.412,0
Santa Cruz	11.272,7	-	9.250,5	-
Santa Fe	403.060,8	186,0	747.166,2	223,0
Santiago del Estero	251.350,0	3.635,0	234.166,0	-
Tierra del Fuego	38,6	-	77,1	-
Tucumán	18.351,8	-	22.402,8	-
Total del país	3.814.256,4	18.182,0	7.883.596,8	130.514,5

Fuente: INDEC, Censo Nacional Agropecuario 2018 y 2002.

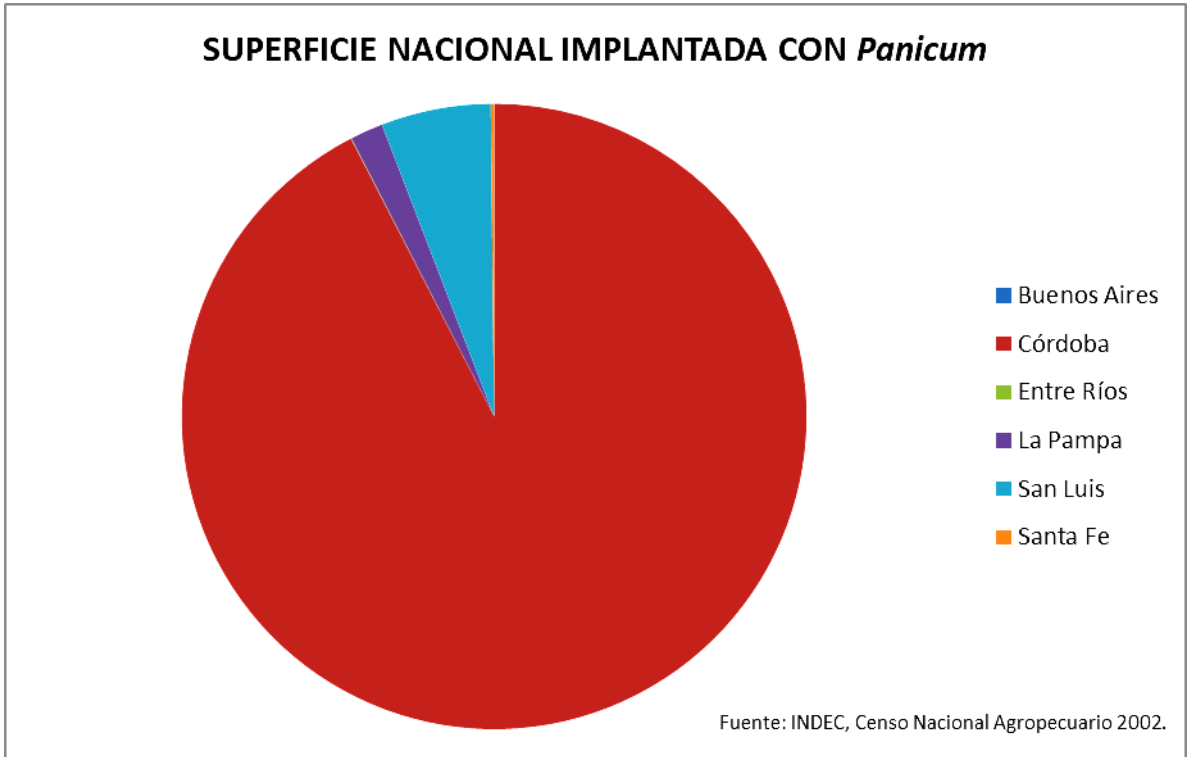


Fig. 1.a. Representación gráfica de la superficie implantada con *Panicum coloratum* en provincias de la República Argentina. INDEC (2002).



Fig. 1.b. Representación gráfica de la superficie implantada con *Panicum coloratum* en provincias de la República Argentina. INDEC (2018).

Se comprobó que en la Región Pampeana semiárida el mijo perenne es capaz de producir más de 8 toneladas de materia seca por año. Si bien el rebrote comienza en el mes de septiembre, puede observarse una producción sostenida desde el mes de octubre, logrando el pico de producción en los meses de noviembre y diciembre con valores de hasta 55 kg/ha/día. A partir de febrero, la producción declina hasta que llega el momento de las heladas, cuando detiene su crecimiento. Respecto a la producción de semilla, en la Región Pampeana los rendimientos oscilan de 5 a 40 kg/ha dependiendo del estado del cultivo, del momento y método para su cosecha. En el norte de Córdoba el rendimiento promedio estimado para *Panicum coloratum* es de 70 kg/ha (Petruzzi et al., 2003).

La variedad *makarikariense* se ha distribuido desde las sabanas cálidas bien drenadas hasta las planicies de inundación. Presenta individuos con estructura robusta, usualmente semi-procumbente, con hojas verde-azuladas, glaucas y con nervadura blanca, en Argentina se reconocen dos cultivares: cv. Kapivera y cv. Bambatsi. Esta variedad ha sido menos difundida en nuestro país y como consecuencia, los bancos de germoplasma no cuentan con descripciones detalladas de sus materiales. Para ello, el INTA Rafaela ha colectado materiales de diferentes sitios del país desde el año 2006 con la finalidad de cubrir la mayor variabilidad genética posible, analizar el modo reproductivo y la herencia de caracteres de interés agronómico para luego implementar programas de mejoramiento genético.

El cv. ‘Bambatsi’ fue desarrollado en Australia en el año 1940 por el Departamento de Agricultura de Nueva Gales del Sur (West, 1952) y lanzado durante el año 1958 (Wilson, 1963; Loch & Ferguson, 1999). En nuestro país, dicha accesión se encuentra registrada en el Instituto Nacional de Semillas: ‘Bambatsi’ en 1990 (var. *makarikariense*, INASE N° 2212, 06/22/90). Kapivera es un cultivar que fue desarrollado por investigadores del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Rafaela, Argentina. La característica más destacable de dicho cultivar es el incremento del peso de semillas respecto a la población original permitiendo la obtención de plantas más vigorosas, con mayor peso seco, mayor longitud de hojas y mayor longitud total de raíces adventicias (INTA, n.d.). Durante el desarrollo de Kapivera fueron evaluados distintos caracteres referidos al tamaño de panoja con el objetivo de disminuir la asincronía madurativa. El proceso de selección no produjo efectos genéticos significativos sobre el poder germinativo de las semillas pero se observaron algunos efectos que evidencian una alta influencia ambiental (Maina, 2012).

Panicum coloratum var. *makarikariense* presenta características de floración determinada y maduración desuniforme dentro de la panoja, sumado a una elevada desarticulación de los cariopses luego de su maduración, esto establece serias dificultades para cosechar semillas de calidad. Estudios realizados en Rafaela en *P. coloratum* var. *makarikariense* pusieron en evidencia que existen diferencias entre distintos materiales en cuanto a la producción de semillas por panoja, el número de semillas vanas por panoja y la dinámica de caída de semillas (Dreher et al., 2008).

En general las espigas cosechadas resultan con una gran proporción de semillas inmaduras y de bajo peso. Estas semillas poseen bajos porcentajes de germinación, y las plántulas que logran desarrollarse presentan menor vigor que las provenientes de semillas maduras (Tischler & Ocumpaugh, 2004).

Además, en general, presenta problemas de implantación atribuidos frecuentemente a la baja calidad de la semilla (Moser, 2000). Por otra parte, el tamaño de las semillas es uno de los factores que podría determinar el éxito en el establecimiento de la pastura (Young & Tischler, 1994), lo que explica muchas veces la escasa adopción de dicha especie por parte de los productores ganaderos. Los cultivares de *Panicum coloratum* son considerados poblaciones con cierto grado de variabilidad genotípica intra cultivar. Esto ofrece la posibilidad de seleccionar individuos que expresan determinados rasgos diferenciales en cuanto a su aptitud productiva o de tolerancia a estrés abiótico dentro de un cultivar (Young, 1994). La fenotipificación se ha definido como la acción de describir un conjunto de organismos por sus caracteres. Cuando se trata de especies forrajeras comúnmente se hace referencia al crecimiento a nivel de biomasa y/o la productividad, a la arquitectura de planta, la duración de las etapas fenológicas, entre otros caracteres fenotípicos. La posibilidad de identificar los mecanismos fisiológicos involucrados en el control de tales caracteres, permite seleccionar genotipos con características deseadas como materiales potenciales para ser incorporados en programas de mejoramiento genético vegetal.

El establecimiento de pasturas perennes estivales es más lento que el establecimiento de las pasturas invernales, tomando algunas veces dos o más años para desarrollar un adecuado stand de plantas (Petruzzi et al., 2003). Las etapas de implantación y establecimiento de pasturas se consideran como las de mayor sensibilidad a las adversidades del medio ambiente, siendo crítica en ambientes con restricciones edafoclimáticas. La implantación incluye la

germinación y la emergencia de las plántulas, mientras que el establecimiento de las mismas hace referencia la cantidad de plantas logradas desde la siembra. Esta última etapa está condicionada por varios aspectos del medio (Di Nucci de Bedendo et al., 2011).

Panicum coloratum es una alternativa interesante en el panorama forrajero de las empresas agropecuarias argentinas ya que puede integrar cadenas de cría o de invernada contribuyendo adicionalmente a la estabilidad de los suelos. Su integración como pastura nativa en un sistema de pastoreo complementario ha permitido lograr una mejor distribución estacional del forraje disponible, tanto en cantidad como en calidad.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la caracterización de la variabilidad fenotípica existente mediante evaluación de dos poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* e identificar la diversidad genética mediante marcadores moleculares ISSR.

HIPÓTESIS GENERAL

Existen diferencias en el comportamiento de los principales caracteres fenotípicos y moleculares asociados a *Panicum coloratum* var. *makarikariense*.

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE DOS POBLACIONES DE *Panicum coloratum* var. *makarikariense* EN CUANTO A LA DINÁMICA DE CAÍDA DE CARIOPSES, COMPORTAMIENTO GERMINATIVO Y MORFOLOGÍA DE PANOJA

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, los frutos han evolucionado mediante diversos mecanismos para mediar entre la maduración y la dispersión de sus semillas. Este proceso se logra a través de un evento cuidadosamente organizado que implica la diferenciación de células especializadas que permiten su posterior separación. El desarrollo de las mismas es un evento clave en el ciclo de vida de las plantas con flores. En las gramíneas, la semilla y el fruto están soldados formando el grano (o cariopse), por lo que la desarticulación de los mismos implica la caída de la estructura completa.

Desde el punto de vista anatómico, la desarticulación de los cariopses es un proceso condicionado por la aparición de dos capas de abscisión en la base de la espícula. Los mecanismos que operan en este proceso son: 1) la desintegración de la laminilla media y parte de la pared celular como resultado de cambios químicos y 2) desprendimiento mecánico debido a la debilidad del tejido de la capa de abscisión (Burson et al., 1983). Un mecanismo de herencia simple condicionado por uno o dos genes dominantes ha sido propuesto para describir la herencia de la caída de cariopses (Woods & Clark, 1976). En los últimos años se han realizado numerosos avances en la caracterización de los contribuyentes genéticos involucrados en la regulación del proceso de abscisión. El uso de *Arabidopsis*, para la cual están disponibles extensas herramientas genéticas y moleculares, permitió un rápido avance en la comprensión de cómo se regula este proceso. Se describieron diferencias entre plantas dehiscentes y no dehiscentes en relación a la densidad de la capa de abscisión, el tamaño de las células del esclerénquima y el parénquima, los niveles de enzimas hidrolíticas y la lignificación (Patterson, 2001). Los estudios anatómicos y fisiológicos comparativos en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* revelaron que la dehiscencia es muy similar al mismo proceso en *Brassica* (Spence et al., 1996).

Dado que la manipulación de la dehiscencia podría mejorar el rendimiento de los cultivos, los científicos han centrado su atención en este proceso. Estudios fisiológicos de la década de 1970 se centraron en frutas como el algodón y la nuez (Lipe & Morgan, 1972), mientras que

en la última década, *Brassica napus* se convirtió en el foco de las caracterizaciones morfológicas y moleculares del proceso de dehiscencia (Meakin & Roberts, 1990a; Meakin & Roberts, 1990b; Roberts et al., 2000).

Desde el punto de vista fisiológico, la germinación es un proceso por el cual una semilla seca y viable absorbe agua y se hidrata (imbibición) para finalmente extender su eje embrionario o radícula a través de las cubiertas seminales (protrusión). De acuerdo a esto, una semilla germinada es aquella que presenta la radícula visible. La mayoría de las semillas forrajeras poseen un estado de dormición definido por factores mecánicos propios que impiden o retrasan la entrada de agua y oxígeno necesarios para la germinación (Doria, 2010).

Para caracterizar la diversidad genética de una especie, suelen evaluarse caracteres morfológicos mediante la utilización de descriptores fenotípicos asociados a variables de interés. El valor potencial del uso de marcadores morfológicos como criterio de selección ha sido tradicionalmente reconocido por los mejoradores constituyendo el primer paso en la descripción de una colección. Dentro de los programas de mejora, estos caracteres permiten la identificación de rasgos de interés y la selección de genotipos sobresalientes, que pueden ser potencialmente registrados y liberados como cultivares (Do Valle, 2001).

Evaluar la diversidad genética en especies de producción forrajera es un punto de partida sustancial para poder identificar aquellos materiales candidatos que permitan iniciar programas de mejora (Pham et al., 2011). Los caracteres fenotípicos usualmente utilizados son aquellos asociados al rendimiento forrajero (número y peso de macollos, número de hojas y área foliar, tasa de elongación foliar, tasa de aparición foliar o filocrono) y al rendimiento de semillas (número de macollos reproductivos, área foliar de hoja bandera, número y peso de semillas) (Eggers et al., 2004; Van de Wouw et al., 2009; Gomide, 2011; Sripathi et al., 2013).

Además de los métodos univariados convencionales para evaluar los efectos del genotipo y el ambiente sobre la expresión de los fenotipos, el Análisis de Componentes Principales (ACP) es una herramienta estadística ampliamente utilizada ya que facilita el análisis de la información cuando el número de caracteres evaluados y la cantidad de individuos son elevados. Es un instrumento efectivo de clasificación y de exploración de la variabilidad existente (Cossa, 1990).

El objetivo específico del presente capítulo fue evaluar y caracterizar dos poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* a partir de caracteres morfológicos para obtener materiales distinguibles en cuanto a la caída de los cariopses, comportamiento germinativo y morfología de panoja.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones del ensayo: La muestra de semillas inicial fue cedida por la EEA INTA Rafaela (31°11'41" S; 61°29'55" O; precipitación media anual histórica 959 mm) en octubre de 2015. Las mismas fueron tomadas de un ensayo de pasturas previamente clasificadas y con buen establecimiento de plantas. Durante el mes de noviembre del año 2015 se sembraron dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* (cv. Kapivera y cv. Bambatsi) en vasos plásticos sobre un sustrato compuesto por 50% tierra y 50% vermiculita manteniendo una dinámica diaria de riego. Luego de su germinación y tras dos meses de crecimiento, se trasladaron las plántulas a botellas de 2 litros (Fig. 1.1) manteniendo la misma frecuencia de riego para finalmente, en el mes de marzo de 2016 realizar el trasplante definitivo de 90 plantas de cada cultivar a un lote experimental ubicado en la localidad de Zavalla, Santa Fe, Argentina (33 ° 01 ' S; 60 ° 53 ' W).



Fig. 1. 1. Crecimiento de plantas individuales previo al trasplante.

El lote pertenece a la cátedra de Forrajes de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Rosario) y consta de dos parcelas consecutivas de dimensiones idénticas con una separación entre plantas de 1 metro, sobre las cuales no se realizaron aplicaciones químicas previas, durante ni post trasplante (Fig. 1.2).

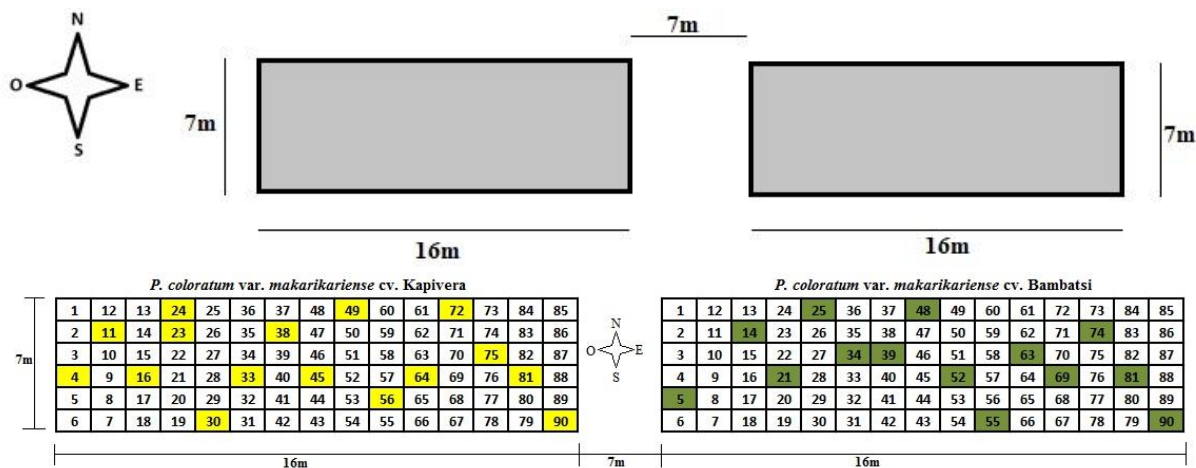


Fig. 1. 2. Distribución de las parcelas del ensayo y colocación de trampas de semillas sobre individuos. (El color señala la localización de las trampas en cada uno de los individuos seleccionados).

Solo se realizaron dos pasadas de un implemento de discos para favorecer el movimiento de tierra y limpiezas manuales del lote durante el avance del experimento. Todas las evaluaciones fenotípicas se realizaron a nivel de planta individual. Debido al ingreso de liebres a las parcelas, fue necesario colocar una malla protectora alrededor de cada una para evitar sucesivos cortes y pérdidas en el stand de plantas. Dicha localidad presenta un clima templado con precipitaciones anuales cercanas a los 990 milímetros, suelo Argiudol típico / vértico conformado por arcillas finas moderadamente bien drenadas e insuficientemente provisto de materia orgánica.

2.2. Dinámica de caída de cariopses: La caída de cariopses fue evaluada semanalmente durante 70 días entre los meses de marzo-mayo de 2017 y 2019 mediante la colocación de trampas sobre 15 inflorescencias al azar de cada cultivar cuando el 80% de las mismas presentaban $\frac{2}{3}$ de antesis, teniendo en cuenta que por cada fila de plantas de la parcela un individuo sea escogido. Las fechas correspondientes a las evaluaciones fueron las siguientes: Para el año 2017 (S₁: 20/03/2017, S₂: 27/03/2017, S₃: 05/04/2017, S₄: 12/04/2017, S₅: 19/04/2017, S₆: 26/04/2017, S₇: 04/05/2017, S₈: 11/05/2017) y para el año 2019 (S₁: 18/03/2019, S₂: 25/03/2019, S₃: 01/04/2019, S₄: 08/04/2019, S₅: 15/04/2019, S₆: 22/04/2019, S₇: 29/04/2019, S₈: 06/05/2019).

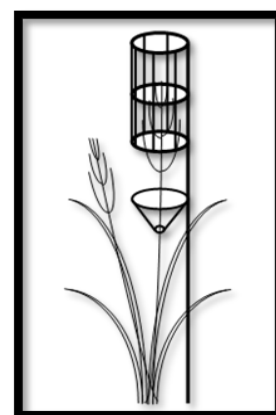


Fig 1. 3. Trampa de cariopses.

Dichas trampas consistieron en una estructura de hierro vertical cubierta por una malla de lycra a la cual se adosaron dos anillos de igual diámetro a una distancia entre los mismos de 30 centímetros, conteniendo un embudo colector de cariopses en la base del segundo anillo (Fig. 1.3).



Las inflorescencias se incorporaron al interior de la trampa mediante una ranura realizada sobre el embudo manteniendo en la mayor medida posible las condiciones naturales de las mismas (Fig. 1.4).

Fig 1. 4. Planta con trampa de cariopses.

En el cultivar Bambatsi mayoritariamente afectado por el ataque de liebres, la fila número 2 no presentaba plantas correctamente desarrolladas, por este motivo no se seleccionó ningún individuo.

Las colectas se realizaron hasta que aproximadamente el 80% de las inflorescencias habían perdido la totalidad de sus cariopses. Antes de iniciar la evaluación correspondiente al segundo año, se realizó un corte de emparejamiento a una altura de 20 cm (Fig. 1.5).



Fig 1. 5. Rebaje de plantas en el ensayo (Septiembre 2018).

Las comparaciones entre cultivares para caída de cariopses se realizaron mediante la prueba no paramétrica de χ^2 .

Adicionalmente a la cantidad y peso de cariopses y antecios vanos semanalmente por planta para cada cultivar (Anexo. Tabla I a, b, c, d), se tomaron datos meteorológicos diarios de precipitaciones (mm), humedad (°H relativa), temperatura (°T) y vientos (fuerza Beaufort) (Anexo. Tabla II a, b). Se decidió progresar en el experimento únicamente con los datos obtenidos para cariopses completos. Los datos de número y peso de cariopses recolectados para cada cultivar y los datos meteorológicos aportados por la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR) fueron volcados en planillas de campo especialmente diseñadas para tal experimento.

2.3. Comportamiento germinativo: Se emplearon 60 cariopses de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera y 150 cariopses de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi. Los mismos fueron recolectados durante el otoño austral del año 2017. Los cariopses se mantuvieron identificados y almacenados en sobres de papel en lugar fresco y seco hasta el momento de su utilización. Los experimentos se realizaron aproximadamente un año después de haber realizado la recolección de los cariopses. Con el objeto de generar distintas abrasiones sobre las cubiertas se definieron 5 tratamientos distintos y 2 condiciones de crecimiento que presentaron variabilidad tanto en luminosidad como en temperatura (Tabla 1.1).

Tabla 1. 1. Planilla de campo

Tratamiento	Condición de crecimiento	Nº tratamiento
C	Cámara	T1
	Invernadero	T2
SG	Cámara	T3
	Invernadero	T4
EPL	Cámara	T5
	Invernadero	T6
CS	Cámara	T7
	Invernadero	T8
CH	Cámara	T9
	Invernadero	T10

Los tratamientos elegidos fueron: Control sin ningún tipo de abrasión (C) definido por cariopses recubiertos por las glumelas -lemma y pálea-, cariopses a los cuales se les han

quitado las glumelas (SG), cariopses con glumelas escarificadas con papel de lija (EPL), cariopses con glumelas sometidas a la acción de calor seco (CS) y cariopses con glumelas sometidas a la acción de calor húmedo (CH) (Fig. 1.6).

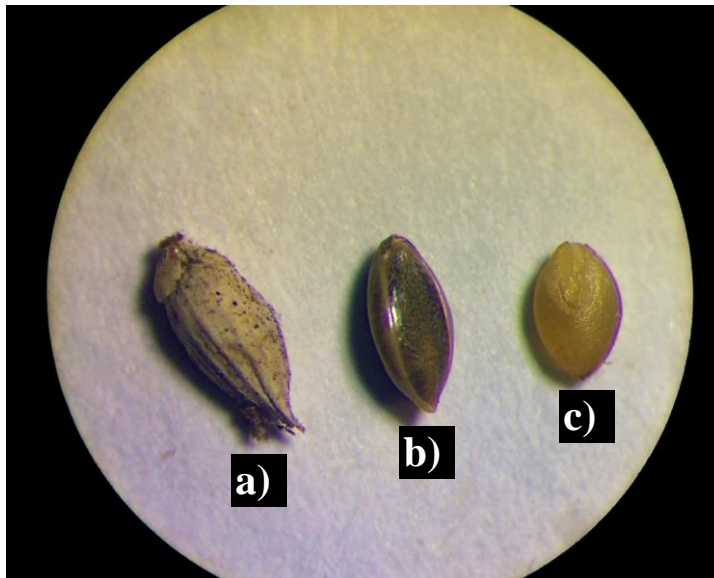


Fig 1. 6. Unidad de dispersión de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*.

a) Espiguilla con glumas, lemma y pálea encerrando un cariopse, más una lemma estéril unida, b) Antecio, con lemma y pálea encerrando un cariopse, c) Cariopse.

