

**VARIABILIDAD GENETICA EN POBLACIONES
NATURALIZADAS DE *Lolium multiflorum* (Lam.)**

Tesis
de la
Ingeniera Agrónoma

Mariela Luciana Acuña

Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del Grado
Académico de

MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL

MAESTRIA EN GENETICA VEGETAL INTA – UNR

MAESTRIA EN GENETICA VEGETAL
Área Mejoramiento Genético
UNR - INTA

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del Grado Académico
de

MAGISTER EN GENETICA VEGETAL

VARIABILIDAD GENETICA EN POBLACIONES

NATURALIZADAS DE *Lolium multiflorum* (Lam.)

Tesis
de la
Ingeniera Agrónoma

Mariela Luciana Acuña

Aprobada por el Jurado de Tesis

.....
Ing Agr. A. Andrés
(MSc, PhD)
Consejero Principal

.....
Ing. Agr. A. Schlatter
(MSc)
Consejero

.....
Ing Agr. B. Rosso
(MSc)
Consejero

.....
Ing. Agr. A. Calzolari (MSc)
Coordinador Académico - INTA

.....
Dra. L. Picardi
Coordinadora Académica – UNR

(Pergamino, 2008)

A Timoteo y Tomás, mis dos soles

AGRADECIMIENTOS

A la Maestría en Genética Vegetal de la Universidad Nacional de Rosario-INTA Pergamino por otorgarme una beca de exención de matrícula para poder realizar esta Carrera de Posgrado.

A la Dra. Adriana Andrés, por brindarme la posibilidad de trabajar en el programa de mejoramiento genético de especies forrajeras de la EEA INTA Pergamino. Por su confianza, por la libertad de trabajo e ideas, por su apoyo y enseñanza. A las Ing. Agr. Msc Ana Rosa Schlatter e Ing. Agr. Msc Beatriz Rosso por aceptar ser parte del comité de mi tesis por brindarme su apoyo, confianza y conocimiento.

Al Grupo del Laboratorio de Marcadores Moleculares de la EEA INTA Pergamino: Ana Rosa, Natalia, Viviana, Carla y Fani. Por la predisposición, la ayuda brindada y por ofrecerme un ambiente de trabajo ameno durante los meses que estuve ahí.

Al Grupo de Mejoramiento de Especies Forrajeras de la EEA Pergamino. A los Ing, Agr. Msc Oscar Bertín, Ing. Agr. Msc Omar Scheneiter, del Grupo Bovinos por su valioso aporte al conocimiento de la especie. A la Sra. Catalina Améndola, de la Sección Estadística de la EEA INTA Pergamino y al Ing. Agr. Msc José de Battista de la EEA INTA Concepción del Uruguay por su aporte invaluable para la interpretación de los análisis estadísticos.

A los Rayenitos por el apoyo y el cariño, en especial a Ale y Raúl por brindarme el tiempo necesario para realizar mis estudios de posgrado durante el tiempo que trabajé con ellos. A Ignacio, Raquel, Juliana, Natalia y Enzo por los viajes y las estadías que hicieron más amena esta etapa.

Agradezco muy especialmente a mi FAMILIA, a mis padres por estar siempre y apoyarme incondicionalmente en cada emprendimiento, a Mamá por tu ayuda invaluable con Timoteo para que pueda finalizar el trabajo de tesis, al igual que a mi esposo Tomás, a Papá, a mis hermanos Gerónimo y Angie, a mi cuñada Anita y a la dulzura de mi sobrina Valentina.

RESUMEN

En los últimos años se ha producido en la Pampa Húmeda Argentina un aumento importante de la superficie ocupada por la agricultura, a expensas de la ocupada por la ganadería, relegando así la actividad ganadera hacia suelos de menor aptitud agrícola. Esta situación ha promovido la necesidad de aumentar la receptividad en los ambientes marginales, con el consecuente riesgo de degradación y afectación de la persistencia productiva de las pasturas. Entre las especies forrajeras de mayor valor productivo en Argentina, se destaca el raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.) también denominado comúnmente raigrás criollo o raigrás italiano, por ser un componente estratégico en los sistemas extensivos ganaderos.

La caracterización de la variabilidad genética en raigrás anual se ha basado durante muchos años en la descripción de caracteres morfo-fisiológicos, básicamente por el interés en su aplicación directa en programas de selección y desarrollo de cultivares. En la actualidad, esta información se ha podido complementar con herramientas biotecnológicas, tales como los marcadores moleculares, brindando así técnicas más directas y predictivas.

El objetivo general del presente trabajo fue determinar la variabilidad genética en caracteres morfo-fisiológicos y a nivel molecular entre y dentro de poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam. provenientes de diversos ambientes de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Córdoba. La colecta incluyó 32 poblaciones, las que fueron caracterizadas agronómicamente a campo en la EEA INTA Pergamino en condición de planta espaciada. A través del análisis de clusters contemplando las variables número de macollos reproductivos, peso total de semilla, y peso de materia seca total, se eligieron 7 poblaciones representativas de los subgrupos más importantes,

las que fueron caracterizadas molecularmente, a través de cuatro microsatélites (SSR) públicos propios de la especie de genoma homólogo.

Los resultados obtenidos determinaron la existencia de una elevada variabilidad genética entre y dentro de poblaciones a nivel agronómico y molecular. Los elevados valores obtenidos en la estimación de los parámetros genéticos de la mayoría de las variables analizadas, sugerirían la posibilidad de realizar selección y permitiría incorporar algunas poblaciones al programa de mejoramiento de raigrás anual diploide. Las poblaciones destacadas por alta productividad de materia seca, rendimiento de semilla y/o condiciones fitosanitarias fueron la 33, 36, 6, 9, 25, 10 y 28.

La diversidad genética analizada mediante el contenido de información polimórfica (PIC) en los SSR varió entre 0,427 y 0,653 y a través de las poblaciones varió entre 0,453 y 0,601. Los resultados obtenidos demostraron que existió una mayor variabilidad genética dentro de las poblaciones que entre las mismas, y una elevada capacidad discriminatoria de los marcadores tipo SSR. A través del presente proyecto se logró desarrollar la puesta a punto de la técnica de microsatélites en *Lolium multiflorum* Lam. en la EEA INTA Pergamino.

El presente trabajo ha intentado abordar ambas caracterizaciones en poblaciones naturalizadas de raigrás anual diploide, y demostrar la utilidad de ambas técnicas en el proceso de caracterización de genotipos para ser incorporados a futuros programas de mejoramiento genético de la especie.

ABSTRACT

GENETIC VARIABILITY BETWEEN NATURALIZED POPULATION OF *Lolium multiflorum* Lam.

Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is one of the most important annual grasses used in Argentina as it is a better strategic component in extensive animal system than other annual forage grass. Characterization of genetic variability in annual ryegrass has been based for many years in the description of morpho-physiological traits, mainly by the interest in its direct application in selection programs and cultivars development. At present, this information has been complemented with biotechnology tools, such as molecular markers, thus providing more direct and predictive techniques. This study was aimed at the assessment of variability within and among Italian ryegrass naturalized populations in Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes and Córdoba, Argentina. Thirty-two natural populations were field characterized agronomically at EEA INTA Pergamino, and seven of these were chosen by cluster analysis and characterized molecularly by SSR. The results identified the existence of a high genetic variability among and within populations for both agronomic and molecular level. The evidence of high values obtained in the estimation of genetic parameters for most of traits studied, suggest the possibility of selection, which would be, enable to incorporate some of the population of annual ryegrass to the breeding program.

1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Taxonomía, distribución geográfica y descripción botánica de la especie.....	4
2.2 Aspectos genéticos de la especie.....	5
2.3 Aspectos agronómicos y productivos de la especie.....	7
2.4 Aspectos sanitarios de la especie.....	8
2.5 Variabilidad genética en especies forrajeras	9
2.6 Marcadores morfológicos y moleculares.....	11
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1. Caracterización Agronómica.....	15
3.1.1 Las poblaciones evaluadas: su recolección.....	15
3.1.2 Las poblaciones evaluadas: su acondicionamiento en invernáculo.....	19
3.1.3 Las poblaciones evaluadas: su transplante a campo experimental.....	19
3.1.4 Los caracteres evaluados	20
3.1.5 Los caracteres vegetativos	21
3.1.6 Los caracteres reproductivos	23
3.1.7 Análisis de la información.....	25
3.1.8 Prueba de distribución normal y transformación de variables.....	25
3.1.9 Análisis de la Variancia.....	26
3.1.10 Análisis de variancia entre poblaciones.....	26
3.1.11 Estimación de componentes de variancia.....	28
3.1.12 Estimación del grado de determinación genética (GDG).....	28
3.1.13 Estimaciones de correlaciones fenotípicas y genotípicas.....	29
3.1.14 Análisis Multivariado.....	31
3.2. Caracterización Molecular.....	32
3.2.1 Poblaciones Evaluadas.....	32

3.2.2 Material vegetativo y extracción de ADN.....	34
3.2.3 Cuantificación y Dilución de ADN.....	36
3.2.4 Amplificación del ADN.....	37
3.2.5 Preparado de vidrios, corrida, tinción y revelado.....	40
3.2.6 Análisis estadístico de los resultados.....	41
3.2.7 Cuantificación de la variabilidad genética.....	41
3.2.8 Análisis de la estructura genética de la población.....	43
3.2.9 Análisis Multivariado.....	45
3.2.10 Matriz Básica de Datos (MBD).....	45
3.2.11 Matriz de distancia genética	46
3.2.12 Análisis de Variancia (AMOVA).....	46
3.2.13 Análisis de Ordenamientos. Análisis de Coordenadas Principales.....	47
3.2.14 Análisis de Agrupamiento. Análisis de Cluster.....	47
3.2.15 Coeficiente de Correlación Cofenética.....	49
3.2.16 Test de Mantel.....	49
3.3 Análisis conjunto de la Caracterización Agronómica y la Caracterización Molecular.....	49
3.3.1 Análisis de Procrustes Generalizados.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1 Caracterización Agronómica	50
4.1.1 Caracteres Vegetativos.....	50
4.1.2 Caracteres Reproductivos.....	57
4.1.3 Estimación de los componentes de la variancia.....	62
4.1.3.1. Grado de determinación genética (GDG), coeficiente de variación genética (CVg) y coeficiente de variación fenotípica (CVf).....	62

4.1.4 Asociación entre caracteres.....	65
4.1.4.1 Correlaciones fenotípicas.....	65
4.1.5 Análisis Multivariado.....	67
4.2 Caracterización Molecular.....	81
4.2.1 Extracción y cuantificación de ADN.....	81
4.2.2 Amplificación del ADN.....	81
4.2.3 Productos Amplificados.....	82
4.2.4 Cuantificación de la variabilidad genética.....	82
4.2.5 Descripción de alelos.....	85
4.2.6 Análisis de la variancia (AMOVA).....	87
4.2.7 Análisis Multivariado.....	89
4.2.7.1 Análisis de Ordenamientos. Análisis de Coordenadas Principales.....	89
4.2.7.2 Análisis de Agrupamiento. Análisis de Cluster.....	89
4.2.7.3 Test de Mantel.....	90
4.3 Caracterización Agronómica y Molecular.....	98
4.3.1 Análisis de Procrustes Generalizado.....	98
5. DISCUSION.....	101
5.1 Caracterización Agronómica.....	101
5.1.1 Colecta de las Poblaciones.....	101
5.1.2 Variabilidad entre Poblaciones.....	102
5.1.3 Caracteres Vegetativos.....	103
5.1.4 Caracteres Reproductivos.....	108
5.1.5 Asociación entre Caracteres.....	111
5.1.6 Análisis Multivariado.....	113

5.2 Caracterización Molecular.....	114
5.2.1 Cuantificación de la variabilidad genética.....	114
5.2.2 Comportamiento de los SSR.....	117
5.2.3 Análisis de la variancia (AMOVA).....	118
5.2.4 Análisis Multivariado	119
5.3 Caracterización Agronómica y Molecular.....	120
6. CONCLUSIONES.....	122
7. BIBLIOGRAFÍA.....	124

1. INTRODUCCION

En los últimos años se ha producido en la Pampa Húmeda Argentina un aumento importante de la superficie ocupada por la agricultura, a expensas de la ocupada por la ganadería, relegando así la actividad ganadera hacia suelos de menor aptitud agrícola (SAGPyA, 2000). Esta situación ha promovido, por un lado, una intensificación en la explotación de los recursos forrajeros en ambientes agrícolas, y por otro, la necesidad de aumentar la receptividad en los ambientes marginales, con el consecuente riesgo de degradación y afectación de la persistencia productiva de las pasturas.

Entre las especies forrajeras de mayor valor productivo en Argentina, se destaca el raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.) también denominado raigrás criollo o raigrás italiano. Es una gramínea nativa de ambientes mediterráneos de Europa y África (Parodi, 1964), que en la última década ha integrado, bajo diferentes condiciones de manejo, tanto sistemas productivos intensivos (genotipos tetraploides), como sistemas extensivos (genotipos diploides) ganaderos (Cahuepé *et al*, 1985; Ansín *et al*, 2007; Fernández *et al*, 2008). Estas características conjuntamente con la buena aceptación de la especie por parte del ganado (Brizuela *et al*, 1983), el rápido establecimiento, la alta respuesta a la fertilización nitrogenada (Díaz-Zorita y Gonella, 1995) y la resistencia a pastoreos intensivos, son los atributos que han contribuido a su amplia difusión.

Existen numerosos estudios de la variabilidad genética realizado en germoplasma de la especie adaptado a distintos ambientes, que demuestran la factibilidad de realizar selección y desarrollar cultivares superiores (Breese y Tyler, 1986; De Battista *et al*, 2001; Giammaría, 2003; Andrés y Rosso, 2004; Andrés *et al*, 2005). Un estudio reciente (Fjellheim *et al*, 2007) ha

demostrado que poblaciones adaptadas a distintos ambientes pueden ser útiles para mejorar varios caracteres morfológicos en cultivares comerciales. Entre las metodologías más utilizadas para el estudio de la variabilidad genética en caracteres de interés productivo, se destaca la caracterización morfo-fisiológica, por ser de fácil aplicación, de bajo costo y uso directo en el mejoramiento de la especie. Sin embargo, en los últimos años, los avances obtenidos a través del uso de las nuevas herramientas biotecnológicas, han permitido complementar la información fenotípica y brindar interesantes alternativas a estos programas de mejoramiento genético, integrando así las técnicas moleculares (Köllicker *et al*, 1999; Diaz *et al*, 2004; Bolaric *et al*, 2005; Fjellheim y Rognli, 2005; Lübberstedt, 2005; King *et al*, 2005).