Para el tratamiento SG se ha requerido la ayuda de una lupa y un bisturí para quitar completamente la lemma y la pálea. El tratamiento EPL se llevó a cabo colocando cariopses idénticos al control (C) dentro de un frasco pequeño rodeado internamente con papel de lija fina realizando movimientos circulares durante 5 minutos. En relación a los tratamientos CS y CH se sometieron los cariopses (C) a 60°C, en estufa y en agua respectivamente, por 5 minutos en cada caso. Las condiciones de crecimiento utilizadas se establecieron en cámara de crecimiento controlada (con 12 horas de fotoperiodo y 20-25°C) y dentro del invernadero donde estas últimas condiciones son absolutamente variables (Fig. 1.7). Se definieron 3 repeticiones por muestra para aumentar la certeza de los resultados y evitar que algún factor desconocido influya sobre los mismos. Para el cultivar Kapivera se utilizaron dos cariopses por repetición (seis cariopses por cada tratamiento), para el cultivar Bambatsi han sido utilizados cinco cariopses por repetición (quince cariopses por tratamiento).



Fig 1. 7. Tratamientos evaluados bajo diferentes condiciones de crecimiento.

a) Invernadero, b) Cámara de crecimiento.

Luego de ser sometidos a sus respectivos tratamientos, los cariopses se sembraron sobre papel de filtro humedecido con agua destilada dentro de placas de Petri de vidrio y fueron ubicados bajo las distintas condiciones de crecimiento.

La determinación de semillas germinadas se realizó diariamente durante 10 días, volcando los datos en planillas especialmente diseñadas para el experimento. En cada visita, se constataba visualmente el nivel de humedad y se regaba según los requerimientos. La germinación fue considerada como tal cuando la radícula era visible aproximadamente 1 milímetro (protrusión radicular).

Las comparaciones entre cultivares para cada tratamiento y entre tratamientos dentro de cada cultivar se realizaron mediante la prueba no paramétrica de χ^2 .

2.4. Morfología de panoja: Finalizada la cosecha de cariopses en mayo de los años 2017 y 2019, las panojas de cada uno de los individuos evaluados para dicho carácter se cortaron y fueron trasladadas al laboratorio donde se realizaron las siguientes mediciones: *Altura de la panoja (h panoja)*: longitud en centímetros desde la base de la panoja hasta el ápice. *Longitud*

de panoja (l panoja): se mide en centímetros desde el ápice hasta el nudo de la hoja bandera.
Longitud del raquis (l raquis): distancia en centímetros desde el extremo superior hasta la primera ramificación de la panoja (Fig. 1.8).

Las panojas se pesaron (*peso h*) desde el ápice hasta el nudo de la hoja bandera descartando las hojas y se llevaron a estufa a 60°C por 72 horas. Luego, se pesaron (*peso s*) nuevamente para obtener la materia seca (*ms %*) de las mismas.

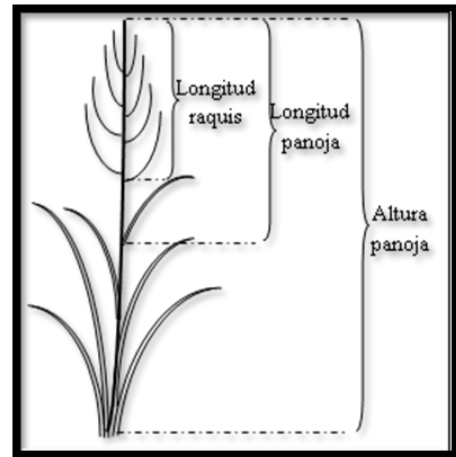


Fig. 1.8. Variables morfológicas asociadas a panoja.

Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks y luego se realizó un ANOVA a dos criterios de clasificación para evaluar el efecto año, genotipo y su interacción para cada una de las variables.

Para visualizar el efecto conjunto de año y cultivar sobre todos los atributos evaluados, se aplicó un análisis multivariado de componentes principales (ACP), que también permitió identificar aquellas variables que explicaron la mayor parte de la variabilidad total contenida en los datos y explorar las correlaciones entre ellos. Finalmente, se aplicó un ACP por año manteniendo la individualidad de cada planta, a fin de visualizar la estructura de variación y verificar si los cultivares muestran una posición diferencial en las dimensiones de mayor variabilidad.

Todos los análisis de los caracteres fenotípicos mencionados se realizaron utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2011).

3. RESULTADOS

3.2. Dinámica de caída de cariopses: Los resultados obtenidos para caída de cariopses por semana (Tabla 1.2) demostraron la existencia de diferencias significativas entre cultivares en los dos años de evaluación ($\chi^2= 18,11$; $p < 0,05$ en 2017 y $\chi^2 = 30,11$; $p < 0,05$ en 2019) (Anexo. Tabla I a, b, c, d).

Tabla 1. 2. Cantidad de cariopses caídos a través del tiempo en dos cultivares de *P. coloratum* var. *makarikariense*. (Ref. S: Semana).

2017	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
Kapivera	0	0	2	18	37	88	115	96
Bambatsi	0	0	5	11	32	155	197	190

χ^2 calc: 18,11. $\alpha=0,05$. GL=7

2019	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
Kapivera	0	0	0	24	44	81	114	149
Bambatsi	0	0	5	12	34	165	204	224

χ^2 calc: 30,11. $\alpha=0,05$. GL=7

Sin embargo, en la Fig. 1.9 (a, b) se graficó el porcentaje acumulado de cariopses caídos por cultivar, observándose en los dos años un comportamiento similar entre ellos hasta la semana 4, a partir de la cual comenzaron a visualizarse diferencias en la caída hasta la semana 7 en 2017 y la 6 en 2019.

El cultivar Bambatsi produjo una mayor cantidad de cariopses totales, por eso en números absolutos a lo largo de los 2 años de estudio evidencia una caída más notable. No obstante, cuando se calcularon los valores en proporción, se observó que entre la semana -5 y la 7 en 2017- y la -5 y la 6 en 2019-, el porcentaje acumulado de cariopses caídos fue mayor en Kapivera. El pico de caída para el conjunto de datos de los años 2017 y 2019 se dio en la misma fecha para ambos cultivares, aunque eso signifique, como se presentó previamente, lapsos de semanas distintos (Anexo. Fig. I a, b).

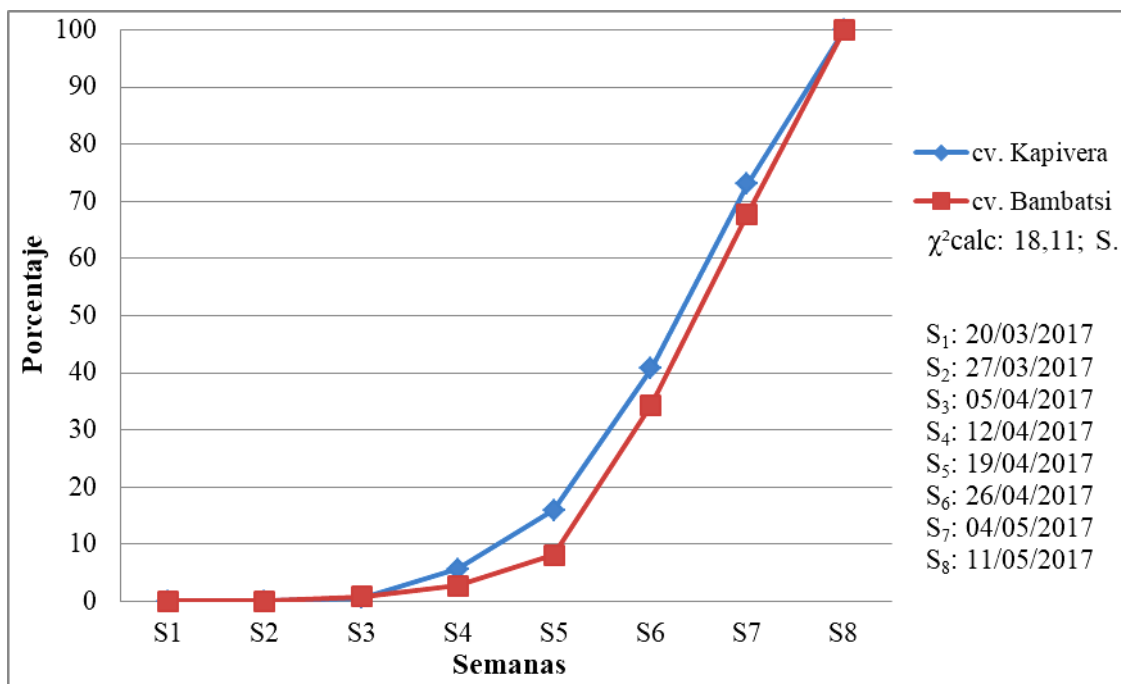


Fig. 1. 9 a. Porcentaje acumulado de cariospes caídos por cultivar (2017).

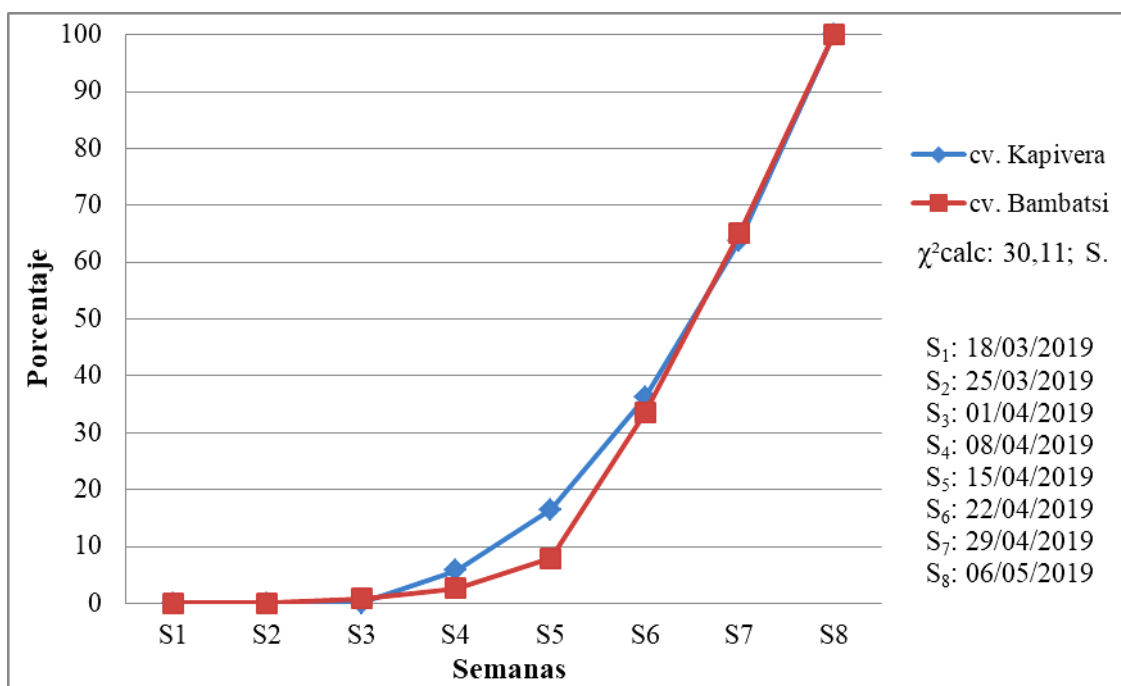


Fig. 1. 9 b. Porcentaje acumulado de cariospes caídos por cultivar (2019).

3.3. Comportamiento germinativo: No se encontraron diferencias significativas entre cultivares para los diferentes tratamientos (Fig. 1.10) (Anexo. Tabla III a, b) ni entre tratamientos dentro de cada cultivar (Fig. 1.11) (Anexo. Tabla III c, d, e, f).

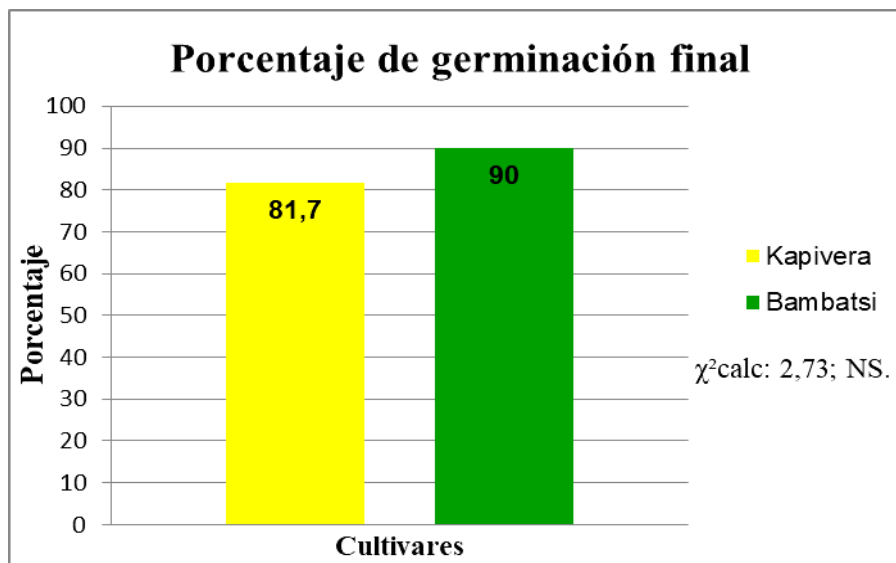


Fig. 1. 10. Porcentaje de germinación final para cada cultivar de *P. coloratum* var. *makarikariense* a los 10 días de iniciado el experimento.

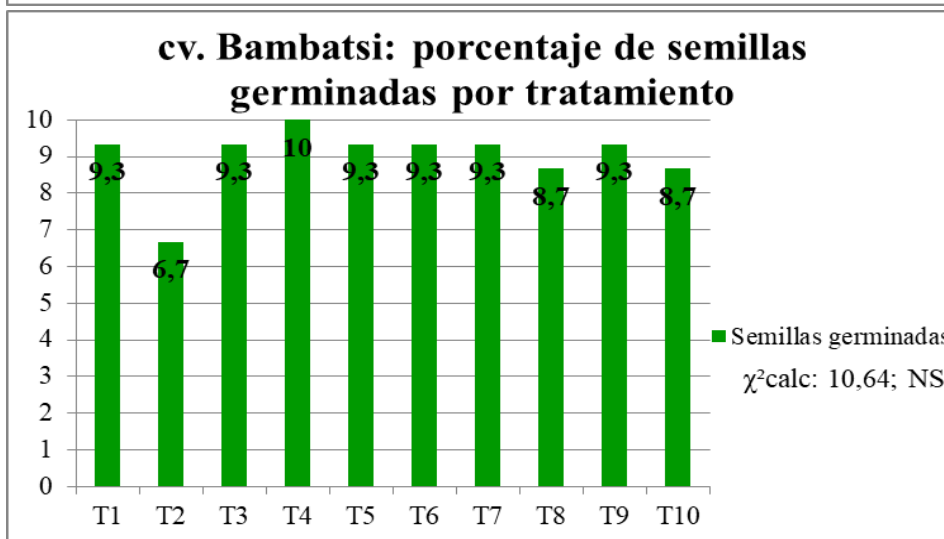
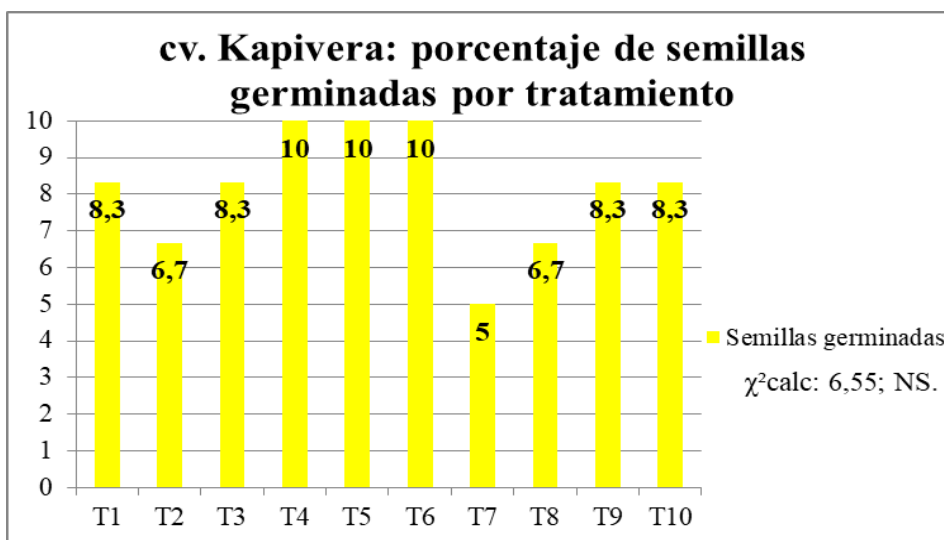


Fig. 1. 11. Representación porcentual de cada tratamiento al porcentaje de germinación total para cada cultivar.

3.4. Morfología de panoja: Para los años 2017 y 2019, todas las variables analizadas mediante el test Shapiro-Wilks se distribuyeron normalmente, a excepción de peso seco, que debió ser transformada por la función logarítmica. Los valores medios de cada variable por cultivar y por año se presentaron en la Tabla 1.3.

Tabla 1. 3. Valores medios y desvío estándar de las variables morfológicas analizadas sobre individuos de *P. coloratum* var. *makarikariense* durante los dos años de evaluación, ($p = 0,05$).

	2017		2019	
	Kapivera	Bambatsi	Kapivera	Bambatsi
h panoja (cm)	119,5 ± 7,39	121 ± 6,03	128,38 ± 7,17	128,25 ± 5,85
l panoja (cm)	42,38 ± 2,74*	56,67 ± 2,23*	50,13 ± 2,9*	61,83 ± 2,37*
l raquis (cm)	21,13 ± 1,8*	29 ± 1,47*	25 ± 1,81*	33,25 ± 1,48*
peso h (gr)	7,19 ± 1,25	8,94 ± 1,02	7,83 ± 1,25	9,42 ± 1,02
peso s (gr)	2,52 ± 0,44	3 ± 0,36	3,24 ± 0,46	3,43 ± 0,37
ms (%)	36,39 ± 1,56*	33,48 ± 1,28*	42,83 ± 2,21*	37,06 ± 1,81*

Los asteriscos representan conjuntamente diferencias significativas encontradas entre cv. para el año en estudio, y entre años para un mismo cultivar.

No hubo diferencias significativas entre cultivares ni entre años para las variables altura de panoja, peso húmedo y peso seco, en tanto que para longitud de panoja, longitud de raquis y porcentaje de materia seca se encontraron diferencias significativas entre cultivares y entre años. La interacción cultivar por año no fue significativa para ninguna variable. Para las variables en las que el ANOVA a dos criterios de clasificación detectó diferencias significativas, éstas fueron siempre de mayor magnitud para el criterio de clasificación cultivar que para año, presentando cv. Kapivera los menores valores de longitud de panoja y de raquis y los mayores valores de porcentaje de materia seca. Por otro lado, en 2019 los valores de las tres variables fueron significativamente mayores que los de 2017.

En el Análisis de Componentes Principales de los datos en conjunto (Fig. 1.12), en el que cultivares y años se combinaron como fuentes de variación resultando en 4 puntos a visualizar (Kapivera 2017, Kapivera 2019, Bambatsi 2017 y Bambatsi 2019), las dos primeras Componentes Principales explicaron el 99,6% de la variabilidad total observada (68,7% por CP1 y 30,9% por CP2).

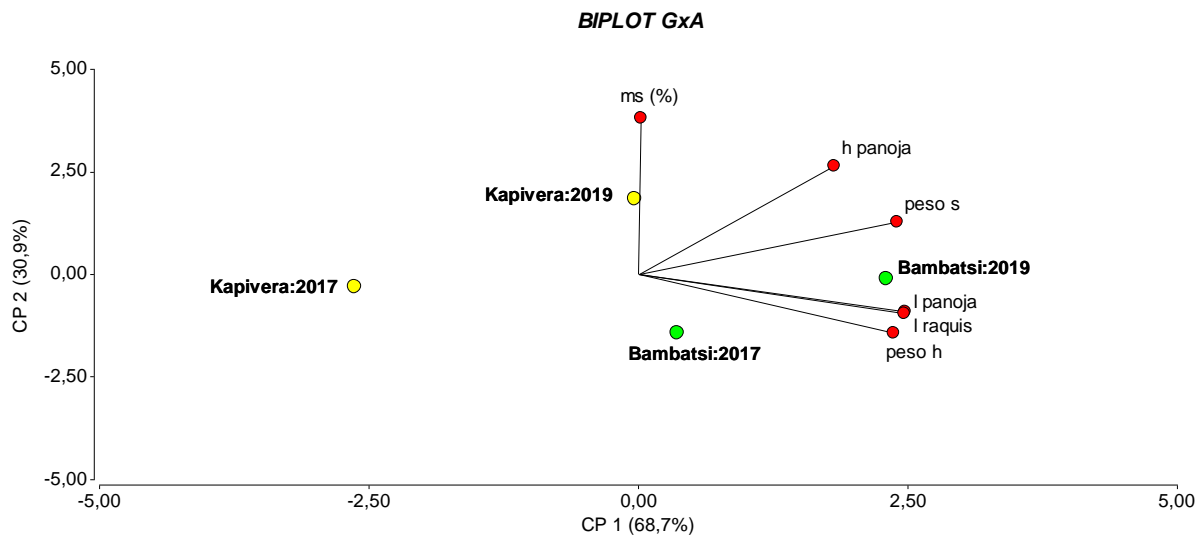


Fig. 1. 12. Análisis de Componentes Principales tomando en forma conjunta cada cultivar y cada año de estudio.

Se encontraron correlaciones positivas, altas y significativas entre longitud de panojas, longitud de raquis y peso húmedo, siendo estas variables junto a peso seco las que presentan contribuciones mayores a 0,45 a la composición de CP1. Respecto a CP2, las mayores contribuciones a su composición la hacen, en forma positiva, porcentaje de materia seca y altura de panoja (Tabla 1.4).

Tabla 1. 4. Autovectores del conjunto de ACP.

<u>Variables</u>	<u>CP1</u>	<u>CP2</u>
h panoja	0,35	0,51
l panoja	0,48	-0,17
l raquis	0,48	-0,18
peso h	0,46	-0,28
peso s	0,46	0,25
<u>ms (%)</u>	<u>0,01</u>	<u>0,73</u>

En concordancia, en la Fig. 1.12 se observa que cv. Bambatsi se encuentra más a la derecha del gráfico, siendo más extremo en el año 2019 que en 2017 pues, como se mencionó previamente, este cultivar y este año presentaron los mayores valores para longitud de panoja y de raquis, variables estrechamente asociadas a CP1 y que mostraron diferencias significativas entre años y entre cultivares. Por otro lado, Kapivera 2017 se encuentra más a la izquierda de CP1, pues sus valores de longitud de panoja y de raquis fueron significativamente menores, siendo destacable que Kapivera 2019 se ubicó cercano a Bambatsi 2017 en la dirección de CP1 pero distante en la dirección de CP2 porque, como lo demostró ANOVA, Kapivera tenía en general un mayor porcentaje de materia seca (una

variable altamente asociada con CP2) que Bambatsi, diferencias que de hecho fueron más notables en 2019.