Entre las principales ventajas del uso de los marcadores moleculares, se destacan la precisión de detección de la variabilidad a nivel de ADN, que están ampliamente distribuidos en el genoma, no están afectados por el ambiente y se pueden detectar en cualquier estado de desarrollo de la planta (Forster *et al*, 2001; Schlatter *et al*, 2002). Estos marcadores cuando están ligados a caracteres de interés agronómicos también se utilizan para facilitar la incorporación de genes, y la identificación o caracterización varietal en poblaciones (Schlatter *et al*, 2002; Muylle *et al*, 2005).

En los últimos años, muchos marcadores moleculares entre ellos RAPD (fragmentos de ADN amplificados al azar), AFLP (fragmentos amplificados en su longitud), RFLP (fragmentos de restricción polimórficos en su longitud) y SSR (secuencia simple repetitiva) han sido desarrollados y utilizados para *Lolium perenne* (Bert *et al*, 1999; Forster *et al*, 2001; Armstead *et al*, 2002), siendo SSR altamente conservado tanto en animales como en plantas (Biessmann y Manson, 1994). Sin embargo existen escasos estudios realizados en marcadores moleculares en *Lolium multiflorum* (Inoue *et al*, 2004; Hirata *et al*, 2006).

El impacto que el uso de los marcadores moleculares puede tener complementando la información fenotípica de poblaciones naturalizadas, permitirá brindar alternativas superadoras en los programas de mejoramiento genético de la especie (Loss, 1994; Forster *et al*, 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1 Taxonomía, distribución geográfica y descripción botánica de la especie

El género *Lolium spp.* está ampliamente distribuido en áreas templadas y pertenece al Orden Poales, Familia Poáceas, Tribu Festucoideas (Jahuar, 1993; Aramendía, 2005). Las plantas del género *Lolium spp.* se caracterizan por la forma de su espiga debido a que las espiguillas están dispuestas de forma alterna a lo largo del raquis. Todas las espiguillas excepto la terminal, tienen una única gluma, la espiguilla tiene de 2 a 22 flores. Las glumas son membranosas y tiene de 3 a 9 nervios (Stace y Cotton, 1980). Este género esta formado por ocho especies (Terrell, 1968) nativas de Europa, norte de África y Asia occidental, que se han distribuido en áreas templadas de todo el planeta: *L. perenne* L., *L. multiflorum* Lam., *L. rigidum* Gaud., *L. remotum* Schrank, *L. temulentum* L., *L. persicum* Boiss. & Hoh., *L. subulatum* Vis., *L. canariense* Steud. Las especies agronómicamente importantes y ampliamente utilizadas como recursos forrajeros son *L. perenne* L. y *Lolium multiflorum* Lam., las demás especies son consideradas malezas.

Lolium multiflorum Lam., se diferencia de *L. perenne* L. y *L. temulentum* L. en el elevado número de flores en cada espiguilla y además esta es aristada. *L. multiflorum* Lam. es una especie que esta representada por dos formas botánicas, una anual *L. multiflorum* subsp. *multiflorum*, syn: *L. multiflorum* subsp. *westerwoldicum*, y otra bienal *L. multiflorum* Lam. subsp. *Italicum* (Terrell, 1968). Se caracteriza por poseer un follaje de color verde intenso, brillante en la cara inferior, glabro de vainas cerradas, las láminas opacas y ásperas en la cara superior y brillantes y suaves en la cara inferior, con una marcada nervadura central que permite distinguirla fácilmente de otras gramíneas (Parodi, 1964). Posee un sistema radicular denso y altamente ramificado. Además tiene

una inflorescencia terminal solitaria de 10 a 40 cm de largo con 5 a 38 espiguillas alternadas y unidas al raquis en forma plana (Hannaway *et al*, 1999).

2.2 Aspectos genéticos de la especie

El raigrás anual es diploide ($2n=2x=14$) y tiene un sistema reproductivo principalmente alogámico, debido a la presencia de un sistema de autoincompatibilidad conformado por dos loci multialélicos (Cornish *et al*, 1979). En la actualidad existen numerosos cultivares diploides ($2n$) y tetraploides ($4n$) seleccionados para diferentes usos en los sistemas de producción animal. En general, los cultivares tetraploides han sido inducidos por tratamiento de semillas o meristemas con químicos tales como la colchicina, que impiden la formación del huso acromático y permiten la obtención de gametos no reducidos, con $2n$ cromosomas. Otra forma de obtención de tetraploides ha sido vía sexual (Lamote *et al*, 2002) mediante el cruzamiento interploide de $2x$ por $4x$, aunque poco efectiva. Los cultivares tetraploides han sido seleccionados para incrementar la producción de materia seca total, en particular en el período otoño-invernal, pero han demostrado menor persistencia respecto de los cultivares diploides.

Las formas diploides se adaptan a una mayor diversidad de suelos y niveles de fertilidad que las tetraploides. Así, las poblaciones diploides se han naturalizado en los pastizales de la región templada húmeda y subhúmeda de Argentina, Uruguay, Chile y Sur de Brasil, siendo una de las especies más valiosas en los sistemas “promocionados” ganaderos y una opción de valor por su aporte de forraje en cantidad y calidad durante el período otoño-inverno-primaveral.

Existen distintas variantes de raigrases promocionados. Por ejemplo, cuando la frecuencia de raigrás anual es baja en la comunidad vegetal existente, se realizan por 1-2 años siembras directas, permitiendo en cada ciclo que ocurra una semillazón parcial, de manera de lograr formar un banco de semillas en el suelo. Una vez alcanzado este objetivo, el raigrás se mantiene por resiembra natural. En estas situaciones de resiembra natural, existiría una ventaja de los raigrases diploides ($2n$) sobre los tetraploides ($4n$), por presentar semillas más pequeñas y mayor prolificidad, características probablemente seleccionadas naturalmente en las poblaciones naturalizadas.

Debido a sus características de alogamia y alta compatibilidad con otras especies, se lo ha utilizado como fuente de germoplasma para la obtención tanto de híbridos interespecíficos como de híbridos intergenéricos, en particular con el género *Festuca spp*, conformando el complejo denominado *Lolium/Festuca*. Existen estudios que indican que ambos géneros han divergido de un antecesor común y tienen el mismo número básico ($x=7$) (Malik y Thomas, 1966), lo que le otorga la facilidad de hibridización entre sus especies y exhibir recombinación meiótica (Thomas *et al*, 1994). En términos generales, ambos géneros proveen una valuable combinación de caracteres agronómicos (Thomas y Humphreys, 1991) dados por la buena calidad de forraje de *Lolium* con la alta tolerancia al estrés de *Festuca*. En cuanto a los híbridos interespecíficos, se destaca *L. hybridum* (*L. multiflorum* x *L. perenne*) por poseer muy buenas características agronómicas combinando el buen establecimiento, la producción foliar, palatabilidad y crecimiento invernal de *L. multiflorum* y la persistencia y capacidad macolladora de *L. perenne* (Humphreys y Hides, 1997; Thom *et al*, 1998).

2.3 Aspectos agronómicos y productivos de la especie

En general el raigrás anual es una especie de crecimiento otoño-invierno-primaveral, con una gran concentración de su producción de forraje a la salida de invierno y primavera. Tiene su máxima tasa de crecimiento entre los 20 y 25°C, y en condiciones de humedad adecuadas (750 mm anuales). Se ha comprobado que para expresar su máximo potencial requiere de suelos fértiles, profundos, con buen nivel de materia orgánica (3-5%) y textura de franca a franco-arcillosa, con un pH cercano a la neutralidad (Mazzanti *et al*, 1992; Hannaway *et al*, 1999). Presenta una alta respuesta a la fertilización nitrogenada, en particular cuando ésta se realiza a la salida del invierno, debido a la baja provisión de nitratos en el suelo (Vásquez y Barberis, 1982; Wightman *et al*, 1997; Castaño, 2005).