Con respecto a los Análisis de Componentes Principales por año, en 2017 la primera CP explicó un 52,4% de la variabilidad total observada; y CP2, un 22,9% (en total, 75,3%). Las variables longitud de raquis y de panoja contribuyeron en forma positiva tanto a CP1 como a CP2, en tanto que altura de panoja, peso seco y peso húmedo contribuyeron en forma positiva a CP1 y negativa a CP2. Porcentaje de materia seca, por otro lado, contribuyó negativamente tanto a CP1 como a CP2 (Tabla 1.5).

Tabla 1. 5. Correlación entre cada CP y las variables que la componen, en cada año de evaluación.

Variables	Año 2017		Año 2019	
	CP 1	CP 2	CP 1	CP 2
h panoja	0,75	-0,45	0,72	-0,41
l panoja	0,71	0,58	0,68	0,58
l raquis	0,70	0,56	0,70	0,62
h peso	0,88	-0,25	0,88	-0,34
s peso	0,88	-0,40	0,80	-0,54
ms (%)	-0,19	-0,54	-0,52	-0,41

Correlación cofenética = 0,943 (Año 2017), 0,953 (Año 2019)

Concomitantemente, en el espacio definido por ambas CPs (Fig. 1.13) se observa que las plantas de cv. Bambatsi tienden a ubicarse en la parte superior del gráfico, pues presentaron valores de longitud de panoja y de raquis significativamente mayores a las de cv. Kapivera (cuyas plantas tienden a presentarse en la parte inferior del gráfico).

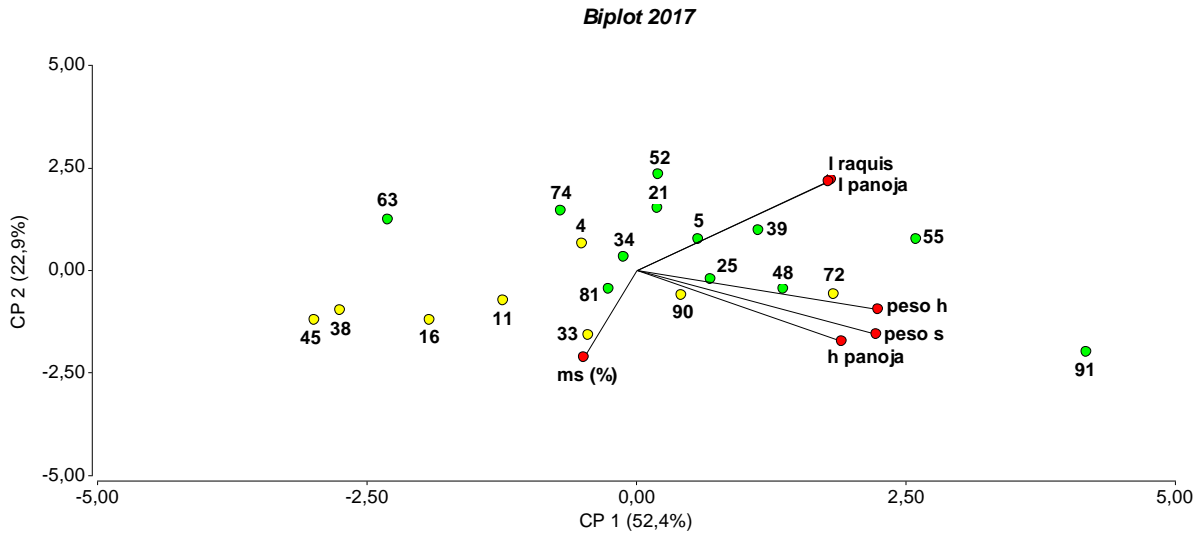


Fig. 1.13. Análisis de Componentes Principales 2017.

(El color amarillo representa individuos del cv Kapivera, el color verde representa individuos del cv Bambatsi y el color rojo representa las variables analizadas).

Por otro lado, se encontraron en 2017 correlaciones altas y positivas entre las variables peso seco y peso húmedo (coeficiente de correlación: 0,96), y longitud de raquis y longitud de panoja (coeficiente de correlación: 0,86).

Para el año 2019 (Fig. 1.14), el comportamiento de las variables es similar al del 2017, aunque el porcentaje de variación total explicado por ambas CP es levemente mayor (77%) debido a un aumento en la proporción atribuida a CP2 (24,5%, manteniendo CP1 el 52,5%).

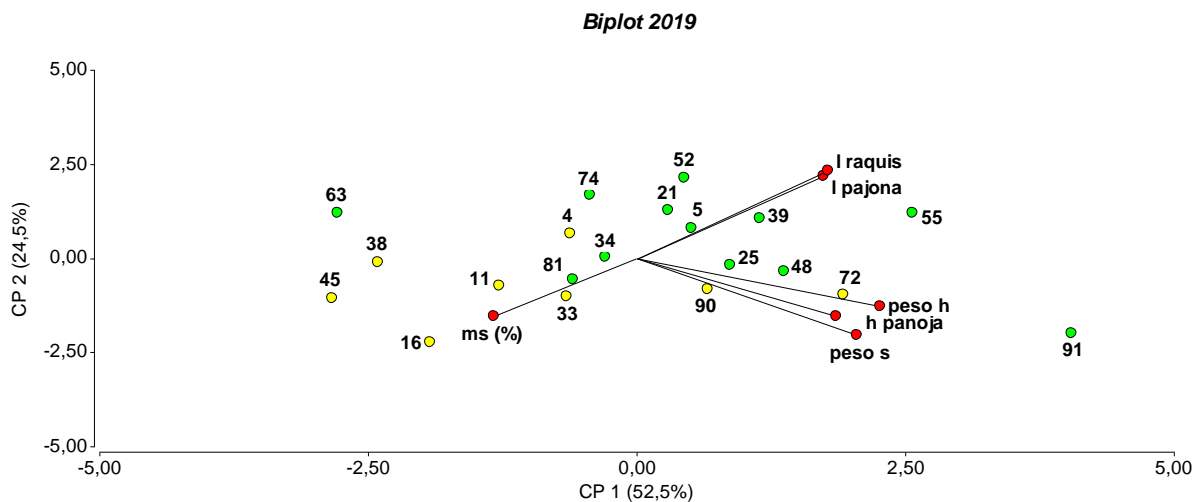


Fig. 1.14. Análisis de Componentes Principales 2019.

(El color amarillo representa individuos del cv Kapivera, el color verde representa individuos del cv Bambatsi y el color rojo representa las variables analizadas).

De hecho, en el año 2019 la contribución negativa del porcentaje de materia seca a PC2 es menor que en 2017 (Tabla 1.5), lográndose una mayor diferenciación (Fig. 1.14) entre las plantas de cv. Bambatsi (que tienden a ubicarse en el sector derecho superior del gráfico) de las de cv. Kapivera que tienden a ubicarse en el extremo izquierdo inferior del gráfico. El orden de correlaciones en 2019 se mantiene respecto a 2017 (longitud de raquis con longitud de panoja muestran un coeficiente de correlación de 0,82; en tanto que peso seco y peso húmedo presentan un coeficiente de correlación: 0,93), mostrando leves modificaciones que pueden explicar los cambios observados entre ambos biplots. Cabe destacar que tanto para el año 2017 como el 2019, adicionando una tercera componente principal, la variabilidad total explicada de los datos se incrementa hasta el 91%. La misma continuó siendo menor, no obstante, a la explicada con sólo dos CPs en el análisis conjunto.

4. DISCUSIÓN

En Argentina, la región Pampeana norte se caracteriza por sus altas temperaturas, lluvias concentradas y alta evapotranspiración en el verano. Además, evidencia bajas temperaturas y carencia de lluvias en el invierno. La presencia de suelos poco desarrollados, con bajo contenido de materia orgánica, sin estructura, con baja retención de humedad y en muchos ambientes con suelos salinos y/o encharcados, son factores importantes a tener en cuenta en el momento de elegir una especie forrajera (Pérez, 2005). Debido a estas características ha sido necesario avanzar en la búsqueda de especies que posean persistencia, alta productividad, resistencia al pastoreo y calidad de forraje (Pérez, 2005).

Se han reportado numerosos estudios sobre caracteres fenotípicos en distintas especies de gramíneas forrajeras de gran interés agronómico, evidenciando la importancia de seleccionar aquellas especies que resulten de utilidad en sistemas intensivos (recría/invernada) con condiciones extremas de estrés abiótico resaltando sus implicancias en el mejoramiento genético vegetal y en la producción de semillas. La cantidad de producto que un agricultor obtiene por cada unidad de superficie depende de múltiples factores naturales y humanos, la producción de forraje no necesariamente predice la producción secundaria de carne, leche o lana (Meissner, 1997; Smith et al., 1997). En este sentido, la desarticulación y caída de cariopses siempre ha sido un componente principal de la pérdida de rendimiento en muchos cultivos de cereales en todo el mundo debido a la imposibilidad de cosechar semilla de calidad apta para su comercialización.

Panicum coloratum es una especie que ha sido estudiada en una gran variedad de aspectos (Bryant, 1967; Pritchard & De Lacy, 1974; Taleisnik et al., 1998; Komatsu et al., 2007), pero en cuanto a la var. *makarikariense* los estudios han sido realmente muy escasos. Por este motivo, es esperable encontrar variabilidad morfológica para los caracteres de interés si consideramos su baja exposición a procesos de mejora.

Respecto a la caída de cariopses, en el presente trabajo puede observarse una dinámica de caída distinta para cada cultivar en ambos años de estudio, coincidiendo el “pico de caída” para el conjunto de los datos durante los primeros días de mayo (aunque eso signifique semanas distintas en ambos años de estudio respondiendo a una cuestión logística de evaluación) sin evidenciarse influencia de factores climáticos externos. Estos valores difieren de lo reportado por Dreher et al. (2008), quienes evaluaron la dehiscencia sobre poblaciones

de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* provenientes de distintas zonas de Argentina (Córdoba y Corrientes) encontrando dos picos de caída de cariopses influenciados respectivamente por intensos temporales de vientos y lluvias. En este caso, los autores sugirieron que las semillas debieron encontrarse maduras para que la dehiscencia sea afectada por factores ambientales (entendiéndose por dehiscencia lo que en el presente trabajo se denomina caída).

En correspondencia a lo planteado por Burson et al. (1983) en sus investigaciones, la experiencia de nuestro trabajo también reporta que los primeros cariopses comenzaron a desprenderse de la planta madre a los 15 días de iniciada la floración.

Los resultados obtenidos en el análisis de germinación no demostraron efectos que respondan a una asincronía madurativa presente en los cultivares, aun cuando se evaluaron las semillas bajo distintos métodos de escarificación y condiciones de crecimiento. Estos resultados acuerdan con lo reportado por Maina (2012). Los resultados mencionados fueron esperables considerando que se evaluaron semillas maduras y carentes de dormición, asegurando que el período entre su cosecha y la realización del ensayo superó el tiempo de 6 meses reportado por Tischler & Young (1987) para *Panicum coloratum*. Por dicho motivo, las diferencias existentes en la dinámica de caída de cariopses no afectaron la germinación posterior de semillas, observándose altos porcentajes de la misma en ambos cultivares. En concordancia a lo informado por Tischler & Ocumpaugh (2004), los elevados porcentajes de germinación obtenidos sugieren que las semillas se encuentran maduras al momento de desprenderse de la planta madre, independientemente del momento en que esto suceda. Esta información también concuerda a lo reportado anteriormente por Dreher et al. (2008) referido a la madurez de las semillas previo a su dehiscencia.

La evaluación de los caracteres relacionados a la morfología de panoja indicaron que las diferencias encontradas entre cultivares respecto a los caracteres “longitud de panoja” y “longitud de raquis” se relacionaron a la arquitectura de la vegetación, ya que el cultivar Bambatsi presentó plantas más altas y más erectas que el cultivar Kapivera. Sería interesante poder explicar en otro estudio, si el mayor número de cariopses caídos en el cultivar Bambatsi se debió a un mayor desarrollo de los mismos favorecido por el mayor tamaño de panoja, expresado en los altos valores de “longitud de panoja” obtenidos. Las diferencias encontradas entre cultivares para el carácter “ms (%)” han fortalecido la apreciación visual de que el

cultivar Kapivera desarrolla un hábito de crecimiento fundamentalmente rastrero, con una mayor producción de biomasa cubriendo los entresurcos. Así mismo, los mayores valores de las variables expresados para el año 2019 se debieron exclusivamente a la ontogenia de las plantas del ensayo.

Mediante un Análisis de Componentes Principales de todos los datos en conjunto, fue posible explicar la totalidad de la variación de los mismos con las primeras dos componentes principales debido a la alta correlación entre variables. En el gráfico biplot (Fig. 1.12) pudo definirse la CP1 asociada al año de estudio, y la CP2 asociada directamente al cultivar. Podría decirse que ésta última componente principal es la que diferencia los años 2017 y 2019. Corroborando los resultados obtenidos en el análisis univariado y en el análisis de la interacción, resulta importante destacar la ubicación de los puntos representativos del año 2019 sobre la CP1 a la derecha de la gráfica. La CP2 permitió discriminar ambos cultivares en años diferentes, probablemente debido a la interacción genotipo x ambiente significativa que exhibieron las variables que mayor aporte realizaron a ésta CP.

El ACP para cada año en estudio, por otro lado, mantiene la importancia de cada característica evaluada respecto al análisis conjunto debido a la carencia de interacción GxA significativa observada en general (a la variabilidad general). Además, pone de manifiesto la inexistencia de un agrupamiento definido de las plantas respecto al cultivar al cual corresponden, que resulta más notorio en 2017 que en 2019, debido posiblemente a que la evaluación temprana resultó menos representativa de las diferencias entre cultivares que una más tardía (Senanayake et al., 1994). Es lógico encontrar estos resultados si suponemos que el cultivar Kapivera fue desarrollado a partir de una selección dentro del cultivar Bambatsi. También pueden visualizarse correlaciones esperadas entre un determinado grupo de variables, que además, de acuerdo al largo del vector, parecen tener similar importancia al momento de discriminar los cultivares. Las variables “l raquis” y “l panoja” presentaron una correlación fenotípica, y posiblemente una correlación genética debido a las diferencias significativas encontradas para ambas en el ANOVA. En cuanto a las variables “peso s” y “peso h” las correlaciones fueron de tipo fenotípica (ambiental) tanto en el año 2017 como durante el año 2019.

Al igual que lo planteado por Balanzà et al. (2016) en *Arabidopsis*, es probable que exista una concepción basada en que el menor tamaño de panoja conlleva a una reducción de la

asincronía madurativa de los cariopses en *Panicum coloratum* var. *makarikariense*, resultando naturalmente en una disminución de su caída (Balanza et al., 2016). Esto se respalda en los menores valores encontrados en el cultivar Kapivera para las variables relacionadas a panoja (“l panoja”, “h panoja” y “l raquis”), resultando en una reducción del total de cariopses caídos en comparación con el cultivar Bambatsi. Complementariamente a estos resultados, es probable que mejores condiciones climáticas hayan permitido expresar sus diferencias en el fenotipo de las plantas (Schlichting, 1986).

Debido a que las variaciones fenotípicas mencionadas fueron observadas en plantas que crecieron bajo condiciones homogéneas (suelo y clima), sería interesante pensar en utilizar estos caracteres como fuente de variación para programas de mejoramiento.

Una apreciación visual durante el ciclo del experimento determinó un mayor desarrollo vegetativo y una mayor cantidad de macollos reproductivos por planta por parte del cultivar Kapivera en relación al cultivar Bambatsi. Además, para la totalidad de las evaluaciones en los dos años de estudio, el cv. Kapivera presentó los mayores valores medios para % ms. Por lo tanto, dicho cultivar constituye un material interesante para seleccionar en relación a la producción de forraje.

Debido al escaso avance en el conocimiento del comportamiento de los principales caracteres fenotípicos asociados a rendimiento de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*, resulta fundamental proveer información sobre los mismos a fin de ofrecer nuevas herramientas que asistan al mejoramiento genético de cultivos en la búsqueda de un incremento en el rendimiento (granos y forraje) y en la mayor calidad de frutos obtenidos en función de los requerimientos de los sistemas de producción actuales.

5. CONCLUSIONES

En referencia a las caracterizaciones de los dos cultivares de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* (cv. Kapivera y cv. Bambatsi) de la Región Pampeana Argentina, no se encontraron diferencias en el comportamiento germinativo y en los rasgos de morfología de panoja: altura de la panoja, peso húmedo y peso seco. En cambio, se detectaron diferencias en: la dinámica de caída de los cariopses, longitud de la panoja, longitud del raquis y porcentaje de materia seca entre los cultivares y entre los años de evaluación, pero dentro de la interacción genotipo x año la diferencia no fue significativa. El comportamiento de dicha especie megatérmica fue adecuado en ambos cultivares analizados, por lo tanto, es factible recomendar su cultivo en regiones templadas de la Pampa argentina.

CAPÍTULO II. ESTIMACIÓN DE LA HEREDABILIDAD EN SENTIDO ESTRICTO **(h²) PARA LA CAÍDA DE CARIOPSES EN *Panicum coloratum* var. *makarikariense***

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, el desarrollo de nuevos cultivos con mejoras en determinados caracteres agronómicos no ha sido una tarea sencilla para los mejoradores debido a que dichos rasgos, por su naturaleza poligénica, se encuentran influenciados por su genotipo, por el ambiente y por la interacción genotipo x ambiente (Falconer, 1986). Por este motivo, antes de desarrollar un programa de mejora, resulta indispensable conocer la variabilidad genética disponible en el material y la heredabilidad de los rasgos agronómicos (Dudley & Moll, 1969; Baker et al., 1971). Dado que la respuesta a la selección para un carácter cuantitativo es directamente proporcional a la heredabilidad y al diferencial de selección (que depende de la variancia fenotípica), estos parámetros expresan el potencial de mejora genética de la población en cuestión (Baker et al., 1971; Novoselovic et al., 2004).

En todo proceso de selección es necesario estimar cuantitativamente los componentes genéticos de interés forrajero y la estabilidad de los materiales evaluados, debido a que, la variación existente entre individuos es el resultado de la variación genética en conjunto con el efecto ambiental. Resulta de suma importancia conocer qué proporción de la variación total presente en el germoplasma es atribuible a factores genéticos, principalmente aquella debida a efectos aditivos. Usualmente suelen utilizarse caracteres morfológicos para caracterizar la variabilidad genética presente en una población. La respuesta de las poblaciones a la selección depende de la magnitud de la variación genética para el rasgo en estudio, de la heredabilidad y de la intensidad de selección aplicada (Falconer, 1986; Walker Rose, 2005).

Un mecanismo de herencia simple condicionado por uno o dos genes dominantes ha sido propuesto para describir la herencia de la dehiscencia de semillas en arroz silvestre (Woods & Clark, 1976).

En *Panicum coloratum*, Young (1991) logró demostrar la existencia de variación genética para el carácter de retención de semillas con una heredabilidad estimada moderada de aproximadamente 0,40; con ganancias genéticas para el primer ciclo de selección cercanas al 21%. Si bien se detectó una amplia variación genética, los valores de heredabilidad fueron relativamente bajos a moderados. En otros estudios llevados adelante en la EEA INTA

Rafaela para *Panicum coloratum* var. *makarikariense* se obtuvieron estimaciones de componentes de varianza genéticos y ambientales y correlaciones genéticas de caracteres relacionados a vigor de plántula (Dreher, 2011). En ensayos realizados en familias de medios hermanos se determinó que la heredabilidad de la retención de semillas entre los 400 y 500 grados días después de anthesis sería de 0,4, prometiendo una ganancia de casi 27% en respuesta a una selección con una intensidad del 10% (Maina, 2012).

El conocimiento de los mecanismos genéticos que controlan la herencia de un carácter y el impacto de los factores genéticos y ambientales en su expresión, son esenciales para tener un programa de mejoramiento exitoso.

La heredabilidad en sentido estricto (h^2), es igual a la proporción de varianza genética aditiva sobre la fenotípica, y refleja la proporción de la varianza fenotípica que es debida a diferencias entre efectos genéticos aditivos. Un valor aditivo alto revelará que los padres con mayores valores fenotípicos para el carácter bajo estudio tendrán hijos también con valores superiores, pareciéndose más a sus padres que al promedio de la población. Cuanto mayor sea el componente de variación genética aditiva en la manifestación del carácter, mayor será el parecido entre hermanos de una misma familia en relación al parecido con hermanos de distintas familias (Falconer, 1986; Cubero, 2003). La h^2 es indicada como la más apropiada, dado que expresa el grado de parecido entre parientes. Es relevante conocer la varianza genética aditiva para poder predecir la respuesta a la selección, ya que a partir de esta última y de la intensidad de su aplicación dependerá el efecto de la selección (Nguyen & Sleper, 1983a; Griffiths et al., 2002). Una alta respuesta a la selección (o ganancia genética) sumada a una alta heredabilidad estimada, resulta una condición sumamente favorable para lograr obtener buenos resultados. (Larik et al., 2000).

La magnitud de la heredabilidad estimada depende de la población bajo estudio y de su tamaño, de las condiciones ambientales y del método de estimación (Acquaah, 2007). El análisis de regresión lineal es una técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre variables y se adapta a una amplia variedad de situaciones. En Genética Cuantitativa, dicho análisis se emplea para relacionar los valores medios de los caracteres medidos en los padres y las medias de la progenie, cuando son evaluados juntos en experimentos bajo ambientes similares (Nguyen & Sleper, 1983a). Asume que no existen efectos epistáticos y que las covarianzas entre los padres y su descendencia son una estimación de la mitad de la varianza

aditiva en la población de referencia, dado que son familias de medios hermanos (Nguyen & Sleper, 1983a; Falconer & Mackay, 1996). El coeficiente de regresión lineal simple (en el que los valores asumidos por la progenie son la variable dependiente y los valores obtenidos de los padres constituyen la variable independiente) es la proporción de la covarianza entre padres y su descendencia y las varianzas fenotípicas de los padres.

$$b = \frac{\sigma_{PO}}{\sigma^2_P} = \frac{1/2 \sigma^2_A}{\sigma^2_P}$$

σ_{PO} = covarianza progenie/progenitor

σ^2_A = varianza aditiva

σ^2_P = varianza fenotípica

El doble de la pendiente de la recta de la regresión, cuando sólo se dispone de datos fenotípicos de un único progenitor, representa la heredabilidad en sentido estricto (Falconer, 1986).

$$b = 1/2 h^2 \rightarrow h^2 = 2.b$$

Este método de estimación de la heredabilidad ha sido citado en la bibliografía para diversas especies tales como *Panicum virgatum*, *Parthenium argentatum* y *Oriza* sp. (Boe, 2003; Ray et al., 2007; Sabu et al., 2009). En dicho modelo de regresión también pueden evaluarse dos variables, en este caso para la variable dependiente se seleccionó la progenie y la variable independiente o regresora se seleccionó el valor de los padres.

Puesto que *P. coloratum* var. *makarikariense* es una especie principalmente alógama que no evidencia problemas de fertilidad, se espera encontrar variabilidad genética para el carácter cuantitativo en estudio.

El objetivo de este capítulo fue estimar la heredabilidad en sentido estricto del carácter caída de cariopses mediante el método de Regresión Progenie – Progenitor.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones del ensayo: Las semillas utilizadas para llevar a cabo el presente ensayo fueron recolectadas durante el análisis de caída realizado entre los meses de marzo y mayo de 2017. Las plantas progenitoras utilizadas para realizar este análisis de heredabilidad se tomaron al azar de cada cultivar, por lo que representaron una muestra significativa de la variabilidad morfológica presente respecto al carácter de caída de cariopses. El ensayo estuvo conformado por 7 familias de medio-hermanos (3 familias pertenecientes al cultivar Kapivera y 4 familias pertenecientes al cultivar Bambatsi) dispuestas sobre un lote experimental perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en la localidad de Zavalla, Santa Fe, Argentina ($33^{\circ} 01' S$; $60^{\circ} 53' W$). Las semillas se sembraron en el mes de enero de 2018 en vasos plásticos sobre un sustrato compuesto por 50% tierra y 50% vermiculita manteniendo la misma dinámica diaria de riego. Luego de su germinación, se trasladaron las plántulas a botellas de 2 litros manteniendo la frecuencia de riego para finalmente, en el mes de agosto del mismo año realizar el trasplante definitivo de las plantas a un lote experimental ubicado continuo al lote de los padres. El mismo consta de una parcela de 21 metros de largo y 7 metros de ancho, con una separación entre plantas de 1 metro, sobre las cuales no se realizaron aplicaciones químicas previas, durante ni post trasplante (Fig. 2.1).