Existen antecedentes que indican que de acuerdo al tipo y a la intensidad de defoliación se afecta la calidad del forraje (Donaghy y Fulkerson, 1997), la productividad (Donaghy *et al*, 1997) y la persistencia (Donaghy y Fulkerson, 1996). Soporta defoliaciones más intensas que otras gramíneas anuales (Hannaway *et al*, 1999) y sembrado hacia fin del verano, puede ser sometido a pastoreos con alta carga animal y corto período de utilización en otoño-invierno (Marino *et al*, 1995; Gutiérrez y Rossi, 1997). Existen trabajos que demuestran que el período mínimo de recuperación para la acumulación de carbohidratos, antes del próximo aprovechamiento, es vital tanto para la persistencia como para el rebrote de la pastura (Hannaway *et al*, 1999; Callow *et al*, 2005). Adicionalmente se ha demostrado (Andrés y Bertín, 1999; Wilkins y Humphreys, 2003) que la especie posee mayor palatabilidad y digestibilidad del forraje producido, comparativamente con otros verdeos de invierno (avena, cebada, centeno, triticale), lo que permite introducirla en los planteos intensivos de producción de leche y de carne, donde se prioriza la calidad sobre la cantidad

de forraje. Sin embargo no está adaptada a regiones con altas condiciones de estrés (frío o sequía), donde otras especies se adaptan mejor (Balasko *et al*, 1995; Wang *et al*, 2001).

2.4 Aspectos sanitarios de la especie

Las restricciones que puede sufrir un cultivar de raigrás anual en el uso, debido a la susceptibilidad a enfermedades foliares, pueden traducirse en limitantes al rendimiento, a la calidad del forraje, al consumo animal, al manejo, y a las características de la pastura. Existen evidencias acumuladas a través de los años que indican claramente que las enfermedades limitan los rendimientos potenciales. Los rangos de respuesta han variado ampliamente acorde con la enfermedad considerada, el momento del año y el manejo de la pastura.

En el caso de las royas, particularmente la de la corona (*Puccinia coronata*), se ha demostrado una importante disminución del rendimiento de la materia verde de raigrás anual, que incluye material muerto, más que del rendimiento total de materia seca (Lancashire y Latch, 1966). Respecto a la calidad del forraje, se ha comprobado que un ataque del 20% de roya de la corona sobre el cultivar de raigrás anual S24 provocó una reducción de 3,4 unidades en los carbohidratos solubles durante el otoño (Thomas, 1997). Este y otros estudios han confirmado que moderados niveles de infección pueden provocar pérdidas importantes en términos de producción de leche y/o carne (Walters, 1984). En ensayos de pastoreo se ha evidenciado disminución en el consumo debido al rechazo por parte de los animales del forraje enfermo (Thomas, 1997). Las causas del rechazo no se conocen exactamente, pero se infiere que el forraje enfermo es menos palatable debido a la baja calidad y a la presencia de material muerto. Si bien la roya anaranjada (*Puccinia recondita*) y la roya del tallo (*Puccinia graminis*) son enfermedades que ocurren más esporádicas, en los últimos años se ha demostrado que han

comenzado a desarrollar formas más severas de ataque en primaveras muy secas y calurosas, y en particular cuando no se realizan defoliaciones del cultivo al inicio de la estación de crecimiento.

2.5 Variabilidad genética en especies forrajeras

A través de diversos estudios realizados en una gran cantidad de especies vegetales se ha comprobado la existencia de una importante variabilidad genética (Turesson, 1922; Clausen *et al*, 1940, 1948; Bradshaw, 1971). La variabilidad genética puede detectarse a niveles inter-específico e intra-específico (Bradshaw, 1984; Briggs y Walters, 1984). La variabilidad intra-específica puede manifestarse entre poblaciones y entre individuos dentro de la misma población (Barret y Khon, 1991; Young *et al*, 1996; Reed, 2005). Estos niveles de variación son generalmente afectados por factores ecológicos y geográficos donde se distribuye la especie (Van Valen, 1965; Soulé, 1973; Tilman y Downing, 1994), además del sistema reproductivo (Wright, 1951) y la longevidad de la planta (Hamrick, 1979). Todos estos son factores que dependiendo de la escala en la que ocurren, determinan la magnitud de variación intra e inter-poblacional (Van Valen, 1965; Snaydon, 1984; Jain, 1975; Loveless y Hamrick, 1984). Los niveles detectables de variabilidad genética varían en forma considerable desde casi nula como en *Thypa*, a niveles relativamente altos, como en *Stephanomera exigua* spp *Caroifera* (Schaal y Smith, 1980).

El sistema reproductivo de una especie puede tener efecto directo sobre la diversidad genética presente en una población. En especies autógamas, el flujo génico es restringido, por lo tanto se esperaría una variabilidad génica mayor entre poblaciones que dentro de poblaciones (Snaydon, 1978). Por el contrario en una especie alógama la variabilidad sería mayor entre individuos de la misma población que entre poblaciones (Andrés, 1987). Sin embargo no siempre

responde a este patrón esperado (Brown y Jain, 1979). Sería el sistema reproductivo como el flujo génico, la selección y una complejidad de factores ambientales que determinan los niveles de variabilidad genética presente en las poblaciones (Schemeske, 1984). Las forrajeras templadas más importantes como el raigrás anual responden todas a polinización abierta consecuentemente tanto poblaciones naturalizadas como sintéticas tienden a ser genéticamente heterogéneas (Forster *et al*, 2001, Takahashi *et al*, 2004).

En nuestro país se han realizado diversos estudios de variabilidad genética en forrajeras nativas. En *Bromus auleticus* Traverso y von der Phalen (1982) encontraron suficiente variabilidad genética entre y dentro de poblaciones en la mayoría de los caracteres analizados. En la evaluación del grado y distribución de la variabilidad en poblaciones naturales de *Agropirum scabrifolium* (Doell) Parodi, se detectó variabilidad genética entre poblaciones (Andrés, 1987); la distribución espacial de esta variabilidad genética estuvo correlacionada con la gran red hidrogeográfica. También en poblaciones naturales de *Bothriochloa laguroides* provenientes de la Depresión del Salado, provincia de Buenos Aires, se detectaron diferencias principalmente en respuesta al efecto del pastoreo y de la competencia intra e inter-específica. Estos resultados indicaron que la variación genética encontrada resultó un mecanismo de la especie para responder a variaciones ambientales ocurridas en las pasturas, a pequeña y mediana escala (Andrés y Cordero, 1995). Ceroni (1993) evaluó la variabilidad genética dentro del cultivar de *Festuca arundinacea* “El Palenque MAG”, determinando la existencia de una amplia variación en muchos caracteres evaluados. En *Trifolium repens*, Pagano (1993) estudió la variabilidad del cultivar “El Lucero MAG” y determinó una amplia variabilidad genética en todos los caracteres cualitativos y cuantitativos considerados. También en poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* (Alonso, 1991) se encontró variabilidad genética. Barufaldi, (1999) evaluó poblaciones naturalizadas de *Dactylis glomerata*

provenientes de la provincia de Buenos Aires, y detectó diferencias entre y dentro de las mismas. Los caracteres reproductivos fueron los que presentaron la mayor variación genética en todas las poblaciones estudiadas. Ruiz Díaz (2000), evaluó poblaciones de *Dactylis glomerata* del banco de germoplasma de la EEA INTA Pergamino, y determinó la existencia de variabilidad genética intra e inter-poblacional para caracteres reproductivos, vegetativos y fitosanitarios. Todos estos trabajos demostraron existencia de variabilidad genética, en respuesta a las presiones de selección impuesta por cambios temporales y/o espaciales ocurrida en los ambientes de recolección o condiciones de utilización.