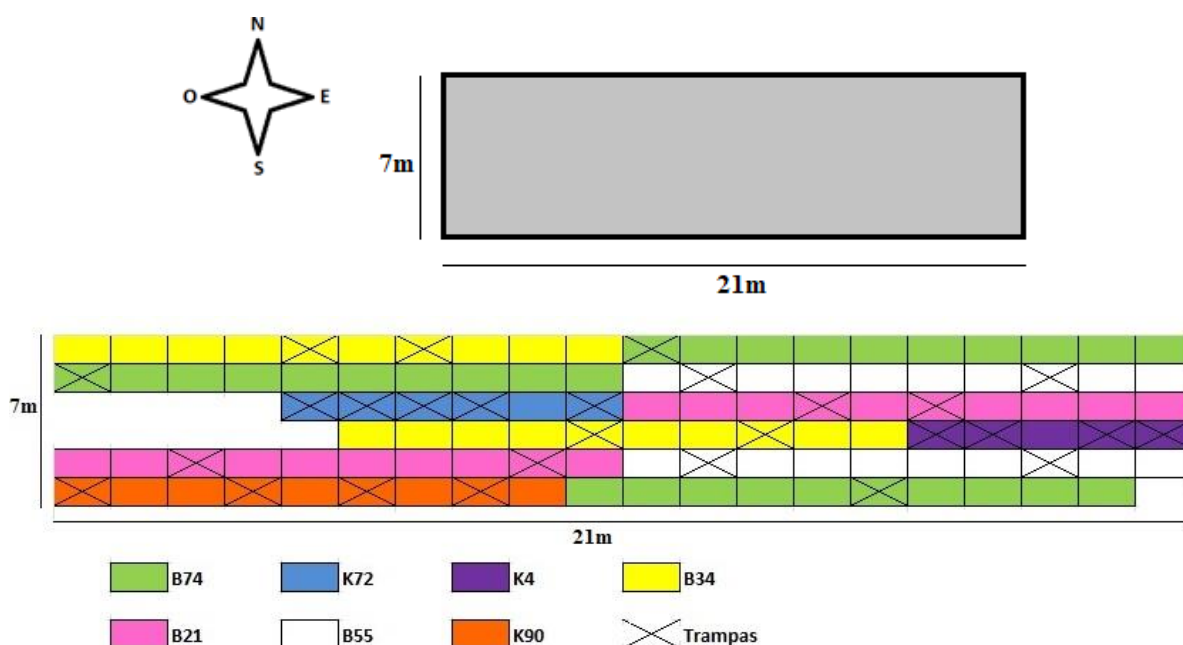


Fig. 2. 1. Distribución de las parcelas del ensayo con individuos de las 7 familias de medio-hermanos.

Previo al trasplante (Fig. 2.2) también se realizaron dos pasadas de un implemento de discos para favorecer el movimiento de tierra y sucesivas limpiezas manuales del lote durante el avance del experimento.



Fig. 2. 2. Trasplante de las plántulas de *P. coloratum* var. *makarikariense* al lote experimental.

2.2. Dinámica de caída de cariopses en la progenie: La caída de cariopses fue evaluada semanalmente a nivel de planta individual sobre 13 plantas del cultivar Kapivera y 15 plantas del cultivar Bambatsi entre los primeros días del mes de febrero y los días finales del mes marzo de los años 2019 y 2020, mediante la colocación de trampas sobre inflorescencias al azar cuando el 80% de las mismas presentaban $\frac{2}{3}$ de antesis (Fig. 2.3). Antes de iniciar la evaluación correspondiente al segundo año, se realizó un corte de emparejamiento en octubre de 2019 a una altura de 20 cm.



Fig. 2. 3. Trampa de cariopses colocadas sobre plantas al azar.

Las fechas correspondientes a las evaluaciones fueron las siguientes: Para el año 2019 (S₁: 08/02/2019, S₂: 15/02/2019, S₃: 22/02/2019, S₄: 01/03/2019, S₅: 08/03/2019, S₆: 15/03/2019, S₇: 22/03/2019, S₈: 29/03/2019) y para el año 2020 (S₁: 07/02/2020, S₂: 14/02/2020, S₃: 21/02/2020, S₄: 28/02/2020, S₅: 06/03/2020, S₆: 13/03/2020). Las evaluaciones debieron detenerse de manera sorpresiva durante el año 2020 debido al inicio del Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (Decreto 297/2020). Las colectas se realizaron hasta que el 80% de las inflorescencias habían perdido la totalidad de sus cariopses. Los registros de caída de cariopses para los años en estudio fueron tomados en planillas especialmente diseñadas (Anexo. Tabla IV a, b, c, d). Adicionalmente se tomaron datos meteorológicos diarios de precipitaciones (mm), humedad (°H relativa), temperatura (°T) y vientos (fuerza Beaufort) (Anexo. Tabla V a, b).

Las comparaciones entre poblaciones para caída de cariopses se realizaron mediante la prueba no paramétrica de χ^2 que permite medir la discrepancia entre distribuciones contrastando las frecuencias observadas vs. las frecuencias esperadas.

2.3. Análisis de la covariancia progenie-progenitor: Primero, se verificó si hubo diferencias entre progenies. Para ello, las comparaciones entre cultivares para caída de cariopses sobre la progenie se realizó, como en el Capítulo I, mediante la prueba no paramétrica de χ^2 . Luego, habiendo verificado la existencia de variancia tanto en padres (Capítulo I – Años 2017 y 2019) como en progenies (Capítulo presente), la heredabilidad en sentido estricto fue estimada mediante el método de regresión progenitor-progenie (Falconer, 1986) para cada uno de los caracteres. Dado que, como se mencionó anteriormente no existen problemas de

fertilidad y ambos cultivares se comportan como anfidiplóides, el método de RPP se aplicó sin hacer correcciones previas para el nivel de ploidía. Por dicho motivo, la heredabilidad en sentido estricto se encuentra representada por el doble de la pendiente de la recta de la regresión ($h^2=2.b$). Para ello se realizó un análisis de regresión lineal simple, en el cual los valores medios de los descendientes de un único progenitor se corresponden con los valores de la variable dependiente, y la variable independiente es el valor del progenitor femenino en cada año de evaluación. El valor del coeficiente de regresión y su error estándar coinciden con el estimado de heredabilidad en sentido estricto y su error estándar, respectivamente. Previamente, se comprobó, para la variable dependiente, el cumplimiento de las premisas de normalidad con el empleo de la prueba de Shapiro-Wilks. Los valores de heredabilidad obtenidos se clasificaron de acuerdo al criterio de Ramírez y Egaña (2003). Los valores mayores que 0,50 fueron considerados altos, los valores entre 0,25 - 0,50 como medios y aquellos menores que 0,25 como bajos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2011)

3. RESULTADOS

3.2. Dinámica de caída de cariopses en la progenie: Los resultados obtenidos (Tabla 2.1) demostraron que no existe evidencia experimental que indique la existencia de diferencias significativas entre los cultivares analizados para la caída de los cariopses en los dos años de evaluación ($\chi^2= 4,68$; $p > 0,05$ en 2019 y $\chi^2 = 6,81$; $p > 0,05$ en 2020) (Anexo. Tabla IV a, b, c, d).

Tabla 2.1 Cantidad de cariopses caídos a través del tiempo en la progenie de dos cultivares de *P. coloratum* var. *makarikariense*. (Ref. S: Semana).

2019	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Kapivera	1	1	39	54	111	170
Bambatsi	7	4	56	89	149	235

χ^2 calc: 4,68. $\alpha=0,05$. GL=5

2020	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Kapivera	1	1	32	46	114	144
Bambatsi	5	4	49	85	135	195

χ^2 calc: 6,81. $\alpha=0,05$. GL=5

El comportamiento de los individuos evaluados no se vio afectado por las condiciones ambientales reinantes durante los dos años de estudio debido a que fueron similares en cuanto a °T, °H, lluvias y vientos; tampoco se han constatado efectos causados por la edad de las plantas ni por el desarrollo de las mismas. (Anexo. Tabla V a, b).

3.3. Análisis de la covariancia progenie-progenitor: Prácticamente en todas las semanas de evaluación el valor p encontrado fue mayor que el nivel de significancia ($> 0,05$), siendo imposible rechazar H_0 al no ser estadísticamente significativo. Esto sugiere que los cambios en el % Caída de cariopses en la progenie no estuvieron asociados a los cambios en el % Caída de cariopses de los padres, y en este caso el modelo de regresión lineal no resultó válido para realizar una predicción.

La única diferencia significativa que se encontró en el análisis responde a la S₅. El valor p encontrado fue menor que el nivel de significancia ($< 0,05$), en este caso $p = 0,0196$ indica que podemos rechazar H_0 y sugerir que los cambios en el %C de cariopses en la progenie podrían estar asociados a los cambios en el %C de cariopses de los padres. El modelo de regresión lineal resulta válido para hacer una predicción.

El valor de la heredabilidad en sentido estricto, representada por el doble de la pendiente de la recta de la regresión fue numéricamente mayor a 1 y estadísticamente significativo. Sin embargo, desde la Genética Cuantitativa Clásica esto es interpretado como que no difiere de 1, posiblemente en respuesta a los efectos ambientales presentes en los diferentes años de evaluación tanto de padres como de hijos, resultando posible informar la h^2 como alta según el criterio de Ramírez y Egaña (2003). Tanksley et al. (1993) manifestaron que mientras más alto sea el efecto de la variación ambiental sobre un carácter, menor será su heredabilidad.

El grado de ajuste del modelo o R^2 (0,38) para la S_5 implica que el 38% de la variabilidad del % de Caída de cariopses de la Progenie se explica por cambios en el % de Caída de cariopses de los Padres.

En el gráfico de dispersión (Fig. 2.4), puede verse una relación claramente positiva entre las variables, de manera que mientras aumenta el valor de X (% Caída de cariopses de los padres) también aumenta el valor de Y (% Caída de cariopses de la progenie). Dicha afirmación se complementa con la información presente en la Tabla 2.2.

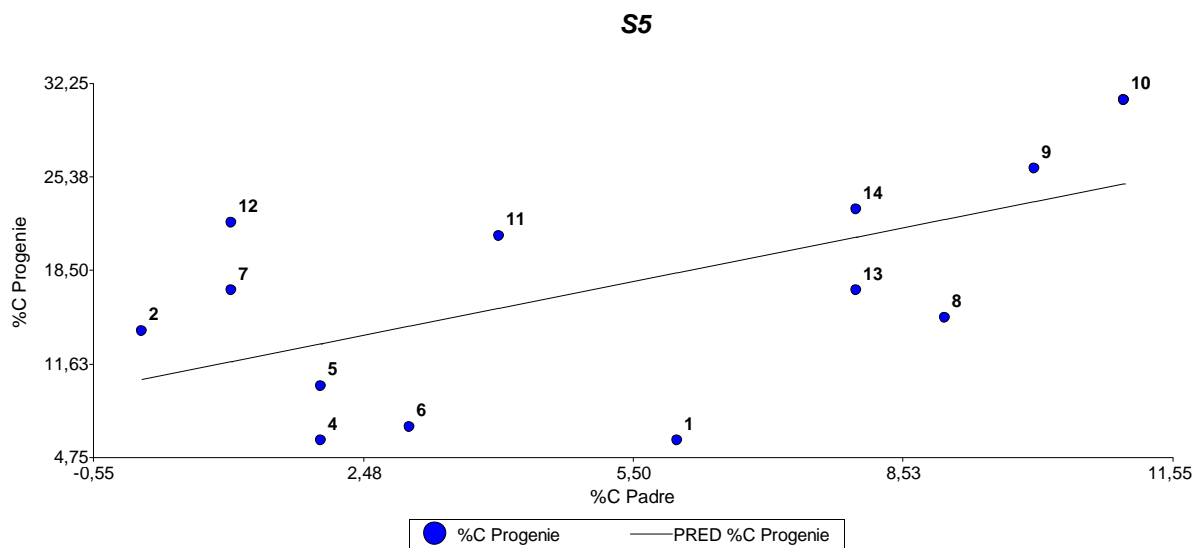


Fig. 2.4. Gráfica de dispersión de los datos en conjunto.

Tabla 2.2. Valores medios de los padres (por genotipos en cada año de evaluación), y de su respectiva progenie.

S ₅						
Punto	Genotipo	Planta	%C Padre	Año	%C Progenie	Año
1	Kapivera	4	6	2017	6	2019
2	Kapivera	72	0	2017	14	2019
10	Kapivera	90	11	2017	31	2019
4	Bambatsi	21	2	2017	6	2019
5	Bambatsi	34	2	2017	10	2019
6	Bambatsi	55	3	2017	7	2019
7	Bambatsi	74	1	2017	17	2019
8	Kapivera	4	9	2019	15	2020
9	Kapivera	72	10	2019	26	2020
10	Kapivera	90	11	2019	31	2020
11	Bambatsi	21	4	2019	21	2020
12	Bambatsi	34	1	2019	22	2020
13	Bambatsi	55	8	2019	17	2020
14	Bambatsi	74	8	2019	23	2020

4. DISCUSIÓN

La inexistencia de evidencia experimental que permita demostrar diferencias significativas entre los cultivares para la variable en los dos años de evaluación, demuestra que tanto las condiciones ambientales presentes como la edad de los individuos no influyeron en el comportamiento de las plantas.

La información fenotípica obtenida en la generación anterior ha permitido calcular la regresión sobre individuos pertenecientes a familias de medios hermanos de la generación siguiente de las cuales derivaron (Mariotti & Collavino, 2014).

A través de la estimación de la heredabilidad mediante el método de Regresión Progenie-Progenitor (RPP) realizado a lo largo de dos años para la variable caída de cariopses, el único valor significativo de heredabilidad en sentido estricto (h^2) obtenido fue en la semana 5, lo que daría entonces una idea no sólo de la existencia de variancia genética aditiva sino también de su estabilidad. Este punto, además, se relaciona directamente con los resultados obtenidos en el Capítulo 1 a través de los gráficos de % acumulado de caída de cariopses, en donde se observa claramente que la semana 5 muestra mayor diferencia entre los cultivares. Los resultados alcanzados respecto a la h^2 para las demás semanas en estudio resultaron ser no significativos, indicando la ausencia de variancia aditiva para el carácter en estudio frente al contexto genético. La acción de los efectos aditivos fue descrita por Young (1994) sobre caracteres directamente relacionados a la producción de forraje en la var. *coloratum*, también los mismos fueron estimados en otras especies forrajeras (Majidi et al., 2009; Kahrizi et al., 2010). Tradicionalmente, la literatura muestra mayor información relacionada al rendimiento de forraje que a la producción de semilla, debido a que los programas de mejora en forrajeras han sido focalizados en aumentar la producción de biomasa (Casler et al., 2002; Babiker et al., 2014).

La elevada heredabilidad en sentido estricto (h^2) encontrada coincide con estudios realizados por diversos autores sobre especies forrajeras como *Lathyrus sativus* y *Bromus catharticus*, donde señalan que determinados caracteres relacionados al rendimiento de semillas demuestran una alta heredabilidad (Türk et al., 2007; Abbott & Pistorale, 2010).

Adicionalmente a los resultados alcanzados, resulta de suma importancia la obtención de parámetros genéticos para otros caracteres morfológicos asociados a la producción de semilla

antes de decidir un plan de mejora. La incorporación de una mayor cantidad de caracteres morfológicos asociados al fenotipo de la especie puede ser de gran utilidad para el desarrollo e implementación de nuevos planes de mejoramiento genético, sumado a la importancia de conocer la proporción de la variación que es explicada por los componentes genéticos y la heredabilidad de los caracteres en estudio.

La ventaja de poder calcular correlaciones genéticas es indiscutible a la hora de estimar la respuesta correlacionada entre variables. De la misma manera, utilizando las heredabilidades y la correlación entre variables, es posible predecir las ganancias que podrían obtenerse si se realizara una selección indirecta. Dicha selección podría conducirse sobre un carácter altamente heredable y de fácil medición, correlacionado con un rasgo más complejo, y obtener ganancias genéticas sobre éste último. Un ejemplo de selección indirecta se realizó con el objetivo de aumentar el rendimiento en *Triticum aestivum*, con la utilización de los caracteres granos por espiga y peso de mil granos (Bilgin et al., 2011). También se utilizó dicha selección para incrementar la producción de forraje en *Festuca arundinacea* mediante el carácter altura planta (Majidi et al., 2009). Se han estimado correlaciones entre diversos rasgos en muchas gramíneas forrajeras (Henning & Townsend, 2005; Kahrizi et al., 2010), y concretamente en *Panicum coloratum*, donde encuentran correlacionados varios rasgos asociados a producción de forraje (Young, 1994).

5. CONCLUSIONES

Los elevados valores de heredabilidad en sentido estricto (h^2) representan una reducida variación ambiental en proporción a una amplia variación genética, y por ende un gran efecto aditivo sobre el carácter en estudio que permite mayores posibilidades de ser mejorados genéticamente mediante selección artificial.

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS POBLACIONES DE ***Panicum coloratum* var. *makarikariense* MEDIANTE ISSR**

1. INTRODUCCIÓN

La falta de variabilidad genética resulta en un aumento de la vulnerabilidad de los cultivares a factores bióticos y abióticos (Plucknett et al., 1987; Hintum et al., 2007; Wouw et al., 2009). La posibilidad de caracterizar dicha variabilidad ofrece la oportunidad de obtener información necesaria para conservar y utilizar los recursos genéticos (Franco et al., 2001; Fikiru et al., 2010).

Para el incremento de esta variabilidad a través de la utilización de los recursos genéticos disponibles, los bancos de germoplasma constituyen un reservorio de material genético a partir de los cuales pueden obtenerse materiales que posean los genes deseables para el mejoramiento de las características en estudio. Un banco de germoplasma es una colección de semillas y/o materiales de reproducción vegetativa que tiene por objeto preservar la variabilidad genética característica de diferentes especies vegetales para su utilización en programas de mejoramiento o con otros fines científicos.

Considerando que la introducción de *P. coloratum* var. *makarikariense* ha sido relativamente reciente en el país, evento combinado con su hábito de crecimiento perenne, podría esperarse encontrar una reducida variabilidad genética en los materiales que conforman las poblaciones locales.

Es posible encontrar tres tipos de marcadores genéticos de uso frecuente: marcadores morfológicos, marcadores bioquímicos y marcadores de ADN. Los marcadores genéticos difieren unos de otros en relación a su abundancia en el genoma, en el nivel de polimorfismo detectado, en la relación especificidad-locus, en su reproducibilidad, en los requerimientos de las técnicas y de los costos (Agarwal et al., 2008; Kumar et al., 2009).

Históricamente las especies han sido caracterizadas mediante caracteres morfológicos. Estos se basan en atributos, estados observables o medibles referentes a la forma, aspecto, estructura o comportamiento del ciclo vital del individuo, pueden consistir en el empleo de características botánicas, fenológicas y agronómicas. Usualmente son características fenotípicas de identificación visual como color de flor, forma de semilla o hábitos de crecimiento (Collard et al., 2005). Los marcadores bioquímicos son aquellos polimorfismos

presentes en ciertas proteínas (Martínez et al., 2010). Ambos tipos de marcadores poseen como desventaja que su número es limitado y se encuentran influenciados por factores ambientales o por estadios de desarrollo de la planta (Winter & Kahl, 1995). No obstante, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas moleculares que permitieron su aplicación en una gran diversidad de áreas. La información ofrecida por ambos tipos de marcadores permite su aplicación inmediata sobre los recursos genéticos disponibles para llevar adelante estudios basados en la diversidad genética.

Desde el inicio del mejoramiento vegetal, el objetivo que prima ha sido seleccionar genotipos superiores a partir de la identificación de fenotipos superiores, dependiendo el resultado de su éxito del número de genes involucrados en el control del carácter (herencia monogénica o poligénica), de las relaciones interalélicas (dominancia o aditividad) y por supuesto de la respuesta a las influencias ambientales (Martínez et al., 2010).

La caracterización de la diversidad genética basada en el estudio de marcadores morfológicos presenta algunas limitaciones en relación a la existencia de un número limitado de rasgos a evaluar, altamente heredables, sometidos a la influencia ambiental y efectos de dominancia, interacciones epistáticas o pleiotropismos (Kameswara Rao, 2004; Weising et al., 2005) pero representa el primer paso para la descripción y clasificación de las plantas. Debido a que estos factores podrían sobreestimar la variabilidad genética presente (Rimieri & Wolff, 2010), suelen recomendarse la utilización de otras herramientas como marcadores moleculares que detectan la variabilidad directamente a nivel de ADN para complementar la caracterización morfológica.

Hoy en día, a través del uso de marcadores de ADN se aumenta la eficiencia y precisión en los programas de mejoramiento vegetal. El uso de marcadores en el mejoramiento se conoce como selección asistida por marcadores o *Marker Assisted Selection* (MAS) y es un componente de la nueva disciplina del mejoramiento molecular (Collard & Mackill, 2008). La MAS permite incrementar la ganancia por unidad de tiempo y por unidad de costo en los programas de mejoramiento cuando la determinación del fenotipo de los caracteres de interés demora tiempo, es caro o errático (Bernardo, 2008). Dichos marcadores en general son neutros en relación a los efectos fenotípicos, con efecto epistático mínimo o nulo y al ser altamente polimórficos proveen una mayor cantidad de información genética por *locus*. Además, no son dependientes del desarrollo de la planta y requieren muy poco material para

su aplicación (Ferreira et al., 1998; Forster et al., 2001), permiten detectar diferencias genéticas entre organismos o especies aunque no indiquen la región blanco de un gen (Collard et al., 2005). El lugar que ocupa el marcador en el genoma es conocido como *locus* (del latín lugar, *loci* en plural) siendo de utilidad el hecho que éstos puedan encontrarse asociados a caracteres fenotípicos.

El INTA EEA Rafaela cuenta con una colección de germoplasma de *Panicum coloratum* var. *coloratum* y *Panicum coloratum* var. *makarikariense* que ha sido evaluada respecto a sus características productivas y en cuanto a su variabilidad genética (Armando et al., 2013; Armando, 2014; Armando et al., 2015).

La evaluación del germoplasma como fuente de variabilidad constituye el primer paso antes de establecer un programa de mejoramiento genético (Vogel & Burson, 2004).

Se describieron diferencias entre plantas dehiscentes y no dehiscentes en relación a la densidad de la capa de abscisión, el tamaño de las células del esclerénquima y el parénquima, los niveles de enzimas hidrolíticas y la lignificación (Patterson, 2001). La posibilidad de identificar y controlar la producción de las enzimas hidrolíticas u otras proteínas involucradas en el proceso de abscisión sería clave para poder reducir la dehiscencia en esta y otras especies relacionadas.

En las últimas décadas el uso de marcadores de ADN para el estudio de la diversidad genética de cultivos comenzó a ser mucho más frecuente, previo a esto, el uso de marcadores moleculares para estudios genéticos en general ha sido limitado. Un marcador molecular es un fenotipo molecular (una variante de proteína, un sitio de restricción, un fragmento amplificado, una secuencia) que proviene de la expresión de un gen o de segmentos de ADN que se expresan o no en el genoma. Los marcadores basados en ADN, al analizar directamente el material genético, evitan las variaciones debidas al efecto ambiental, son independientes del estado de desarrollo de la planta, poseen un efecto epistático mínimo o nulo, y pueden ser analizados en número muy alto garantizando amplia cobertura del genoma (Ferreira et al., 1998; Martínez et al., 2004).

En referencia a los marcadores de ADN, estos varían en cuanto a costo, reproducibilidad, tiempo empleado, robustez, etc., y pueden dividirse en tres clases:

- Basados en la hibridación del ADN: RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) y VNTR (Repeticiones en Tándem en Número Variable).
- Basados en la amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): RAPD (ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados), ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetidas) y SSR (Repeticiones de Secuencia Simple).
- Basados en la secuencia de ADN: SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple) e InDel (Inserción/Delección).

Los marcadores capaces de revelar diferencias entre individuos (de la misma o diferentes especies) son denominados polimórficos, mientras que aquellos que no pueden discriminar entre genotipos son llamados monomórficos. La utilización de marcadores moleculares en combinación con caracteres morfológicos han permitido localizar regiones genómicas que controlan caracteres de interés (Ovesná et al., 2002; Weising et al., 2005), además permite una estimación mucho más completa de la variabilidad genética.

Los ISSR provienen de la frase *Interspread Single Sequence Repeats* (secuencias entre repeticiones simples o secuencias intercaladas entre los microsatélites) involucran la amplificación de segmentos de ADN situados entre dos microsatélites o secuencias repetidas orientados en dirección opuesta (Zietkiewicz et al., 1994; Gupta et al., 1994) (Fig. 3.1.) Fueron desarrollados por Zietkiewicz et al. en 1994 (citado por Charters & Wilkinson, 2000; Spooner et al., 2005). Este tipo de marcador genético permite obtener niveles de variación en las regiones comprendidas entre diferentes microsatélites que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Las regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como $(CT)_n$ ó $(CA)_n$, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (González & Aguirre, 2007). Las secuencias usadas como iniciadores, cebadores o primers pueden ser repeticiones de di-, tri-, tetra o pentanucleótidos anclados (con 1 a 4 bases degeneradas extendidas sobre la secuencia adyacente) o no anclados (Zietkiewicz et al., 1994; Reddy et al., 2002).

evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridización, y distinción de individuos con origen clonal y sexual (Zietkiewicz et al., 1994; Wolfe, 2000; Reddy et al., 2002).

En Argentina se han reportado estimaciones de diversidad genética sobre materiales de *Panicum coloratum* var. *coloratum* utilizando marcadores ISSR (Burgos, 2012; Pittaro et al., 2012). También han sido publicados resultados de estimaciones conjuntas de marcadores ISSR y SSR con caracteres fenotípicos sobre la var. *makarikariense* (Armando, 2014).

Las técnicas que se han desarrollado otorgan mayor precisión y rapidez en la evaluación del nivel y distribución de la diversidad genética en plantas, son más económicas para la evaluación de la variación genética y ofrecen identificación genotípica precisa, temprana y eficaz (Forster & Spangenberg, 1999). La identificación del marcador genético apropiado dependerá de la aplicación específica, del nivel de polimorfismo requerido, de la presencia de facilidades técnicas suficientes y del conocimiento previo o *know-how*, de la disponibilidad de tiempo y de las limitaciones económicas (Spooner et al., 2005).

En este capítulo se evaluará la potencialidad y se desarrollará la caracterización molecular de la diversidad mediante la utilización de la técnica de marcadores moleculares de tipo ISSR con el objetivo de determinar el grado de similitud molecular entre los individuos de cada cultivar, resultando una herramienta sumamente válida gracias a su reproducibilidad y a su posible aplicación sobre cualquier estadio de desarrollo de la especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de la muestra de material vegetal: Previamente a la extracción del ADN genómico, se seleccionaron 20 individuos pertenecientes a cada uno de los dos cultivares analizados, cv. Kapivera y cv. Bambatsi (Fig. 3.2). En la selección de tales individuos, se incluyeron la totalidad de aquellas plantas para las cuales se evaluó su caída mediante la utilización de trampas de cariopses (Capítulo 1) y aproximadamente 5 plantas más de cada cultivar completando el número definido previamente.

Las muestras se tomaron a primera hora de la mañana y correspondieron a hojas jóvenes sin lesiones ni signos de ataque por patógenos. Las mismas fueron almacenadas en freezer a - 80°C hasta la extracción de ADNg.

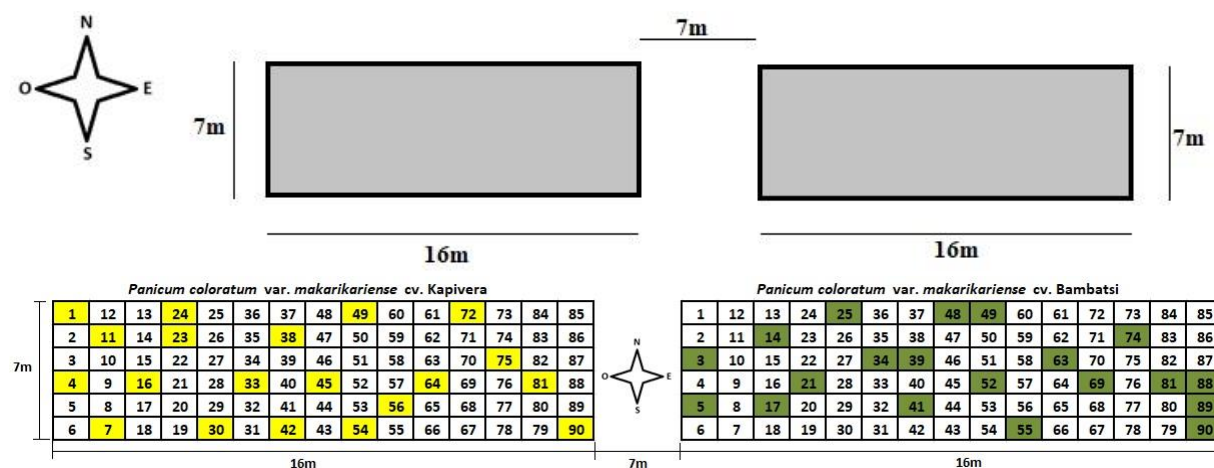


Fig. 3. 2. Distribución de la toma de muestras para extracción de ADNg sobre las parcelas.

2.2. Extracción y cuantificación de ADN: La extracción del ADN genómico se realizó a partir de muestras de hojas jóvenes homogeneizadas de cada genotipo seleccionado perteneciente a los dos cultivares de *P. coloratum* var. *makarikariense* mediante la utilización de un protocolo de aislamiento a gran escala, modificado respecto a la cantidad de material a extraer (Weining & Langridge, 1991). La cantidad de muestra de tejido utilizada para dicho protocolo fue de aproximadamente 1 mg de hojas frescas (Fig. 3.3).



Fig. 3. 3. Material vegetal para extracción de ADNg.

Las mismas se molieron con la ayuda de pilones en tubos Eppendorf nuevos y estériles de 1,5 ml y se resuspendieron en 600µl de buffer de extracción (4% v/v sarkosyl, 0.1M TRIS-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0). Luego de obtener un lisado fácil de pipetear se añadió 100µl del detergente tensoactivo SDS (dodecilsulfato sódico) a cada tubo de muestra y se incubó en baño a 65°C durante 30 minutos. Un volumen de 200µl de NaAc (3 M, pH 4.8) y 400µl de cloroformo se añadió a las soluciones y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 20 minutos favoreciendo la separación de las fases. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante (fase acuosa superior) y se transfirió a nuevos tubos sin manipular la interfase. Se adicionó un volumen de 500µl de isopropanol frío (para precipitar el ADN) y se mezcló por inversión 3-4 veces para luego centrifugar durante 6 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación. Finalmente, se realizaron dos ciclos de lavado sobre el pellet resultante: se adicionó 500µl de alcohol 70% (v/v) y centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos, descartando también el sobrenadante producto del centrifugado. Los tubos se dejaron secar con la tapa abierta e invertidos durante toda la noche y luego se re-suspendió el precipitado de ADN obtenido en 100µl de agua ultra pura (mili q).

Luego se cuantificó la concentración y pureza del ADN genómico de cada una de las muestras por espectrofotometría utilizando la expresión:

$$[C] = A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50\mu\text{g/ml}$$

A₂₆₀: es el valor de absorbancia a esa longitud de onda.

50µg/ml (constante): es la concentración de ADN doble cadena que genera un valor de absorbancia = 1.

También se evaluó su calidad e integridad por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% m/v en buffer TBE teñidos con Sybr Safe® DNA gel stain (Invitrogen). La agarosa se llevó a microondas en dos ciclos repetidos de 20 segundos, se dejó enfriar hasta aproximadamente 60 °C y luego se agregó 5 µl de Sybr Safe® cada 50 ml totales de buffer. Se vertió en el molde con el peine correspondiente hasta que gelifique. El gel fue colocado en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X (Tris-HCl 100 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM pH 8.0). En los pocillos del mismo se cargaron 4 µl de la muestra previamente mezclados con 2 µl de buffer de carga. Se utilizó un ADN control como patrón de cuantificación y se evaluaron las 20 muestras de cada cultivar. Se aplicó corriente

constante a 140 V durante media hora, transcurrido el tiempo de corrida se visualizó y capturó la imagen del ADN en el BioRad Gel Doc™ XR+ con el software Image Lab. Los ADNg extraídos se diluyeron posteriormente para obtener una concentración aproximada de 28 ng/μl.

2.3. Marcadores moleculares ISSR: Se seleccionaron 7 cebadores (Tabla 3.1) que demostraron claridad y reproducibilidad de los patrones de bandas mediante amplificaciones en PCR en estudios realizados por Armando (2014), dentro de un total inicial de 20 cebadores evaluados por Garayalde et al. (2011) sobre girasoles silvestres.

Tabla 3. 1. Secuencias de cebadores ISSR utilizados para el análisis molecular de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*, cv. Kapivera y cv. Bambatsi

ISSR	Secuencia 5' → 3'
1	GAGAGAGAGAGAGAGAT
2	CTCTCTCTCTCTCTTG
3	CAACAACAACAACA
4	CACCACCACCACGC
5	GACAGACAGACAGACA
6	GATAGATAGACAGACA
7	ACTGACTGACCGACTG

La reacción de amplificación en PCR fue realizada en un volumen final de 25 μl. Cada tubo de la mix se preparó conteniendo 28 ng de ADN molde, 0,2 mM de cada dNTPs, 350 ng de cebadores, 1.5 U Go Taq ADN polimerasa (Promega) en buffer 5X.

Las reacciones de PCR para los cebadores ISSR 1, 3, 4, 5, 6 y 7 fueron llevadas a cabo en un termociclador Biorad T100™ mediante el siguiente ciclado: 40 ciclos a 94°C por 40 s, temperatura de annealing de 52°C por 45 s, 72°C por 1 min 30 s y un paso final de extensión de 5 min a 72°C. La reacción de PCR para el cebador ISSR 2 fue idéntica a la descrita anteriormente, con una modificación en la temperatura de annealing a 42° C (también por 45 s) (Tabla 3.2 adaptada de Armando, 2014).

Tabla 3. 2. Temperaturas óptimas de anillado determinadas para cada uno de los cebadores.

ISSR	Temperatura óptima de anillado
1	52°C
2	42°C
3	52°C
4	52°C
5	52°C
6	52°C
7	52°C

Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de agarosa 2,5% (m/v), corridos a 70 V en buffer TAE 1X durante 180 min, visualizados por tinción con Sybr Safe® y fotografiados en BioRad Gel Doc™ XR+ con el software Image Lab.

Se sembraron 20 muestras seleccionadas de cada cultivar de *P. coloratum* var. *makarikariense* por gel, junto con un marcador de peso molecular 100 pb (Promega), de manera que permitiera comparar los patrones de bandas entre individuos y entre geles (Fig. 3.4). Además, se incorporó un control negativo (tubo extra con todos los reactivos utilizados en la PCR, excepto ADN) por cada cebador utilizado. Si en esta muestra hay amplificación significa que en algún reactivo hay restos de ADN o de producto de PCR que está contaminando el experimento.

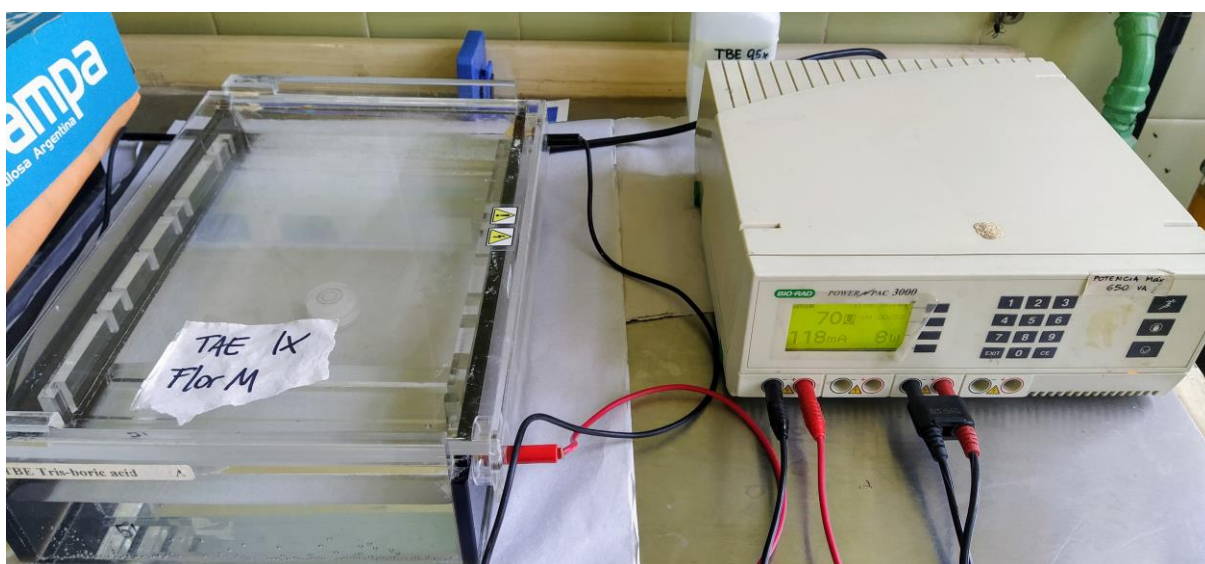


Fig. 3. 4. Corrida de muestras con marcadores IISR.

2.4. Caracterización de la diversidad genética: Los ISSR son interpretados como marcadores multiloci con herencia dominante donde la presencia de la banda amplificada incluye al homocigoto dominante y heterocigoto (evaluados como uno solo) y la banda ausente es considerada como el carácter homocigoto recesivo.

Se construyó una matriz de datos en la cual las filas correspondieron a los genotipos de los individuos evaluados y las columnas a los *loci* presentes en cada ISSR. Las bandas amplificadas se codificaron mediante una matriz de tipo binaria, donde en cada *locus* se localizan los alelos A y a. La banda presente proviene de la presencia de una copia de A--- (homocigoto dominante - heterocigoto) y se codifica con el número “1”. La ausencia de banda que corresponde al homocigoto recesivo (aaaa) se codifica como “0”.

Previo al análisis de los datos, se seleccionaron aquellos *loci* cuya frecuencia de bandas presentes sea superior al 40% en todos los individuos (4 bandas o más). De manera conjunta, también se realizó un Análisis de Conglomerados (Clúster, en inglés) con la totalidad de los *loci* presentes en la matriz binaria con el objetivo de respaldar la selección anteriormente mencionada.

Todos los análisis estadísticos de los caracteres moleculares mencionados se realizaron utilizando los programas Infostat (Di Rienzo et al., 2011) e Infogen (Balzarini et al., 2016). Los datos obtenidos se dividieron en tres grupos de evaluación:

Análisis univariado de los datos moleculares: La descripción de la diversidad genética fue realizada mediante el análisis de:

- N° total de *loci* amplificados,
- N° de *loci* polimórficos,
- N° promedio de *loci* por ISSR,
- Porcentaje de polimorfismo (% P): proporción de *loci* polimórficos en relación al número total de *loci*, calculados por ISSR,
- Número de bandas exclusivas.

Análisis multivariado de los datos moleculares: Se realizaron Análisis de Conglomerados (Cluster) utilizando el algoritmo de Ward y como métrica la distancia Dice $-\sqrt{1-S}$ -, tanto para la totalidad de los *loci* obtenidos en la matriz original como para aquellos seleccionados según el criterio señalado, con el objetivo de poder interpretar la naturaleza y composición de

la variabilidad fenotípica total observada. Según los resultados arrojados en el dendrograma, se construyó una nueva matriz para realizar el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) a un criterio de clasificación para comparar la variación molecular entre cultivares y entre genotipos dentro de cada cultivar.

Análisis de la asociación entre la diversidad molecular y la caída de cariopses: Estas observaciones se realizaron con el fin de revelar asociaciones entre la variabilidad molecular detectada en el presente capítulo y la variabilidad fenotípica detectada para el carácter “caída de cariopses -2017 y 2019-” en el capítulo 1. Inicialmente, se comprobó mediante Shapiro Wilks si las variables evaluadas seguían una distribución de tipo normal. Debido a que tal supuesto no se cumplió, se realizó un análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis para asociar el polimorfismo molecular (para distintas bandas seleccionadas de ISSR) a la variabilidad fenotípica observada en la caída de cariopses. Las evaluaciones se realizaron a nivel individual, cada *loci* perteneciente a su correspondiente ISSR con el carácter fenotípico mencionado.

3. RESULTADOS

3.2. Extracción y cuantificación de ADN: El protocolo de aislamiento y purificación del ADN utilizado de acuerdo a Weining & Langridge (1991), proporcionó resultados aceptables en términos de pureza y cantidad de ADN para todas las muestras analizadas. La cuantificación de la concentración y pureza del ADN genómico se realizó a través de espectrofotometría (Anexo. Tabla VI) y los resultados obtenidos fueron utilizados para determinar la concentración del ADN de partida.

La observación del ADNg en geles de agarosa (Fig. 3. 5), demostró que el ADN de partida se encontraba íntegro.

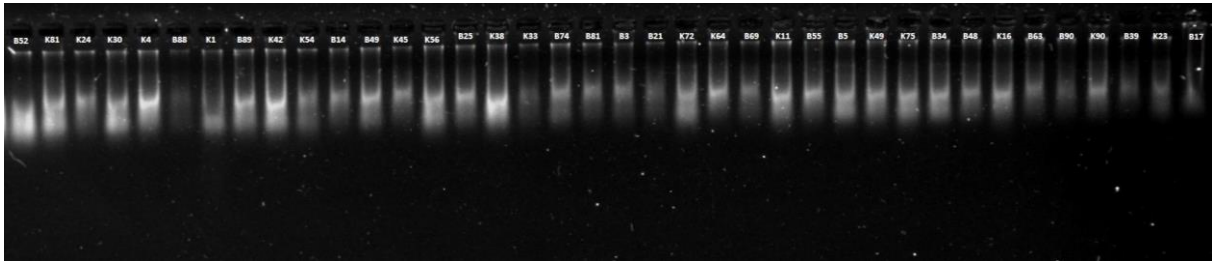


Fig. 3.5. Integridad del ADN en gel de agarosa 1,5% (m/v).

3.3. Marcadores moleculares ISSR: Luego de digitalizar las imágenes obtenidas de los geles de electroforesis mediante luz ultravioleta en Gel DocTM XR+ (BioRad) con el software Image Lab como se muestra en la Fig. 3.6 -a, b, c -, se procedió a realizar el análisis molecular de los 40 individuos de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* (20 individuos pertenecientes a cada cultivar en estudio). El control negativo sembrado no demostró amplificación en ninguno de los ISSR evaluados, esto permitió confirmar la inexistencia de contaminantes en el producto de PCR.

El marcador de peso molecular se visualizó mediante once fragmentos: 100-1000 pb en incrementos de 100 pb, más una banda a mayor altura de 1500 pb.

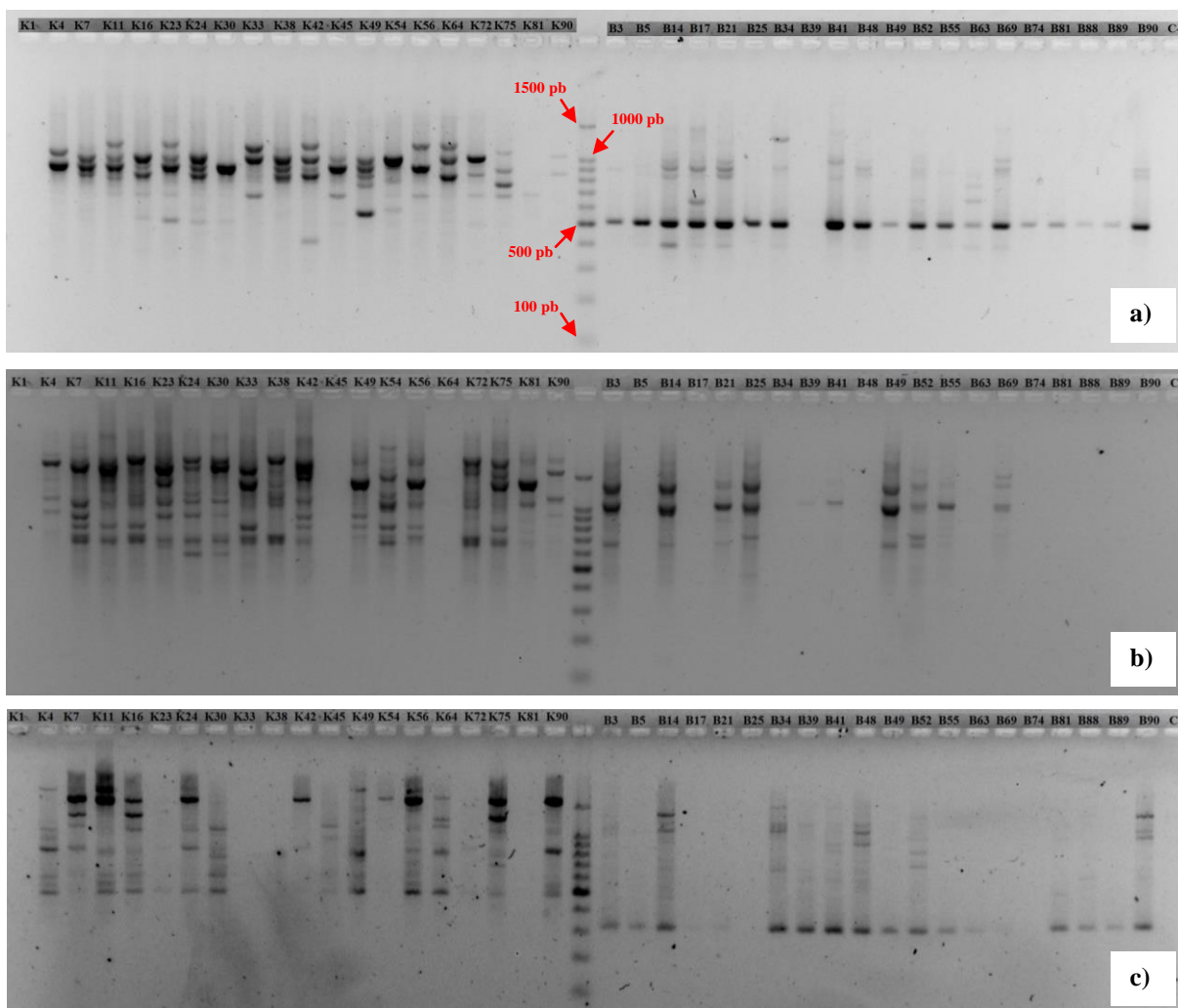


Fig. 3. 6. Perfil de bandas obtenido en gel de agarosa 2,5% (m/v) para distintos marcadores ISSR.
a) ISSR 1. b) ISSR 4. c) ISSR 5.