2.6 Marcadores morfológicos y moleculares

Hasta la década del 60, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual; los cuales contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Sin embargo pocos caracteres fenotípicos en los cultivos forrajeros se lograron caracterizar genéticamente y tampoco hubo alguna vinculación genética en estudios realizados al respecto (Barker y Warnke, 2001). En la actualidad, muchos de estos marcadores morfológicos tales como forma, color, tamaño y altura, entre algunos de ellos, se convirtieron en importantes descriptores al momento de realizar inscripciones de cultivares (Picca *et al*, 2004).

Por otra parte, en los últimos años la contribución de los marcadores moleculares al mejoramiento genético de especies forrajeras ha tomado mayor relevancia. La mayoría de los estudios en especies forrajeras han utilizado RFLP y RAPD, y se han concentrado en perfiles de

ADN en lugar del mapa genético básico de desarrollo y de detección gen/QTL. El desarrollo de marcadores con alta eficiencia tales como AFLP y SSR permiten una rápida construcción de mapas y análisis de caracteres específicos (Forster *et al*, 2001).

En el presente estudio se optó por los *loci* microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR-*Simple Sequence Repeats*-). Los SSR (Forster *et al*, 2001; Wang *et al*, 2001) están compuestos por repeticiones en tándem de dos a seis pares de bases flanqueadas por regiones conservadas no repetitivas, de copia única y suelen estar ubicados en regiones no codificantes. Estas secuencias son abundantes y de amplia distribución en el genoma de todo tipo de organismo, son altamente polimórficos por ser de naturaleza multialélica, somáticamente estables y altamente reproducibles (Weising, 1991). Son marcadores codominantes se puede detectar los genotipos homocigotos que presentaran un único producto de amplificación, de los genotipos heterocigotos que presentaran dos fragmentos distintos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Por estas características los SSR son marcadores particularmente aptos para realizar la evaluación y comparación de la variación genética dentro y entre especies cercanas (Morgante y Olivieri, 1993, Powell *et al*, 1996; Studer *et al*, 2006). Entre sus limitaciones tenemos que no hay información disponible para muchas especies y a su vez requiere mucho trabajo para su desarrollo (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Becerra y Paredes, 2000)

Diferentes estudios evaluaron la diversidad genética en cultivares de raigrás anual y las poblaciones mediante diferentes marcadores moleculares, AFLP (Guthridge *et al*, 2001; Calsyn *et al*, 2003) y RAPD (Castro *et al*, 2003; Bolaric *et al*, 2005). Jones *et al*, (2001) optimizaron los métodos de evaluación y aislaron un gran número de SSR en *Lolium perenne* L, pero actualmente hay solamente diez secuencias de primer que son públicas. Por otro lado Hirata *et al*, (2006)

desarrollaron SSR para raigrás anual, al igual que otros institutos han desarrollado SSR en *Lolium* y la secuencia de estos primers es de dominio público (Inoue y Cai, 2004; Warnke *et al*, 2004; Studer *et al*, 2006)

HIPOTESIS

Existe una amplia variabilidad genética en caracteres morfo-fisiológicos y a nivel molecular entre y dentro de poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam. provenientes de diversos ambientes de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Córdoba.

OBJETIVOS

- Recolección de germoplasma de poblaciones de *Lolium multiflorum* diploide provenientes de distintas condiciones ambientales de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Córdoba.
- Ajuste de la técnica de marcadores moleculares en las poblaciones de *Lolium multiflorum*
- Evaluación de la variabilidad genética inter-poblacional e intra-poblacional en caracteres morfo-fisiológicos y moleculares de las poblaciones.
- Determinación de parámetros genéticos en caracteres cuantitativos y cualitativos (varianza genética, varianza ambiental, varianza fenotípica, heredabilidad en sentido amplio).
- Determinación de correlaciones fenotípicas entre los caracteres morfo-fisiológicos.
- Selección de las poblaciones y de genotipos para ser incorporados al programa de selección de *Lolium multiflorum* Lam. diploide.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Caracterización Agronómica

3.1.1 Las poblaciones evaluadas: su recolección

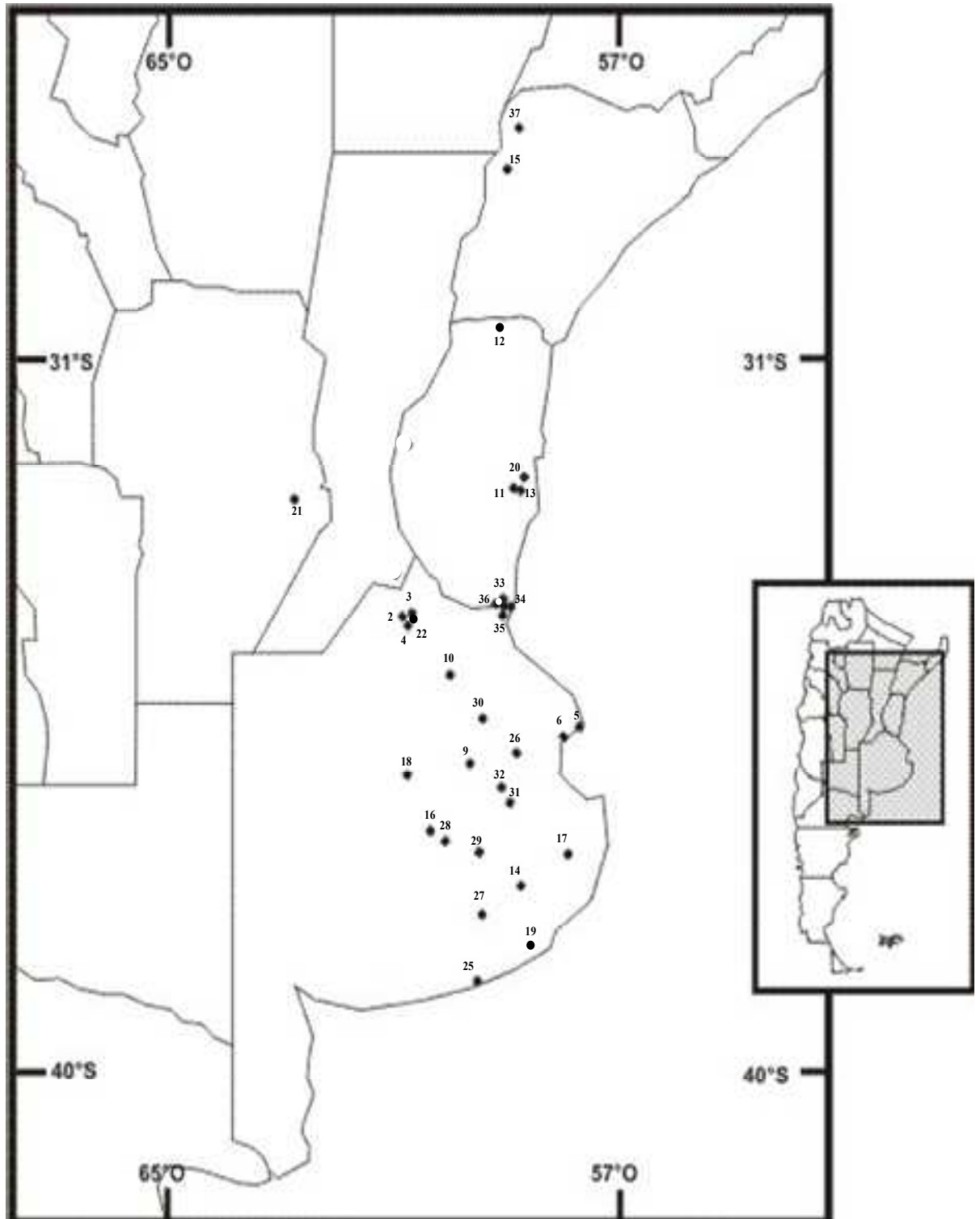
Se evaluaron 32 poblaciones de la colección de *Lolium multiflorum* Lam. del Banco de Germoplasma de la EEA INTA Pergamino. La mayoría de las poblaciones correspondieron a colectas de semillas realizadas entre los años 1999 y 2004 en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Córdoba de Argentina (Cuadro 1, Gráfico 1), con excepción de dos provenientes del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA). De acuerdo a Bennett (1970) y a Bradshaw (1971) el modelo de diferenciación genética dentro de una misma especie está fuertemente correlacionado con la heterogeneidad ambiental, por lo tanto en especies en las que no existe información confiable de la distribución de la variación en la naturaleza, las recolecciones deben representar un amplio rango de ambientes. Adicionalmente en el caso de una especie anual alógama, los sitios a muestrear deben estar distribuidos en forma aleatoria dentro de las regiones consideradas de interés para el objetivo del estudio. En la presente investigación, las colectas de raigrás anual fueron organizadas con la finalidad de obtener una muestra representativa de la especie adaptada a los diversos ambientes ganaderos, tales como potreros con pasturas viejas sometidas a pastoreo, pasturas nuevas sin perturbar, montes bajos y en algunas banquinas de rutas y/o caminos internos. La estrategia de colecta en este tipo de especies es predominantemente en bulk, permitiendo maximizar la alta dispersión que ocurre entre genotipos más o menos cercanos (Marshall y Brown, 1983), y de esta forma determinar los límites poblacionales. Respetando dicho concepto, el aislamiento entre las poblaciones recolectadas de raigrás anual fue mayor a 50 Km., y