3.4. Caracterización de la diversidad genética: La caracterización molecular de la diversidad mediante marcadores moleculares ISSR para los 40 genotipos se detalla en los tres grupos de análisis a continuación.

Ambos cultivares demostraron una gran cantidad de bandas amplificadas para la totalidad de los genotipos analizados. De un total de 426 bandas amplificadas, se lograron amplificar 280 bandas a partir del cultivar Kapivera y 146 bandas a partir del cultivar Bambatsi.

Análisis univariado de los datos moleculares: A partir del análisis de 20 individuos de *P. coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera y 20 individuos de *P. coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi se obtuvo un total de 42 bandas ISSR (*loci*) de las cuales el 100% fueron polimórficas. Se muestran los resultados obtenidos a partir de la cuantificación

de los perfiles de marcadores ISSR (Tabla 3.3). El número de *loci* promedio detectado por ISSR fue de 6.

Tabla 3. 3. Parámetros de diversidad genética para cada ISSR. (L_t : número de *loci* totales por ISSR; L_p : número de *loci* polimórficos por ISSR; %P: porcentaje de polimorfismo en cada ISSR)

ISSR	Secuencia 5' → 3'	L_t	L_p	% P
1	GAGAGAGAGAGAGAGAT	7	7	100%
2	CTCTCTCTCTCTCTTG	6	6	100%
3	CAACAACAACAACA	2	2	100%
4	CACCACCACCGC	8	8	100%
5	GACAGACAGACAGACA	11	11	100%
6	GATAGATAGACAGACA	4	4	100%
7	ACTGACTGACCGACTG	4	4	100%

El cultivar Kapivera mostró la mayor variabilidad y el mayor número de bandas privadas en los *loci* mencionados en la Tabla 3.4.

Tabla 3. 4. Número de bandas exclusivas por ISSR y por cultivar.

ISSR	1	2	3	4	5	6		
<i>Loci</i>	A5	A1	A5	A1	A8	A2	A12	A5
Kapivera	9	11	4	4	7	5	0	4
Bambatsi	0	0	0	0	0	0	12	0

Análisis multivariado de los datos moleculares: Inicialmente se realizó un Análisis de Conglomerados (Cluster) utilizando el algoritmo de Ward y como métrica la distancia Dice - $\sqrt{1-S}$ - para la totalidad de los *loci* presentes en la matriz binaria. Dentro de los resultados arrojados, si bien existe una diferenciación de los cultivares (Fig. 3.7), se visualiza un grupo intermedio donde la diferenciación no resulta del todo clara. La medida de proximidad obtenida a través de la correlación cofenética fue de 0,63.

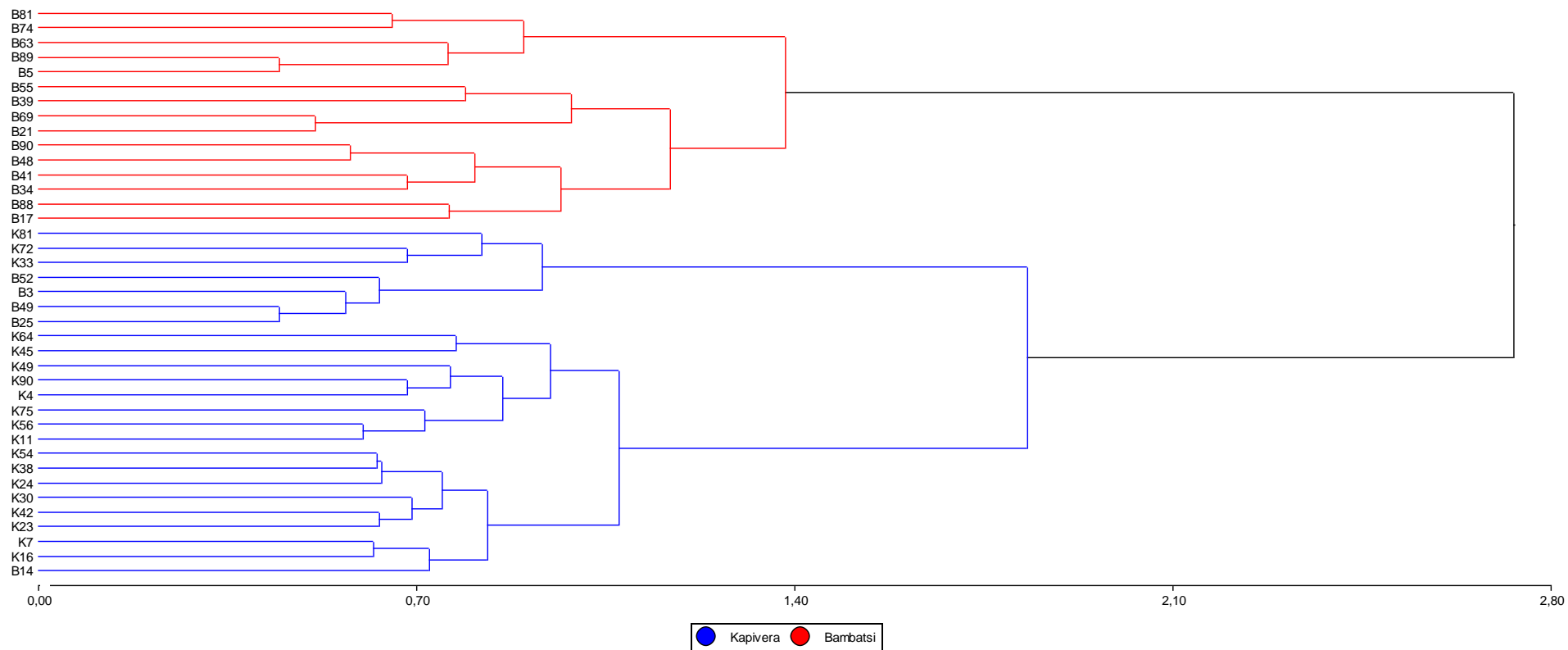


Fig. 3. 7. Dendrograma basado en la distancia Dice para la totalidad de los *loci* de los individuos de *P. coloratum* var. *makarikariense* (Infostat).

Distancia Dice para establecer separaciones entre grupos: 1,75.

Por este motivo, se efectuó un nuevo Análisis de Conglomerados (Cluster) idéntico al anterior, utilizando el algoritmo de Ward y como métrica la distancia Dice $-\sqrt{1-S}$ - pero teniendo en cuenta únicamente a aquellos *loci* seleccionados mediante el criterio de presencia de bandas en al menos el 10% de los individuos analizados. Aquí los genotipos presentan una clara tendencia a la diferenciación, que se visualiza a través del ordenamiento de la variabilidad (Fig. 3.8), de acuerdo al cultivar al cual pertenecen. La medida de proximidad obtenida a través de la correlación cofenética fue de 0,59.

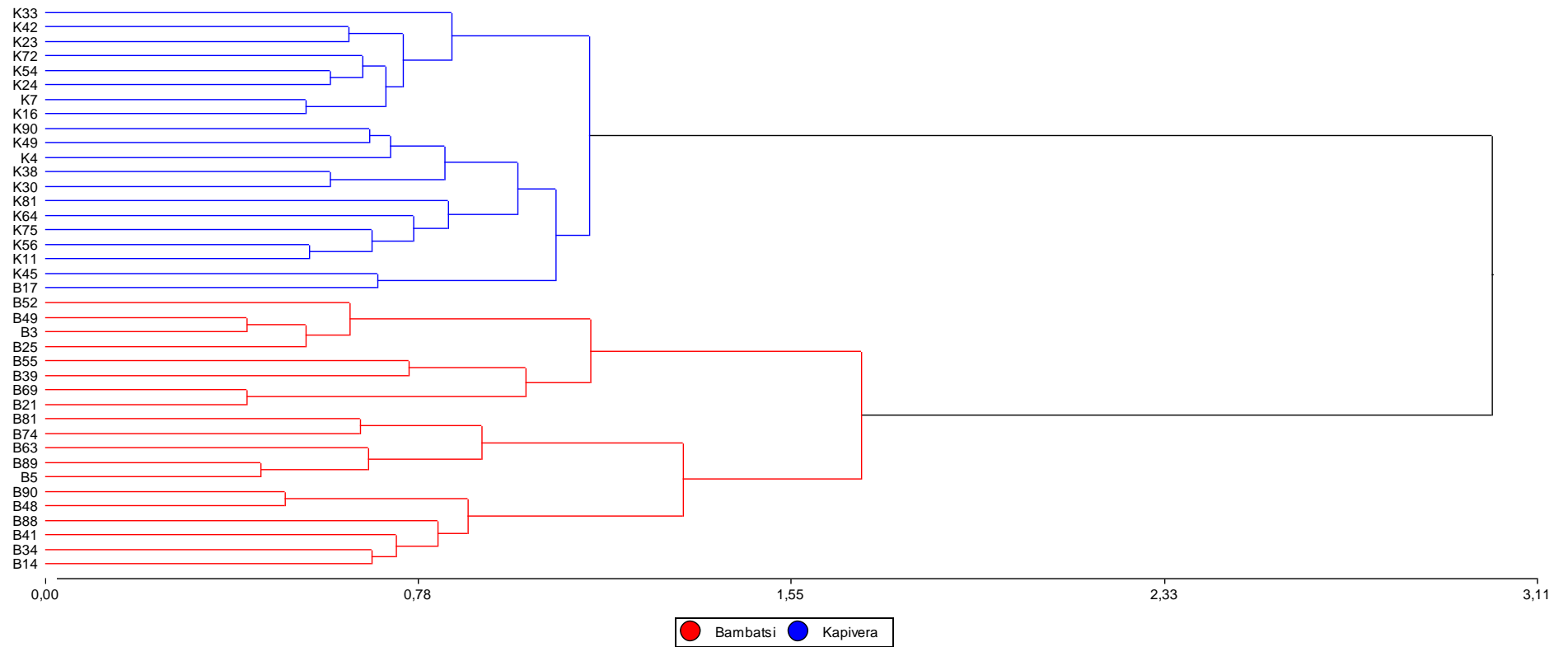


Fig. 3. 8. Dendrograma basado en la distancia Dice para los *loci* seleccionados de los individuos de *P. coloratum* var. *makarikariense* (Infostat).

Distancia Dice para establecer separaciones entre grupos: 1,60.

Se llevó adelante un análisis AMOVA (Infogen) utilizando la matriz binaria con los *loci* selectos (cuya población fueron los genotipos y como métrica se mantuvo la distancia Dice - $\sqrt{1-S}$ -) debido a que fue el criterio que mejor se adaptó. Los resultados obtenidos demuestran que no se encontraron diferencias significativas tanto entre cultivares como dentro de los mismos ($p > 0,05$). Posiblemente esto se deba a la existencia de muchas bandas ausentes para la distancia Dice, quien no considera dobles ausencias o dobles 0.

Por este motivo y con el objetivo de evitar este obstáculo estadístico, se propuso efectuar un AMOVA con la utilización de una nueva distancia.

El AMOVA también se llevó adelante con la matriz binaria de los *loci* seleccionados utilizando la distancia Euclídea. Los resultados observados manifiestan la existencia de diferencias significativas ($p > 0,05$), tanto entre cultivares como dentro de los mismos. En promedio, el 74% de la varianza molecular se encontró entre individuos de cada cultivar, y el 26% restante se debió a la varianza molecular entre cultivares para los *loci* seleccionados. Esta distancia permite confirmar las diferencias observables en el dendrograma siguiente (Fig. 3.9), y resulta sustancioso a la hora de complementar el Cluster.

Se llevó a cabo un nuevo Análisis de Conglomerados (Cluster) utilizando el algoritmo de Ward y como métrica la distancia Euclídea - $\sqrt{1-S}$ -. Los resultados indicaron que la diferenciación entre cultivares se mantiene (Fig. 3.9), y resulta similar a la encontrada con la distancia Dice.

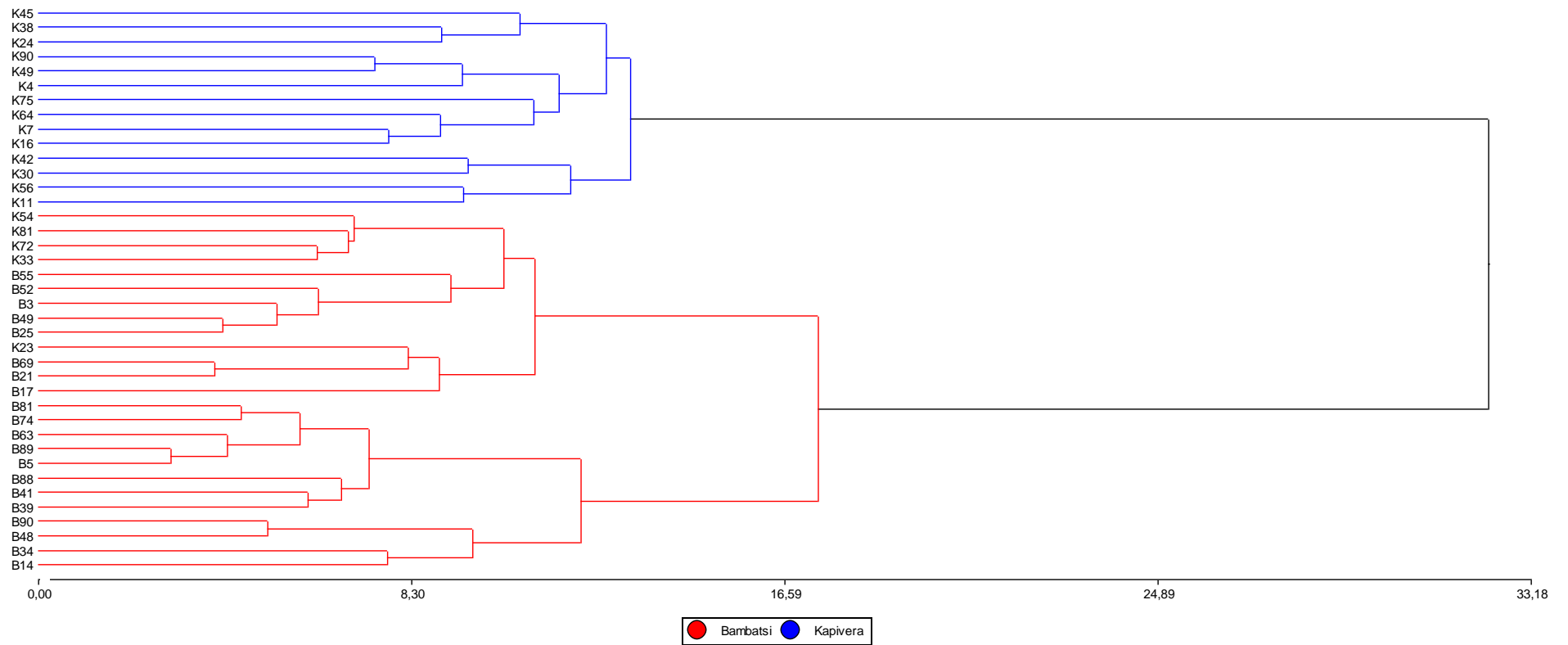


Fig. 3. 9. Dendrograma basado en la distancia Euclídea entre individuos de *P. coloratum* var. *makarikariense* (Infogen).
 Distancia Euclídea para establecer separaciones entre grupos: 32.

Análisis de la asociación entre la diversidad molecular y la caída de cariopses: Las variables analizadas mediante el test Shapiro-Wilks no cumplieron las premisas de normalidad ($p < 0,05$). En consecuencia, al no presentar una distribución de tipo normal los marcadores moleculares ISSR y el carácter fenotípico “caída de cariopses -2017 y 2019-” se compararon mediante el test no paramétrico Kruskal Wallis para identificar asociaciones. La mencionada estadística no paramétrica se aplicó como alternativa al ANOVA por no requerir que las poblaciones cumplan con los supuestos estadísticos, como la distribución normal de la población.

Un primer análisis se realizó para determinar la existencia de diferencias significativas entre cultivares. No se encontraron diferencias significativas para la variable “Total caída de cariopses 2017” y “Total caída de cariopses 2019” entre cultivares (Tabla 3.5). Esto permitió analizar la asociación como único conjunto de datos.

Tabla 3. 5. Análisis de la varianza no paramétrica (Infostat).

Variable	Cultivar	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídos 2017	Bambatsi	14	42,14	52,24	23,00	2,98	0,0840
Total caídos 2017	Kapivera	16	22,25	29,44	7,50		

Variable	Cultivar	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídos 2019	Bambatsi	14	46,00	53,92	27,00	1,50	0,2187
Total caídos 2019	Kapivera	16	25,75	33,95	10,00		

Para poder detectar la asociación, fue necesario analizar en forma conjunta e integrada los *loci* seleccionados de cada uno de los 7 marcadores moleculares ISSR y el carácter en estudio. La hipótesis nula postulada fue que no existieron diferencias para las variables entre los *loci* de los marcadores moleculares. Esta hipótesis fue probada por separado para cada *loci* del marcador molecular correspondiente.

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en tres *loci* del ISSR 2 y en un *locus* del ISSR 5 (ver información Tabla 3.6 y en Anexo).

Tabla 3. 6. Resultados significativos obtenidos mediante el test Kruskal Wallis ($\alpha=0,05$).

Carácter	ISSR	Loci	p	Media	
				Presencia (1)	Ausencia (0)
Total caída de cariopses 2017	2	A11	0,0128	11,75	38,73
	2	A41	0,0086	12,33	44,33
	5	A111	0,0093	15,08	44,12
Total caída de cariopses 2019	2	A11	0,0287	14,88	42,59
	2	A2	0,0431	9,38	44,59
	2	A41	0,0375	16	48

Las bandas encontradas asociada al carácter en estudio, se hallaron en mayor frecuencia en el cultivar Kapivera.

4. DISCUSIÓN

Si bien *Panicum coloratum* es una especie que ha sido estudiada en una gran variedad de aspectos, la información disponible en cuanto a investigaciones referidas a la diversidad molecular con marcadores moleculares es realmente muy escasa (Burgos, 2012; Komatsu & Hossain, 2017). El conocimiento y la evaluación de los rasgos morfológicos son muy importantes y no pueden ser reemplazados por técnicas moleculares. Los resultados de los estudios moleculares deben ser considerados como complementarios a la caracterización morfológica de los individuos (Karp, 1997; Spooner et al., 2005). Por este motivo, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un importante aporte para la organización de la información existente en la especie, la ampliación de la base genética disponible y su posterior utilización en el mejoramiento vegetal.

Diversos autores han mencionado la importancia de seleccionar adecuadamente un método de extracción de ADN que permita la obtención de resultados confiables para los estudios de variabilidad molecular en plantas. Esto involucra una gran cantidad de aspectos, entre ellos, la capacidad de procesar un elevado número de muestras empleadas en los programas de mejoramiento, la implementación de métodos de purificación que provean ADN de alta calidad y la extracción rápida, simple y de bajo costo (Boiteux & Simon, 1999).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la extracción de ADN mediante el uso de un protocolo descrito inicialmente para trigo por Weining & Langridge (1991) y adaptado a *Panicum coloratum* fue adecuado para la totalidad de las muestras de ambos cultivares debido a su relativa rapidez y simplicidad. A pesar de que la adaptación de la técnica no demostró mayores inconvenientes durante el proceso de extracción y el producto obtenido fue considerablemente eficiente, es recomendable la utilización de un kit comercial que incorpore un sistema de tratamiento con DNasa que asegure un producto de muy alta calidad y con niveles de contaminación prácticamente nulos. En diversos estudios moleculares referidos a tejidos vegetales se ha utilizado la extracción de ADN basada en la utilización del kit comercial “Total RNA Isolation System” (Kobs, 1998; Wiskerchen, 1998).

Con la utilización de los marcadores ISSR, se amplificaron un total de 42 *loci* para la var. *makarikariense*, de los cuales el 100% fue polimórfico, un número considerablemente mayor al encontrado por Armando et al. (2014) quienes reportaron un 88% de polimorfismo en los 117 *loci* totales evaluados. Estos elevados valores de polimorfismos resultan similares a los

encontrados por Cidade et al. (2008) en accesiones de *Paspalum notatum* Flügge, especialmente en los ISSR (GA)₈-G y (CTC)₆-RC que son marcadores con secuencias de nucleótidos muy similares a los ISSR 1 y 2 utilizados en el presente trabajo de tesis, donde demuestran un 100% de polimorfismo. Además, con los marcadores moleculares utilizados, el cultivar Kapivera demostró el mayor número de bandas exclusivas en los ISSR 1, 2, 3, 4 y 6. El cultivar Bambatsi mostró bandas exclusivas en un *loci* del ISSR 5.

Molecularmente, ambos cultivares demostraron una gran cantidad de bandas amplificadas para la totalidad de los genotipos analizados. Esto resulta posible debido a que los marcadores moleculares de tipo ISSR contienen secuencias repetidas pre-diseñadas, muy frecuentes y abundantes en el genoma que permiten amplificar múltiples *loci* de manera simultánea sin la necesidad de conocer previamente las secuencias del genoma de la especie en estudio (Zietkiewicz et al., 1994).

A partir de la variación encontrada entre los individuos de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* resulta posible dividir a la especie en sus dos cultivares Kapivera y Bambatsi a través de un AMOVA mediante la utilización de la distancia Euclídea. Hernández et al. (2015) utilizaron dicha distancia en un Análisis de Conglomerados (Cluster) para marcadores moleculares dominantes (RAPD) de manera complementaria e integral a su investigación, demostrando valores significativos de similitud para la totalidad de los aislamientos de *Diaporthe-Phomopsis*. De manera similar, Pioli et al. (2003) utilizó una matriz binaria para marcadores RAPD en genotipos fúngicos con la cual logró agrupar aislamientos de *Diaporthe phaseolorum* según su interacción con genotipos de soja que portaban genes de resistencia al cancro del tallo mediante un dendrograma utilizando la distancia Euclídea como método de similitud entre ellos.

Finalmente, mediante la aplicación de dicha distancia, resultó posible dividir a la especie en los dos cultivares en estudio gracias a la existencia de un patrón claramente definido que tiende al agrupamiento de los genotipos. Además, resulta sumamente necesario un análisis morfológico más exhaustivo y preciso para que los resultados obtenidos resulten en características representativas de la especie.

El cv. Kapivera ha sido parte de un vasto proceso de mejora y probable aumento de su variabilidad, por este motivo fue que mostró la mayor diversidad genética. Este resultado desde el punto de vista de los progresos de la selección fue inesperado, debido a que en

nuestro país el cultivar más difundido resulta ser el cv. Bambatsi. Armando et al. (2014) manifestaron que la “accesión CM” que representaba a la semilla comercial (Bambatsi) exhibió como resultado que sus materiales gozaron de una mayor variabilidad poblacional. Además, también podría ser posible que el cruzamiento o la propagación de individuos del cv. Bambatsi con una base genética estrecha genere poblaciones con menor variabilidad. Sumado a esto, sería sumamente necesario incluir a los ISSR evaluados a lo largo de este trabajo en una corrida con un perfil de acrilamida ya que aportaría una mayor definición y claridad en el perfil de amplificación. De la misma manera, hubiera sido beneficioso tener el dato fenotípico contabilizado para la totalidad de los individuos evaluados y poder sumar información a través de la realización de Procrustes.

En estudios posteriores, sería interesante comparar la variabilidad detectada en los dos cultivares de la var. *makarikariense* con otro tipo de marcador molecular. Los SSR utilizados por Armando et al. (2014) desarrollados para otras especies del género *Panicum* derivaron de genotecas y de bases de datos con secuencias de ADN que se expresan. Si bien los resultados obtenidos con ambos tipos de marcadores han sido similares, los ISSR pueden considerarse marcadores de más fácil aplicación al tratarse de una especie para la cual no se cuenta con genotecas disponibles, además de ser más informativos gracias a la cantidad de *loci* amplificados por iniciador. Un detalle a tener en cuenta en la utilización de marcadores moleculares de tipo SSR es que al tratarse de una especie tetraploide y en la cual, los microsatélites provienen de especies cercanas, es necesario tener presente algunas consideraciones para la interpretación de los resultados.