la cosecha dentro de cada sitio se realizó atravesando transectas que abarcaron la zona de mayor predominio de la especie y respetando una distancia mínima de 3 m entre plantas para evitar coleccionar el mismo individuo. En cuanto al número de plantas a cosechar en cada sitio (ambiente) se consideró el criterio establecido por Hamrick y Allard (1972) y se cosecharon espigas de al menos 100 plantas/población como número mínimo de genotipos que representen la variabilidad presente en cada ambiente. Complementariamente, en cada sitio además se realizó una descripción de la zona de colecta (Cuadro 1).

Cuadro 1: Origen e identificación de las poblaciones evaluadas por caracteres morfofisiológicos

N° de Población	Origen/Identificación	Descripción
2	Buenos Aires/Laguna Escuela	Margen de la laguna perteneciente a la Escuela Agrotécnica, Pergamino
3	Buenos Aires/Campo Escuela	Campo bajo perteneciente a la Escuela Agrotécnica, Pergamino
4	Buenos Aires/ Gral. Gelly	Cañadón en campo bajo, sobre el arroyo de Pergamino, clausurado al pastoreo. Gral. Gelly
5	Buenos Aires/Pipinas I	Cruce de ruta 11 y ruta 36, sobre el margen derecho del camino de campo ganadero. Pipinas
6	Buenos Aires/Pipinas II	Margen de la ruta 11 entre Pipinas y Verónica
9	Buenos Aires/El Amparo	Ruta 30, sobre el margen del Arroyo Chapaleufu, Rauch
10	Buenos Aires/Concepción I	Ruta 41, sobre camino interno de campo ganadero. Mercedes
11	Entre Ríos/Concepción I	Potrero 50. Campo Experimental INTA EEA. Concepción del Uruguay.
12	Entre Ríos/Concepción II	Recolectado de banquina Ruta 127. Feliciano, Entre Ríos.
13	Entre Ríos/Concepción III	Sobre Margen del arroyo La China. Concepción del Uruguay
14	Buenos Aires, Bco. Germoplasma EEA INTA Pergamino/ ARLM 004	Balcarce
15	Corrientes, Bco Germoplasma EEA INTA Pergamino/ ARLM 0016	Corrientes
16	Buenos Aires, Bco Germoplasma EEA INTA Pergamino/ ARLM 0021	Ruta 63-Tandil
17	Buenos Aires/ ARLM 0022	Coronel Vidal
18	Buenos Aires/ ARLM 0023	Est. Lazzarino-Azul
19	Buenos Aires, Bco Germoplasma EEA INTA Pergamino/ ARLM 0024	Ing. Otamendi
20	Entre Ríos, Bco Germoplasma EEA INTA Pergamino/ ARLM 0025	EEA INTA Concepción del Uruguay
21	Córdoba, Bco Germoplasma EEA INTA Pergamino/ ARLM 0026	Marco Juárez
22	Buenos Aires, Bco Germoplasma EEA INTA Pergamino/ ARLM 0027	El Resero MAG
25	Buenos Aires	Ruta 88, en banquina de camino anexo a un campo sembrado con girasol a 25Km de Quequén
26	Buenos Aires	Ruta 29, en banquina de camino de tierra en la entrada a Gral. Belgrano
27	Buenos Aires	Establecimiento La Rosa, en banquina de camino de tierra anexo a un campo ganadero, Lobería
28	Buenos Aires	Ruta 226, en banquina de camino de tierra, lateral a un campo sembrado de trigo. Arroyo Chapaleufu, Tandil
29	Buenos Aires	Ruta 226, en banquina a 16km de Fulton
30	Buenos Aires	Ruta 29, en banquina de camino de tierra. Lobos
31	Buenos Aires	Ruta 29, en banquina de camino de tierra lateral a un campo ganadero. Ayacucho
32	Buenos Aires	Ruta 29, en banquina de camino de tierra lateral a un campo ganadero, Ayacucho
33	Buenos Aires/Delta 1	En borde de camino interno correspondiente al campo de la EEA INTA Delta
34	Buenos Aires/Delta 2	En plantación de sauces de 4 años, EEA INTA Delta
35	Buenos Aires/Delta 3	En plantación de álamos de 4 años, EEA INTA Delta
36	Buenos Aires/Delta 4	En pastizal natural dentro de la EEA INTA Delta
37	Corrientes	En pastizal natural, dentro de la EEA INTA Corrientes

Gráfico 1: Mapa de las áreas donde se realizaron las colectas de las 32 poblaciones naturalizadas de raigrás anual diploide