Los resultados del análisis de la asociación entre la diversidad molecular y la caída de cariopses permiten sugerir la existencia de regiones genómicas (gen/genes) delimitados por los ISSR 2 e ISSR 5 para el carácter caída de cariopses.

Por otro lado, si bien para el *loci* A2 del ISSR 2 se encontraron diferencias significativas solo en el año 2019, es posible explicarlo debido a los efectos ambientales que permitieron expresar dichas diferencias.

Estos resultados agregan nueva información sobre la diversidad genética, contribuyendo al conocimiento biológico de esta especie y asistiendo a futuros programas de mejoramiento genético y conservación de esta especie.

5. CONCLUSIONES

La caracterización y evaluación de la diversidad genética de los cultivares Kapivera y Bambatsi de *P. coloratum* var. *makarikariense* disponibles en la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR) constituyen un paso importante para su posible incorporación a próximos programas de mejoramiento desarrollados para la especie. Los marcadores moleculares ISSR demostraron ser eficaces para la distinción de los cultivares analizados y se ha observado una amplia variabilidad en la especie. Se encontraron amplicones portados principalmente por el cv. Kapivera cuya presencia estuvo asociada a una menor caída de cariopses.

PROSPECTIVAS

Hoy en día, se reconoce una marcada tendencia en aumentar el uso de este recurso forrajero debido a su alto potencial y a su gran adaptación sobre ambientes hostiles, donde predominantemente se sitúa la actividad ganadera. Es importante conocer la variabilidad en los caracteres relacionados al crecimiento y desarrollo de los materiales a fin de poder planificar estrategias en el manejo del forraje que permitan ajustar el pastoreo a las características morfo-fisiológicas de las plantas (Colabelli et al., 1998). Es necesario sumar estudios complementarios que incluyan otros caracteres relacionados a la evaluación de la producción forrajera, la calidad de la pastura y la eficiencia de la misma bajo pastoreo del ganado.

La incorporación de *P. coloratum* en los sistemas de producción argentinos es relativamente reciente; puede encontrarse esta especie principalmente en el centro y norte del país (con una proporción interesante dentro de la Región Pampeana). Se espera que en un futuro cercano, otras zonas posibles de utilización comiencen su expansión aprovechando no solo la variabilidad genética que ofrece sino también la gran capacidad de adaptación a diversos ambientes.

Se concluye que a través de la caracterización fenotípica y molecular descripta pudo evaluarse la diversidad y estructura de la colección de *P. coloratum*, permitiendo diferenciar a ambos cultivares. En caso de que se desee comenzar un programa de mejoramiento tendiente a incrementar la retención de cariopses, de forma tal de poder cosechar en forma más eficiente la semilla mejorada genéticamente, la alta heredabilidad en sentido estricto detectada para este carácter a las 5 semanas y la identificación de amplicones de ISSR asociados a una mayor retención indican que es posible obtener adecuada respuesta a la selección artificial y que este proceso selectivo puede ser asistido con marcadores moleculares para incrementar su eficiencia, respectivamente.

En base a los resultados podemos señalar que si bien ambos cultivares se diferencian morfológica y genéticamente, son necesarios futuros estudios para profundizar dichos aspectos.

BIBLIOGRAFÍA

- (INTA), I. N. de T. A. (n.d.). Kapivera INTA. Retrieved from <https://inta.gob.ar/variedades/kapivera-inta>.
- Abbott, L., & Pistorale, S. (2010). Determination of variance components and heritability in prairie grass (*Bromus catharticus* Vahl.). *Agriscientia*, 27(1/2), 115-123.
- Acquaah G. (2007) Introduction to quantitative genetics. In: G. Acquaah (Ed.), *Principles of Plant Genetics and Breeding*, Blackwell. pp. 121-145.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27(4), 617–631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>
- Aliscioni, S. S., Giussani, L. M., Zuloaga, F. O., & Kellogg, E. A. (2003). A molecular phylogeny of *Panicum* (Poaceae: Paniceae): Tests of monophyly and phylogenetic placement within the Panicoideae. *American Journal of Botany*, 90(5), 796–821. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.5.796>
- Armando, L. V., Tomás, M. A., Garayalde, A. F., & Carrera, A. D. (2015). Assessing the genetic diversity of *Panicum coloratum* var. *makarikariense* using agro-morphological traits and microsatellite-based markers. *Annals of Applied Biology*, 167(3), 373–386. <https://doi.org/10.1111/aab.12234>
- Armando, Lorena V. (2014). Caracterización morfológica y molecular de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* Goossens. Universidad Nacional del Sur.
- Armando, Lorena V., Carrera, A. D., & Tomas, M. A. (2013). Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(5), 1737–1747. <https://doi.org/10.1007/s10722-013-9982-3>.
- Babiker, S. A., Khair, M. A., & Tahir, I. S. (2014). Exploitation of forage attribute-based variations in Sudan pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] collections. *Plant Genetic Resources*, 12(1), 83.
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, 100(5), 1085–1094.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>.

- Baker, R. J., Campbell, A. B., & Tipples, K. H. (1971). Heritabilities of and correlations among quality traits in wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 51(6), 441-448.
- Balanzà Vicente, Roig-Villanova Irma, Di Marzo Maurizio, M. S. and C. L. (2016). Seed abscission and fruit dehiscence required for seed dispersal rely on similar genetic networks. *The Company of Biologists Ltd | Development*, 3372–3381. <https://doi.org/10.1242/dev.135202>.
- Balzarini, M., Di Rienzo, J. (2016). FCA, Universidad Nacional de Córdoba. *InfoGen versión 2016*. Cordoba, Cordoba, Argentina: FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Obtenido de <http://www.info-gen.com.ar>
- Bernardo, R. (2008). Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science*, 48(5), 1649-1664.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055.
- Bhandari H.S., Ebina M., Bouton J.H., Rudrabhatla S.V., Goldman S.L. (2011) *Panicum*. In: Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Millets and Grasses. C. Kole (ed.). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 11:175-196.
- Bilgin, O. Ğ. U. Z., Korkut, K. Z., Başer, I., Dağlioğlu, O. R. H. A. N., Öztürk, I., Kahraman, T., & Balkan, A. (2011). Genetic variation and inter-relationship of some morpho-physiological traits in durum wheat (*Triticum durum* (L.) Desf.). *Pakistan Journal of Botany*, 43(1), 253-260.
- Boe, A. (2003). Genetic and environmental effects on seed weight and seed yield in switchgrass. *Crop Science*, 43(1), 63-67.
- Bogdan, A. V. (1977). *Tropical pasture and fodder plants*. Longman. London.
- Boiteux, L. S., & Simon, P. W. (1999). *Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot*. 124(1), 32–38.
- Brown, W., & Emery, W. (1958). Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *American Journal of Botany*, 45(4), 253–263. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb13125.x>

- Bryant, W. G. (1967). Plant testing at scone research station-a note on morphological variability within the species *Panicum coloratum* L. *Journal of the Soil Conservation Service of NSW*, 23, 290-302.
- Burgos, E. (2012). *Estudio de variabilidad de una colección de Panicum coloratum var. coloratum* (Doctoral dissertation, Tesis Grado Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe).
- Burson, B. L., Correa, J., & Potts, H. C. (1983). Anatomical Basis for Seed Shattering in Kleingrass and Guineagrass1. *Crop Science*, 23(4), 747. <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183x002300040035x>.
- Casler, M. D., Fales, S. L., McElroy, A. R., Hall, M. H., Hoffman, L. D., Undersander, D. J., & Leath, K. T. (2002). Half-sib family selection for forage yield in orchardgrass. *Plant Breeding*, 121(1), 43-48.
- Charters, Y. M., & Wilkinson, M. J. (2000). The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(1), 160-166.
- Chaudhury, A. M., Koltunow, A., Payne, T., Luo, M., Tucker, M. R., Dennis, E. S., & Peacock, W. J. (2001). Control of early seed development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 677-699.
- Cidade, F. W., Dall'Agnol, M., Bered, F., & de Souza-Chies, T. T. (2008). Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae: Panicoideae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(2), 235-246.
- Colabelli, M., Agnusdei, M., Mazzanti, A., & Labreuveux, M. (1998). El proceso de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras como base para el manejo de la defoliación. *Boletín técnico*, 148.
- Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2), 169-196.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal*

Society B: Biological Sciences, 363(1491), 557-572.

- Crins, W. J. (1991). The genera of Paniceae (Gramineae: Panicoideae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum. Supplementary Series*, 1, 171-312.
- Crossa, J. (1990). Statistical analyses of multilocation trials. In *Advances in Agronomy* (Vol. 44, pp. 55-85). Academic Press.
- Cubero, J. I. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal* (2013th ed.). Mundiprensa.
- De León M. (2004) Ampliando la frontera ganadera. De León, M. (ed). Proyecto Ganadero Regional. Informe Técnico n° 1. INTA Manfredi, Córdoba p. 29.
- De Wet, J. M. ., & Harlan, J. . (1975). Weeds and Domesticates: Evolution in the man-made habitat. *Economic Botany*, 29, 99–108.
- Di Nucci de Bedendo, E., Spada, M. D. C., Sevilla, G. H., & Valentinuz, O. R. (2011). Crecimiento de alfalfa en tres ambientes de la región centro de Argentina. In *Congreso Argentino de Producción Animal. 34. Joint Meeting ASAS-AAPA*. 1. 2011 10 04-07, 4-7 de octubre de 2011. Mar del Plata, Buenos Aires. AR.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). *InfoStat*. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Do Valle, C. B. (2001, February). Genetic resources for tropical areas: achievements and perspectives. In *Proceed of the XIX International Grassland Congress. São Pedro, São Paulo, Brazil. Brazilian Soc Anim Husb. Sociedade Brasileira de Zootecnia* (pp. 477-482).
- Doria, J. (2010). A general information on seeds: its production, preservation and storage. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85.
- Dreher, N., Pisani, M., Tomás, M. A. y Berone, G. (2008). Producción y dinámica de la dehiscencia de semillas en poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariensis*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 28, 349–543.
- Dreher N. (2011) Variabilidad genética en caracteres asociados al vigor de plántula entre y dentro de poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. Tesis Maestría, Universidad Nacional de Rosario, Argentina. pp. 73.

- Dudley, J. W., & Moll, R. H. (1969). Interpretation and use of estimates of heritability and genetic variances in plant breeding 1. *Crop science*, 9(3), 257-262.
- Eggers, L., Cadenazzi, M., & Boldrini, I. I. (2004). Phyllochron of *Paspalum notatum* Fl. and *Coelorhachis selloana* (Hack.) Camus in natural pasture. *Scientia Agricola*, 61(4), 353-357.
- Eckert, C. G., & Barrett, S. C. (1993). Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany*, 80(10), 1175-1182.
- Falconer, D. S. (1986). Introduction a la genetica cuantitativa. *CECSA México*.
- Falconer D.S., Mackay T.F.C. (1996) Introduction to Quantitative Genetics, Ed 4. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Ferreira, M. E., Fernández, J. N., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Federal District, Brazil: Embrapa.
- Fikiru, E., Tesfaye, K., & Bekele, E. (2010). A comparative study of morphological and molecular diversity in Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medikus) landraces. *African Journal of Plant Science*, 4(7), 242–254. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/ajps/AJPS/PDF/Pdf2010/Jul/Fikiru>
- Finch-Savage & Leubner-Metzger. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523.
- Forster, J. W., & Spangenberg, G. C. (1999). Forage and turf-grass biotechnology: principles, methods, and prospects. In *Genetic Engineering* (pp. 191-237). Springer, Boston, MA.
- Forster, J. W., Jones, E. S., Kölliker, R., Drayton, M. C., Durnsday, J. L., Dupal, M. P., ... Smith, K. F. (2001). Development and Implementation of Markers for Forage Crop Improvement. *Molecular Breeding Of Forage Crops*, 101–133.
- Fossati, J. L., & Bruno, O. A. (1982). Comportamiento de especies forrajeras de clima templado y subtropical en el centro oeste de la provincia de Santa Fe. In *INTA Publicación técnica* (Vol. 21, p. 43).
- Franco, J., Crossa, J., Ribaut, J. M., Bertran, J., Warburton, M. L., & Khairallah, M. (2001). A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant

- genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(6–7), 944–952. <https://doi.org/10.1007/s001220100641>
- Freckmann, R. W., & Lelong, M. G. (2002). Nomenclatural changes and innovations in *Panicum* and *Dichantherium* (Poaceae: Paniceae). *SIDA, Contributions to Botany*, 161–174.
- Garayalde, A. F., Poverene, M., Cantamutto, M., & Carrera, A. D. (2011). Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. *Annals of Applied Biology*, 158(3), 305–317.
- Giussani, L., Cota-Sánchez, J., Zuloaga, F., & Kellogg, E. (2001). A molecular phylogeny of the grass subfamily panicoideae (poaceae) shows multiple origins of. *American Journal of Botany*, 88(11), 1993–2012. <https://doi.org/10.2307/3558427>.
- Gomide, C. A. D. M., Paciullo, D. S. C., Costa, I. D. A., Lima, A. M., Castro, C. R. T. D., & Léo, F. J. D. S. (2011). Morphogenesis of dwarf elephant grass clones in response to intensity and frequency of defoliation in dry and rainy seasons. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(7), 1445–1451.
- González, A., & Aguirre, X. (2007). Inter simple sequence repeats (ISSRs). *Ecología Molecular. Compilado por Luis Eguiarte, Valeria Souza y Xitlali Aguirre*, 567–571.
- Goossens, A. P. (1934). Notes on African grasses: XVI. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)*, 195–202.
- Gould, FW (1975). *Las hierbas de Texas*. Universidad de Texas A&M, Estación Experimental Agrícola de Texas.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. (2002) *Genética* 7ª edición. Ed. Interamericana-McGraw Hill. Madrid. pp.846.
- Grimanelli, D., Leblanc, O., Perotti, E., & Grossniklaus, U. (2001). Developmental genetics of gametophytic apomixis. *TRENDS in Genetics*, 17(10), 597–604.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., & Owen, J. L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89(7–8), 998–1006.

- Hacker, & Loch. (1997). Tropical forage seed production: producer's views and research opportunities. *XVIII International Grassland Congress, Winnipeg*.
- Hanna, W. W., & Bashaw, E. C. (1987). Apomixis: Its Identification and Use in Plant Breeding. *Crop Science*, 27, 1136–1139.
- Hayes, P., Stucker, R., & Wandrey, G. (1989). The domestication of American wildrice. *Economic Botany*, 43(2), 203–214.
- Henning, J. A., & Townsend, M. S. (2005). Field-based estimates of heritability and genetic correlations in hop. *Crop science*, 45(4), 1469-1475.
- Hernández, F. E., Pioli, R. N., Peruzzo, A. M., Formento, Á. N., & Pratta, G. R. (2015). Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* (teleomorfo desconocido: Diaporthales) de la región templada y subtropical de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 63(3), 871-884.
- Hillman, G., & Stuart Davies, M. (1990). Measured domestication rates in wild wheats and barley under primitive cultivation, and their archaeological implications. *Journal of World Prehistory*, 4, 157–222.
- Hintum, T. J. L. van, Wiel, C. C. M. van de, Visser, D. L., Treuren, R. van, & Vosman, B. (2007). The distribution of genetic diversity in a Brassica oleracea gene bank collection related to the effects on diversity of regeneration, as measured with AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 777–786. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0456-2>
- Hutchison, D., & Bashaw, E. (1964). Cytology and Reproduction of *Panicum coloratum* and Related Species. *Crop Science*.
- INDEC. (2002). *Superficies implantada en las EAP con y sin límites definidos, por grupo de cultivos, según período de ocupación y provincia*. Retrieved from <https://www.indec.gob.ar/indec/web/Nivel4-Tema-3-8-87>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). (2018). *Censo Nacional Agropecuario (Resultados preliminares. Agricultura)*.
- Jauhar, P. P., & Joshi, A. B. (1966). Cytological Studies in Some Species of *Panicum*. *Cytologia*, 31(2), 153–159. <https://doi.org/10.1508/cytologia.31.153>.

- Kahrizi D., Maniee M., Mohammadi R., Cheghamirza K. (2010) Estimation of genetic parameters related to morpho-agronomic traits of durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum*). *Biharean Biologist* 4:93-97.
- Kameswara Rao, N. . (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3(2), 136–145.
- Karp, A. (1997). *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies* (No. 2). Bioversity International.
- Kennard, W. C., Phillips, R. L., & Porter, R. A. (2002). Genetic dissection of seed shattering , agronomic , and color traits in American wildrice (*Zizania palustris* var . *interior* L.) with a comparative map. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6–7), 1075–1086. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0988-z>
- Kobs, G. (1998). Isolation of RNA from Plant, Yeast and Bacteria. In *Promega Notes*.
- Koltunow, & Ozias-Akins. (2013). Apomixis. In: Seed Genomics, 1st edition. Ed. Philip W. Becraft. Wiley and Sons. In 5 (pp. 83–110).
- Komatsu, T., & Suzuki, S. (1987). Chromosome numbers, chromosome behavior and mode of reproduction in introduced strains of *Panicum* species. *Journal of Japanese Society of Grassland Science (Japan)*.
- Komatsu, T., Ubi, B. E., & Enoki, H. (2007). Crossability and amplified fragment length polymorphism variation among four types of *Panicum coloratum* L. and meiotic chromosome paring of their F1 hybrids. *Grassland Science*, 53(2), 97–102. <https://doi.org/10.1111/j.1744-697x.2007.00079.x>
- Komatsu, S. & Hossain, Z. (2017). Preface—Plant Proteomic Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 88–. doi:10.3390/ijms18010088.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D., & Pandey, B. (2009). Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2(4), 141–162.
- Larik, A. S., Malik, S. I., Kakar, A. A., & Naz, M. A. (2000). Assessment of heritability and genetic advance for yield components in *G. hirsutum*. *Scient. Khyber*, 13, 39-44.
- Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic

- resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(2), 277-292.
- Linnaeus, C. (1753). *Panicum*. In *Species Plantarum* (Stockholm, pp. 55–59). Ray Society, London, UK.
- Lipe, J. A., & Morgan, P. W. (1972). Ethylene: Role in Fruit Abscission and Dehiscence Processes. *Plant Physiology*, 50(6), 759–764. <https://doi.org/10.1104/pp.50.6.759>
- Loch D. S. y Ferguson J. E. (1999). Forage Seed Production. Volume 2: Tropical and Subtropical Species. In *Tropical and Subtropical Forage Seed Production: An overview* (p. 10). CAB International.
- Maina, M. (2012). *Variabilidad en caracteres relacionados a la producción de semilla en poblaciones de Panicum coloratum var. makarikariense*. Universidad Nacional de Rosario.
- Majidi, M. M., Mirlohi, A., & Amini, F. (2009). Genetic variation, heritability and correlations of agro-morphological traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Euphytica*, 167(3), 323-331.
- Mariotti, J. A., & Collavino, N. G. (2014). Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos (No. 631.523). Orientación Gráfica.
- Martínez M.C., Helguera M., Carrera A. (2004) Marcadores moleculares. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte I. Capítulo 5. Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L. (Eds). p. 648.
- Martínez, M.C.; Helguera, M.; Carrera, A. (2010). Capítulo 5: Marcadores Moleculares. Pp: 70-85. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editores: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Meakin, P. J., & Roberts, J. A. (1990a). Dehiscence of fruit in oilseed rape (*Brassica napus* L.) I. Anatomy of pod dehiscence. *Journal of Experimental Botany*, 41(8), 995-1002.
- Meakin, P. J., & Roberts, J. A. (1990b). Dehiscence of Fruit in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) II. The role of cell wall degrading enzymes and ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 41(8), 1003-1011.

- Meissner, H. H. (1997). Recent research on forage utilization by ruminant livestock in South Africa. *Animal Feed Science and Technology*, 69(1–3), 103–119. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)81626-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)81626-4)
- Monti M., Delgado G., Jozami D. (2012) Utilización de la *Gramma rhodes* para el mejoramiento de bajos en la pampa húmeda. Sitio Argentino de Producción Animal 1-14.
- Moser, L. E. (2000). Morphology of germinating and emerging warm-season grass seedlings. *Native Warm-Season Grasses: Research Trends and Issues*, 30, 35-47.
- Nguyen H.N., Sleper D.A. (1983a) Theory and application of half-sib matings in forage grass breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 64:187-196.
- Nguyen H.T., Sleper D.A. (1983b) Genetic variability of seed yield and reproductive characters in tall fescue. *Crop Science* 23:621-626.
- Novoselovic, D., Baric, M., Drezner, G., Gunjaca, J., & Lalic, A. (2004). Quantitative inheritance of some wheat plant traits. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1), 92-98.
- Ortiz, J. P. A., Quarin, C. L., Pessino, S. C., Acun, C., Marti, E. J., Espinoza, F., ... Nacional, U. (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses : what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany*, 112, 767–787. <https://doi.org/10.1093/aob/mct152>
- Ovesná, J., Poláková, K., & Leisová, L. (2002). DNA Analyses and their Applications in Plant Breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 38(1), 29–40.
- Pandit, S., & Gupta, S. (2011). A comparative study on distance measuring approaches for clustering. *International Journal of Research in Computer Science*, 2(1), 29-31.
- Patterson, S. E. (2001). Cutting loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(2), 494–500. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.494>.
- Pérez, H. E. (2005). Características de las especies forrajeras adaptadas a las condiciones del NO del país. In *FORRAJES 2005* (pp. 1–6).
- Petruzzi, H., Stritzler, N., Adema, E. O., Ferri, C. M., & Pagella, J. H. (2003). Mijo perenne - *Panicum coloratum*. In *EEA Anguil INTA* (pp. 1–28).
- Pham, T. D., Geleta, M., Bui, T. M., Bui, T. C., Merker, A., & Carlsson, A. S. (2011).

- Comparative analysis of genetic diversity of sesame (*Sesamum indicum* L.) from Vietnam and Cambodia using agro-morphological and molecular markers. *Hereditas*, 148(1), 28–35. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2010.02196.x>
- Pioli, R. N., Morandi, E. N., Martínez, M. C., Lucca, F., Tozzini, A., Bisaro, V., & Hopp, H. E. (2003). Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology*, 93(2), 136-146.
- Pittaro, G., Tomas, M. A., Bruno, C. I., & Taleisnik, E. (2012, August). Correlación entre la evaluación fenotípica bajo estrés por frío y la caracterización molecular de materiales de *Panicum coloratum* var *coloratum*. In *Décimo Congreso Latinoamericano de Sociedades de Estadística*.
- Plucknett, D. L., Smith, N. J. H., Williams, J. T., & Anishetty, N. M. (1987). Gene Banks and the FWorld's Food. In *Book reviews* (pp. 241–242).
- Pritchard, A. J., & De Lacy, I. H. (1974). The Cytology , Breeding System and Flowering Behaviour of *Panicum coloratum*. *Australian Journal of Botany*, 22, 57–66.
- Ramírez, L., & Egaña, B. (2003). Guía de conceptos de genética cuantitativa. *Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra*.
- Ray, D. T., Veatch-Blohm, M. E., Teetor, V. H., & Walsh, B. (2007). Upper and lower heritability estimates in guayule based on mode of reproduction. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(2), 213-218.
- Reddy, M. P., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17.
- Rimieri, P., & Wolff, R. (2010). La genética y el estado actual de la obtención y adopción de cultivares forrajeros en Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 21(2), 1–7.
- Roberts, J. A., Whitelaw, C. A., Gonzalez-Carranza, Z. H., & McManus, M. T. (2000). Cell separation processes in plants - Models, mechanisms and manipulation. *Annals of Botany*, 86(2), 223–235. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1203>.
- Sabu, K. K., Abdullah, M. Z., Lim, L. S., & Wickneswari, R. (2009). Analysis of heritability

- and genetic variability of agronomically important traits in *Oryza sativa* x *O. rufipogon* cross. *Agronomy Research* 7(1), 97-102.
- Schlichting, C. D. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 17(143), 667–693.
- Senanayake, N., Lanka, S., & Naylor, R. E. L. (1994). Variation in development of contrasting rice cultivars. *The Journal of Agricultural Science*, 123(April 2016), 35–39. <https://doi.org/10.1017/S0021859600067745>
- Smith, K. F., Reed, K. F. M., & Foot, J. Z. (1997). An assessment of the relative importance of specific traits for the genetic improvement of nutritive value in dairy pasture. *Grass and Forage Science*, 52(2), 167–175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1997.tb02347.x>
- Spence, J., Vercher, Y., Gates, P., & Harris, N. (1996). “Pod shatter” in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *Journal of Microscopy*, 181(2), 195–203. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1996.111391.x>
- Spooner, D., Van Treuren, R., & De Vicente, M. C. (2005). *Molecular markers for genebank management* (IPGRI Tech). Rome (IT): IPGR.
- Sripathi, R., Kakani, V. G., & Wu, Y. (2013). Genotypic variation and trait relationships for morphological and physiological traits among new switchgrass populations. *Euphytica*, 191(3), 437–453. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0911-5>
- Steinbrecher, T., & Leubner-Metzger, G. (2017). The biomechanics of seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 68(4), 765-783.
- Stritzler, N. P. (2008). Producción y calidad nutritiva de especies forrajeras megatérmicas. *Revista Argentina de Producción Animal*, 28(2), 165-168.
- Taleisnik, E., Pérez, H., Córdoba, A., Moreno, H., García Seffino, L., Arias, C., ... Zenoff, A. (1998). Salinity effects on the early development stages of *Panicum coloratum*: Cultivar differences. *Grass and Forage Science*, 53(3), 270–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.1998.00139.x>.
- Tanksley, S. D. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 205-233.

- Tischler, C., & Ocumpaugh, W. (2004). Kleingrass, Blue Panic, and Vine Mesquite. *Warm-Season (C4) Grasses*, (45), 623–649.
- Tischler, C. R., & Young, B. A. (1987). Development and Characteristics of a Kleingrass Population with Reduced Post-Harvest Seed Dormancy. *Crop Science*, 27(6), 1238–1241. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183x002700060030x>
- Tsumura, Y., Ohba, K., & Strauss, S. H. (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 92(1), 40-45.
- Türk, M., Albayrak, S., & Celik, N. (2007). Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield components of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(3), 155-158.
- Valdés-Reyna, J., Zuloaga, F. O., Morrone, O., & Aragón, L. (2009). El género *Panicum* (Poaceae: Panicoideae) en el noreste de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (84), 59-82.
- Van De Wouw, M., Jorge, M. A., Bierwirth, J., & Hanson, J. (2008). Characterisation of a collection of perennial *Panicum* species. *Tropical Grasslands*, 42(1), 40.
- Van de Wouw, M., Mohammed, J., Jorge, M. A., & Hanson, J. (2009). Agro – morphological characterisation of a collection of *Cynodon*. *Tropical Grasslands*, 43, 151–161.
- Vogel, K. P., & Burson, B. L. (2004). Breeding and genetics. In S. S. S. of A. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America (Ed.), *Warm-Season (C4) Grasses* (pp. 67–96). <https://doi.org/10.1079/9781845934897.0067>
- Walker Rose, L. I. (2005). *Estimation of Genetic Parameters in Several Switchgrass (Panicum virgatum L.) Populations*. (Doctoral dissertation, Oklahoma State University).
- Weining, S., & Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetics*, 82, 209–216.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants: principles, methods, and applications*. CRC press.
- West, O. (1952). Promising new grasses for seeded pastures in Southern Rhodesia. *The*

Rhodesian Agricultural Journal, 49, 89-95.

- Wilson, R. G. (1963). Bambatsi grass for Downs and Brigalow. *Queensland Agricultural Journal*, 89, 118–119.
- Winter, P., & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 438-448.
- Wiskerchen, M. (1998). Technically Speaking: SV Total RNA Isolation System. In *Promega Notes*.
- Wolfe, A. (2000). ISSR resource website. URL: <http://www.biosci.ohiostate.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html> (accessed: October 21, 2012).
- Woods, D. L., & Clark, K. W. (1976). Preliminary observations on the inheritance of non-shattering habit in wild rice. *Canadian Journal of Plant Science*, 56(1), 197–198. <https://doi.org/10.4141/cjps76-029>
- Wouw, M. Van De, Kik, C., Hintum, T. Van, & Treuren, R. Van. (2009). Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1017/S1479262109990062>
- Young, B. A. (1991). Heritability of resistance to seed shattering in kleingrass. *Crop Science*, 31(5), 1156-1158.
- Young B.A. (1994) Genetic variation in a *Panicum coloratum* L. population with a limited germplasm base. *Euphytica* 75:71-76.
- Young B.A., Tischler C.R. (1994) Registration of TEM-SV1 kleingrass germplasm. *Crop Science* 34:1414.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.
- Zuloaga F.O. (1987) Systematics of new world species of *Panicum* (Poaceae: Paniceae). In: Soderstrom T.R., Hilu K.W., Campbell C.S., Barkworth M.E. (Eds) *Grass Systematics and Evolution*. pp 287-306.

ANEXO

Capítulo I

Tabla I a. Número de cariopses caídos en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera. Año 2017.

N° planta	Número de cariopses caídos								Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	
4	0	0	0	3	4	17	34	9	67
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	3	0	0	0	0	3
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	4	12	0	16
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	11	13	8	17	4	53
38	0	0	0	0	0	0	9	15	24
45	0	0	0	0	7	0	1	3	11
49	0	0	0	0	0	0	1	0	1
56	0	0	0	0	4	0	0	0	4
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	8	25	57	90
75	0	0	0	1	2	2	9	7	21
81	0	0	2	0	0	0	0	0	2
90	0	0	0	0	7	49	7	1	64
Total caídos	0	0	2	18	37	88	115	96	356

Tabla I b. Número de cariopses caídos en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi. Año 2017.

N° planta	Número de cariopses caídos								Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	
5	0	0	0	0	0	9	18	7	34
14	0	0	0	0	1	0	8	0	9
21	0	0	0	0	1	5	10	37	53
25	0	0	0	0	0	0	2	0	2
34	0	0	0	0	1	12	31	17	61
39	0	0	0	0	0	0	2	12	14
48	0	0	0	0	0	2	5	7	14
52	0	0	0	0	0	13	15	8	36
55	0	0	0	4	6	105	70	17	202
63	0	0	0	3	20	0	1	0	24
69	0	0	0	0	1	4	0	4	9
74	0	0	0	4	1	4	22	62	93
81	0	0	0	0	1	0	4	12	17
90	0	0	5	0	0	1	9	7	22
Total caídos	0	0	5	11	32	155	197	190	590

Tabla I c. Número de cariopses caídos en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera. Año 2019.

N° planta	Número de cariopses caídos								Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	
4	0	0	0	2	9	15	30	41	97
11	0	0	0	1	0	0	0	0	1
16	0	0	0	3	2	4	2	1	12
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	3	15	6	24
30	0	0	0	5	3	0	0	0	8
33	0	0	0	9	12	21	20	17	79
38	0	0	0	0	0	0	5	3	8
45	0	0	0	0	0	0	1	4	5
49	0	0	0	0	0	0	1	0	1
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	3	5	6	13	23	50
75	0	0	0	1	3	3	7	11	25
81	0	0	0	0	0	5	0	7	12
90	0	0	0	0	10	24	20	36	90
Total caídos	0	0	0	24	44	81	114	149	412

Tabla I d. Número de cariopses caídos en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi. Año 2019.

N° planta	Número de cariopses caídos								Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	
5	0	0	0	0	0	11	23	34	68
14	0	0	0	0	2	1	6	4	13
21	0	0	0	0	1	4	7	15	27
25	0	0	0	0	0	0	4	6	10
34	0	0	0	0	2	34	61	52	149
39	0	0	0	0	0	0	1	0	1
48	0	0	0	0	0	0	3	5	8
52	0	0	0	0	0	0	11	27	38
55	0	0	0	6	14	42	59	47	168
63	0	0	0	2	7	23	9	17	58
69	0	0	0	0	2	11	6	8	27
74	0	0	5	4	6	39	13	9	76
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Total caídos	0	0	5	12	34	165	204	224	644

Tabla II a. Datos meteorológicos semanales. Año 2017.

Datos meteorológicos	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
Pp media	0,00	4,21	14,57	0,00	0,06	0,00	0,00	1,93
°T media	23,21	24,27	22,69	16,86	17,91	17,6	22,03	15,13
°H media	83,00	81,86	76,71	73,07	82,71	72,71	79,71	83,33
Vientos medios	2	2	3	2	2	2	2	2

Tabla II b. Datos meteorológicos semanales. Año 2019.

Datos meteorológicos	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
Pp media	0,71	0,71	0,00	1,49	3,71	3,06	1,76	7,07
°T media	16,94	18,91	20,36	18,71	18,47	16,16	17,67	15,83
°H media	79,13	82,10	75,74	77,90	79,39	88,31	81,70	90,63
Vientos medios	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla III a. Valores absolutos de semillas germinadas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense*.

	Kapivera	Bambatsi
Semillas germinadas	49	135
Semillas no germinadas	11	15
Total	60	150

Tabla III b. Valores porcentuales de semillas germinadas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense*.

	Kapivera	Bambatsi
Semillas germinadas	81,7	90
Semillas no germinadas	18,3	10
Total	100	100

Tabla III c. Valores absolutos de semillas germinadas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	Total
Semillas germinadas	5	4	5	6	6	6	3	4	5	5	49
Semillas no germinadas	1	2	1	0	0	0	3	2	1	1	11
Total	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	60

Tabla III d. Valores porcentuales de semillas germinadas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	Total
Semillas germinadas	8,3	6,7	8,3	10	10	10	5	6,7	8,3	8,3	81,7
Semillas no germinadas	1,7	3,3	1,7	0	0	0	5	3,3	1,7	1,7	18,3
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100

Tabla III e. Valores absolutos de semillas germinadas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	Total
Semillas germinadas	14	10	14	15	14	14	14	13	14	13	135
Semillas no germinadas	1	5	1	0	1	1	1	2	1	2	15
Total	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150

Tabla III f. Valores porcentuales de semillas germinadas en *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	Total
Semillas germinadas	9,3	6,7	9,3	10	9,3	9,3	9,3	8,7	9,3	8,7	90
Semillas no germinadas	0,7	3,3	0,7	0	0,7	0,7	0,7	1,3	0,7	1,3	10
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100

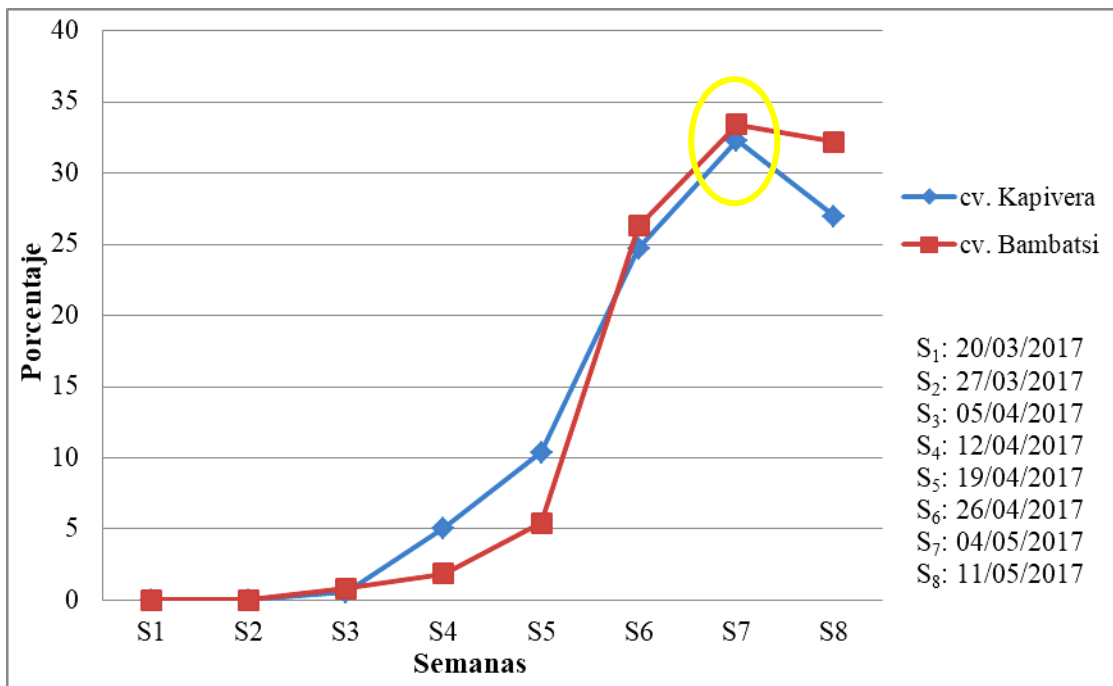


Fig. 1. a. Porcentaje de carioses caídos por semana en cada cultivar (2017).

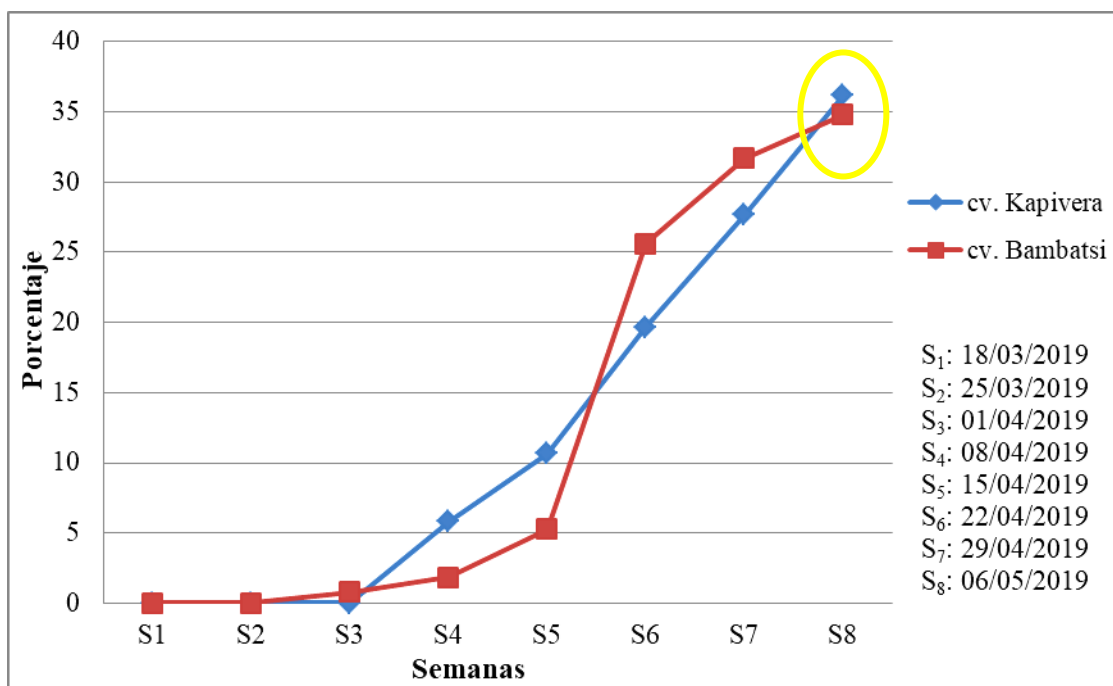


Fig. 1. b. Porcentaje de carioses caídos por semana en cada cultivar (2019).

Capítulo II

Tabla IV a. Número de cariopses caídos en la progenie de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera. Año 2019.

Nº planta	Número de cariopses caídos en la progenie								Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	
K4 _I	0	1	0	0	0	0	0	0	1
K4 _{II}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4 _{III}	0	0	0	0	3	15	20	40	78
K4 _{IV}	0	0	1	2	10	15	18	0	46
K72 _I	0	0	16	20	25	43	49	97	250
K72 _{II}	0	0	6	10	23	25	0	0	64
K72 _{III}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K72 _{IV}	0	0	4	6	14	47	50	65	186
K72 _V	0	0	4	4	12	14	16	19	69
K90 _I	0	0	8	10	20	4	0	0	42
K90 _{II}	1	0	0	0	1	0	0	0	2
K90 _{III}	0	0	0	2	3	7	0	0	12
K90 _{IV}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total caídos	1	1	39	54	111	170	153	221	750

Tabla IV b. Número de cariopses caídos en la progenie de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi. Año 2019.

Nº planta	Número de cariopses caídos en la progenie								Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	
B21 _I	0	1	10	11	15	7	30	102	176
B21 _{II}	0	0	3	5	9	20	27	40	104
B21 _{III}	0	1	3	5	7	17	30	73	136
B21 _{IV}	1	0	0	0	0	0	0	1	2
B34 _I	1	0	0	0	0	0	0	0	1
B34 _{II}	0	0	12	15	20	20	20	23	110
B34 _{III}	0	0	2	4	21	70	96	120	313
B34 _{IV}	0	1	5	13	25	29	35	39	147
B55 _I	0	0	11	16	19	16	22	35	119
B55 _{II}	0	0	0	0	1	10	12	20	43
B55 _{III}	0	0	0	0	0	12	30	59	101
B55 _{IV}	0	0	0	3	5	9	15	18	50
B74 _I	5	1	7	10	14	18	30	72	157
B74 _{II}	0	0	3	7	13	7	0	0	30
B74 _{III}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total caídos	7	4	56	89	149	235	347	602	1489

Tabla IV c. Número de cariopses caídos en la progenie de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Kapivera. Año 2020.

Nº planta	Número de cariopses caídos en la progenie						Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	
K4 _I	0	1	0	0	0	0	1
K4 _{II}	0	0	0	0	3	5	8
K4 _{III}	0	0	0	0	3	9	12
K4 _{IV}	0	0	1	2	10	15	28
K72 _I	0	0	9	12	25	33	79
K72 _{II}	0	0	6	10	23	25	64
K72 _{III}	0	0	0	0	0	0	0
K72 _{IV}	0	0	4	6	14	32	56
K72 _V	0	0	4	4	12	14	34
K90 _I	0	0	8	10	20	4	42
K90 _{II}	1	0	0	0	1	0	2
K90 _{III}	0	0	0	2	3	7	12
K90 _{IV}	0	0	0	0	0	0	0
Total caídos	1	1	32	46	114	144	376

Tabla IV d. Número de cariopses caídos en la progenie de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* cv. Bambatsi. Año 2020.

Nº planta	Número de cariopses caídos en la progenie						Total caídos
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	
B21 _I	0	1	7	11	15	7	41
B21 _{II}	0	0	3	5	9	20	37
B21 _{III}	0	1	3	5	7	17	33
B21 _{IV}	1	0	0	0	0	0	1
B34 _I	1	0	0	0	0	0	1
B34 _{II}	0	0	9	11	15	20	55
B34 _{III}	0	0	2	4	17	30	53
B34 _{IV}	0	1	5	13	20	29	68
B55 _I	0	0	10	16	19	16	61
B55 _{II}	0	0	0	0	1	10	11
B55 _{III}	0	0	0	0	0	12	12
B55 _{IV}	0	0	0	3	5	9	17
B74 _I	3	1	7	10	14	18	53
B74 _{II}	0	0	3	7	13	7	30
B74 _{III}	0	0	0	0	0	0	0
Total caídos	5	4	49	85	135	195	540

Tabla V a. Datos meteorológicos semanales. Año 2019.

Datos meteorológicos	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
Pp media	0,00	4,04	4,57	0,04	3,70	0,00	9,06	8,13
°T media	28,11	26,33	25,19	22,36	21,31	20,61	18,53	18,11
°H media	82,10	82,86	77,72	74,37	80,81	72,10	78,67	83,00
Vientos medios	2	3	3	2	2	3	2	2

Tabla V b. Datos meteorológicos semanales. Año 2020.

Datos meteorológicos	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Pp media	0,00	0,01	0,00	0,19	1,11	0,06
°T media	27,14	29,11	28,32	28,11	27,06	26,16
°H media	65,16	70,10	62,54	67,90	69,79	77,61
Vientos medios	0	0	0	0	0	0

Capítulo III

Tabla VI. Mediciones de muestras de ADN extraído en espectrofotómetro.

	CC ADN (µg/ml)	Integridad (A260/A280)	Pureza (A260/A230)
K1	160	1,73	1,05
K4	107	1,3	1,4
K7	40	1,88	1,3
K11	60	1,71	1,71
K16	111	1,86	1,86
K23	69	1,83	1,78
K24	75	1,8	1,53
K30	103	1,67	1,78
K33	44	1,68	1,67
K38	135	1,83	2,2
K42	143	1,78	1,93
K45	52	1,8	1,86
K49	82	1,9	1,54
K54	70	1,87	1,48
K56	72	1,9	2,1
K64	92	1,9	1,45
K72	115	1,77	1,92
K75	89	1,88	2,2
K81	25	2	1,8
K90	114	1,86	1,95
B3	39	2,1	1,9
B5	168	1,63	1,71
B14	45	1,63	1,4
B17	72	1,81	1,52
B21	31	1,93	1,25
B25	81	1,87	1,95
B34	135	1,83	1,86
B39	32	1,74	1,44
B41	72	1,9	1,61
B48	81	1,91	1,67
B49	53	1,75	1,68
B52	65	1,88	1,5
B55	61	1,7	1,32
B63	38	2,14	1,37
B69	37	1,7	1,15
B74	94	1,86	1,92
B81	54	2,1	2,3
B88	20	2,1	0,68
B89	75	1,7	1,4
B90	33	1,52	1,16

Demostración de la existencia de asociación entre la diversidad molecular y la caída de cariopses ($p < 0,05$)

Variable	A11	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2017 0		22	38,73	45,55	21,50	6,18	0,0128
Total caídas 2017 1		8	11,75	22,64	1,00		

Variable	A11	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2019 0		22	42,59	47,33	26,00	4,76	0,0287
Total caídas 2019 1		8	14,88	30,71	4,50		

Hay diferencias significativas entre el *loci* A11 del ISSR 2 y el carácter total caída de cariopses 2017 y 2019.

Variable	A2	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2017 0		22	39,45	46,60	23,00	3,52	0,0602
Total caídas 2017 1		8	9,75	9,66	7,50		

Variable	A2	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2019 0		22	44,59	48,86	27,00	4,07	0,0431
Total caídas 2019 1		8	9,38	10,23	6,50		

Hay diferencias significativas entre el *loci* A2 del ISSR 2 y el carácter total caída de cariopses para el año 2019.

Demostración de la inexistencia de asociación entre la diversidad molecular y la caída de cariopses ($p > 0,05$)

Variable	A31	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2017 0		25	33,36	44,69	16,00	0,25	0,6159
Total caídas 2017 1		5	22,40	27,37	21,00		

Variable	A31	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2019 0		25	36,72	46,30	13,00	0,15	0,6960
Total caídas 2019 1		5	27,60	39,85	8,00		

No hay diferencias significativas entre el *loci* A31 del ISSR 2 y el carácter total caída de cariopses 2017 y 2019.

Variable	A51	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2017 0		25	33,36	44,69	16,00	0,25	0,6159
Total caídas 2017 1		5	22,40	27,37	21,00		

Variable	A51	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Total caídas 2019 0		25	37,00	46,10	13,00	0,41	0,5210
Total caídas 2019 1		5	26,20	40,83	8,00		

No hay diferencias significativas entre el *loci* A51 del ISSR 2 y el carácter total caída de cariopses 2017 y 2019.