3.1.2 Las poblaciones evaluadas: su acondicionamiento en invernáculo

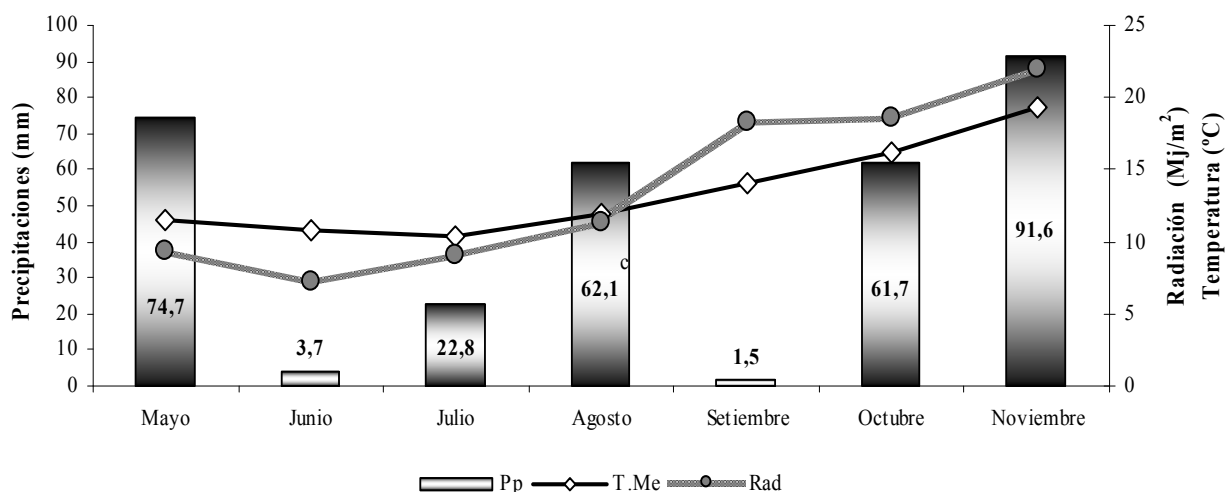
Todas las poblaciones fueron identificadas con los registros de sus lugares de origen, trasladadas a la EEA Pergamino, trilladas en forma individual, acondicionadas en laboratorio y conservadas en el Banco de Germoplasma. El 10 de abril de 2004 se sembraron 100 semillas por población en macetas (1 semilla/maceta) conteniendo una proporción de 3 partes de tierra y 1 parte de arena, para permitir el correcto drenaje posterior al riego. Las macetas se mantuvieron en un invernáculo sin calefacción de EEA Pergamino y se facilitó el crecimiento de cada planta (genotipo) hasta lograr el desarrollo de al menos 4 macollos. El objetivo fue lograr el establecimiento efectivo de todas las poblaciones. Durante la etapa de invernáculo se registró la presencia/ausencia de antocianinas en la base del macollo principal y el vigor de crecimiento inicial de cada planta.

3.1.3 Las poblaciones evaluadas: su transplante a campo experimental

El 14 de Mayo de 2004 se transplantaron las 32 poblaciones de raigrás anual al campo experimental de la EEA Pergamino, ubicado a 33° 56 de latitud y 60° 43 de longitud cuyo suelo fue un argiudol típico con fase levemente erosionada. Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA), con 3 repeticiones. Cada población estuvo representada por 90 plantas dispuestas en 2 hileras de 45 plantas cada una y distanciadas a 0,40 m entre plantas y 0,40 m entre hileras. El distanciamiento entre plantas respondió a la “Técnica de cultivos experimentales en ambiente homogéneo” dispuesta por Turesson (1922) que permite eliminar los efectos del ambiente sobre cada planta individual, y estimar con mayor precisión la expresión genética de cada carácter. Del total de 90 plantas/población, se utilizaron 45 plantas (15 plantas por repetición) para realizar las mediciones correspondientes a los caracteres vegetativos y las otras 45 plantas (15 plantas por

repetición) se destinaron a las mediciones correspondientes a los caracteres reproductivos. Durante todo el período de evaluación a campo, el ensayo se mantuvo controlado de malezas, se fertilizó en otoño con una dosis de 75 Kg/ha de nitrógeno (150Kg/ha de urea) y se regó a fin de lograr la implantación del mismo. Los datos meteorológicos desde el transplante hasta la cosecha correspondiente a ese año se observan en el gráfico 2.

Gráfico 2: Precipitaciones en mm (Pp), temperatura media en °C (TMe), radiación global incidente en Mj/m² (Rad), correspondiente a los meses transcurridos desde el transplante hasta la cosecha.



3.1.4 Los caracteres evaluados

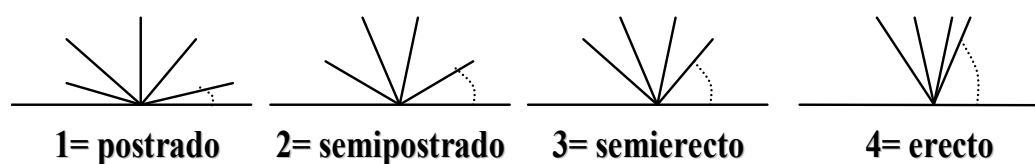
Los objetivos primarios de la mayoría de los programas de mejoramiento de especies forrajeras han sido el incremento de la producción de forraje y de la persistencia. Recientemente han tomado mayor importancia la calidad y la resistencia a factores bióticos y abióticos. En el caso de raigrás anual interesan desde el punto de vista morfo-fisiológico caracteres asociados a la producción de materia seca (índice de cosecha de la parte aérea), a la producción de semillas y al comportamiento frente a la roya de la corona (*Puccinia coronata*). Por tales motivos los caracteres

que se enumeran a continuación fueron los considerados de mayor importancia en esta primera etapa del estudio de la variabilidad genética.

3.1.5 Los caracteres vegetativos

Se consideraron caracteres vegetativos aquellos comprendidos desde el transplante a campo (14/05) hasta el momento del pasaje de estado vegetativo a reproductivo (inicio de elongación). Este período fue de 103 días, las mediciones se realizaron en 45 plantas por población (15 plantas por repetición) a excepción del número de macollos y altura de planta previo al segundo corte que se realizaron en 6 plantas por población. Durante el período mencionado se midieron los siguientes 10 caracteres:

1. **Hábito de crecimiento:** a los 103 días (24/08) desde el transplante se realizó la medición del hábito de crecimiento, definido como el ángulo que formaba el canopeo de cada planta y la superficie del suelo, utilizando la siguiente escala: 1=postrado; 2=semipostrado; 3=semierecto; 4=erecto



2. **Vigor de planta:** a los 103 días (24/08) desde el transplante se registró en forma visual el vigor de crecimiento invernal por planta, como medida de la productividad de forraje, utilizando la siguiente escala: 1=regular; 2=bueno; 3=muy bueno.

3. **Ancho de hoja:** a los 103 días (24/08) desde el transplante se registró mediante escala visual el ancho de hoja promedio característico de cada planta. Para ello se realizó un recorrido previo del ensayo observando la totalidad de genotipos, determinando así un ranking con 3 niveles de ancho de hoja: 1=angosta; 2=intermedia; 3=ancha.
4. **Número de macollos vegetativos:** a los 88 días (09/08) desde el transplante se realizó el conteo del número de macollos producido por cada planta.
5. **Altura de planta previo al segundo corte:** a los 124 días (14/09) desde el transplante se realizó la medición de la altura de planta, en cm utilizando una regla graduada apoyada en el centro de cada mata hasta el extremo superior.
6. **Peso de la materia seca del primer corte:** a los 103 días (24/08) desde el transplante se realizó la cosecha de forraje fresco de cada planta individual. El mismo se efectuó con hoz a una altura de corte de 6 cm (altura de puño) desde el nivel del suelo. Cada planta fue identificada y conservada en bolsas de polietileno, para evitar pérdida de humedad, trasladada a gabinete, y pesada en balanza Veltrox Modelo 1502 (Máx 3000g, d=0,5g). Cuando el peso fresco por planta fue superior a 250g se muestreo de cada planta 250g. Luego se colocó en bolsas de papel tipo kraft y se secó en estufa de aire forzado por un período de 48 hs, hasta lograr un peso seco constante. Posterior al mismo se pesó en balanza (ídem peso fresco) y se registró el peso de la materia seca referido al peso fresco total obteniendo el peso seco en gramos del primer corte. En aquellas plantas que se muestrearon a 250g se realizó la corrección llevando el valor de peso seco (mediante regla de tres simple) al peso fresco correspondiente.

7. **Peso de la materia seca del segundo corte:** a los 124 días (14/09) desde el transplante se realizó la cosecha de forraje fresco de cada planta individual y se consideró el segundo corte. El procedimiento utilizado fue igual al anterior y se registró el peso de la materia seca del segundo corte en gramos.
8. **Peso de la materia seca del tercer corte:** a los 165 (25/10) días desde el transplante se realizó la cosecha de forraje fresco de cada planta individual y se consideró el tercer corte. El procedimiento utilizado fue igual a los anteriores y se registró el peso de la materia seca del tercer corte en gramos.
9. **Peso de materia seca total:** correspondió a la suma de la materia seca en gramos de los tres cortes realizados.
10. **Porcentaje de plantas afectadas por roya (*Puccinia spp*):** las mediciones se realizaron desde el momento en que se observó la presencia de al menos una planta por población afectada por roya (*Puccinia spp*). En total se efectuaron tres mediciones la primera el 14/10, la segunda el 26/10, la tercera y última el 08/11 realizando conteo directo de plantas infectadas por roya (*Puccinia spp*) en los tres bloques, obteniendo el promedio por población de plantas afectadas.

3.1.6 Los caracteres reproductivos

Se consideraron caracteres reproductivos aquellos comprendidos desde el momento del pasaje de estado vegetativo al reproductivo (inicio de elongación) hasta la cosecha de semillas. Este

período fue de 90 días, las mediciones se realizaron en 36 plantas por población (12 plantas por repetición, debido a la pérdida de plantas por mortandad) y durante el mismo se midieron 5 caracteres.

1. **Fecha de floración:** se consideró fecha de floración cuando el 50% del total de macollos de cada planta emitió espigas. La variable se registró como el número de días transcurridos desde el transplante (14/05) hasta dicho momento fenológico.
2. **Número de macollos reproductivos:** a los 193 días desde el transplante (22/11) se realizó la cosecha de espigas de cada planta individual mediante hoz. Cada planta fue puesta en bolsas de papel tipo kraft, trasladadas al gabinete y puestas a secar a temperatura ambiente. Cuando todas las plantas lograron una humedad inferior al 14% y previo a la trilla individual, se realizó el conteo directo del número de macollos reproductivos (número de espigas) por planta.
3. **Largo de espiga:** previo a la trilla individual, de cada planta se tomaron al azar tres espigas y mediante una regla graduada, se midió el largo desde la primera espiguilla hasta el extremo de la espiga en cm.
4. **Peso total de semillas:** se realizó la trilla de las espigas de cada planta con una trilladora de cilindro dentado marca Allan Machine C.O. Modelo SVSRGI. Las espigas de cada planta trillada fue sometida a limpieza manual a través de las siguientes zarandas: 1/20" x 1/2" y luego 1/24"x1/2", quitando así el material inerte (glumas, restos de raquis, etc) y las semillas vanas (vacías). Las semillas obtenidas de cada planta fueron pesadas en balanza de precisión

Chyo Modelo MJ-300 (Máx=300g, d=0,001g) obteniendo así el rendimiento de semilla de cada planta en gramos.

5. **Peso de mil semillas:** del total de semillas producido por cada planta se tomaron al azar tres muestras de 100 semillas puras, las que fueron pesadas en balanza de precisión Chyo Modelo MJ-300 (Máx=300g, d=0,001g). Se calculó el promedio de los 3 pesos de 100 semillas y el valor fue multiplicado por 10, a partir de allí se obtuvo el peso de 1000 semillas de cada planta en gramos.

3.1.7 Análisis de la información

Todos los datos obtenidos en la etapa de evaluación de caracteres morfo-fisiológicos fueron sometidos a distintos tipos de análisis estadístico. En primera instancia se realizaron los análisis correspondientes para comprobar los supuestos de normalidad, una vez realizadas las transformaciones en aquellos casos que lo requirió, se procedió a realizar el análisis de variancia y sus componentes y por último se realizaron los análisis multivariados necesarios.

3.1.8 Prueba de distribución normal y transformación de variables

Para determinar la distribución que presentaban las variables se utilizó el procedimiento *Univariate* del paquete estadístico SAS/V8, realizándose para todas las variables la prueba de homogeneidad de variancias a través de la prueba de Bartlett, la prueba de no aditividad de Tukey, el test de normalidad de los residuales a través del test estadístico W de Shapiro-Wilk y para cada variable se determinó la forma de la distribución a través de la Kurtosis y Skewness. Cuando las

variables analizadas no cumplieron con alguno de los supuestos de la normalidad se procedió a realizar la transformación adecuada para el tipo de variable (cuadro 2).

Cuadro 2: Transformación de variables

Variable	Transformación
Hábito de crecimiento	$\sqrt{x}$
Peso materia seca primer corte	$\text{Log}_{10}(x+10)$
Peso materia seca segundo corte	$\text{Log}_{10}(x+10)$
Peso materia seca tercer corte	$\text{Log}_{10}(x+10)$

3.1.9 Análisis de la Variancia

Se realizó el análisis de la variancia mediante el procedimiento *glm* del paquete estadístico SAS/V8, este método permite comparar el comportamiento promedio de las poblaciones para los diferentes caracteres, y se basa en la partición de la variación observada, descomponiéndola en fuentes de variación independientes.

3.1.10 Análisis de variancia entre poblaciones

Con el fin de analizar la significancia de las variancias de los diferentes caracteres entre poblaciones se realizaron análisis interpopulacionales para cada carácter.

Se utilizó un modelo de bloques completamente aleatorizado:

$$Y_{ij} = m + a_i + b_j + e_{ij}$$

donde: m es la media general, a_i representa el componente de variancia debido a poblaciones, b_j es el componente de variancia debido a bloques y e_{ij} es el componente de variancia debida al error experimental.

Cuadro 3: Fuentes de variación, grados de libertad (GL) y esperanza de los cuadrados medios ($E(CM)$), para cada componente de variancia en el análisis entre poblaciones

Fuente de Variación	GL	$E(CM)$
Repeticiones	$r - 1$	
Entre Poblaciones	$p - 1$	$\sigma^2_e + r \sigma^2_p$
Error	$(r - 1)(p - 1)$	σ^2_e
Total	$pr - 1$	

donde: r es el número de bloques o repeticiones en este caso 3, p es el número de poblaciones en este caso 32. Los bloques y poblaciones se consideraron como efectos aleatorios, las pruebas de F para los factores principales fue probada con el cuadrado medio del error (CMe).

Luego de realizar este análisis con el objetivo de detectar cuales poblaciones difirieron significativamente en la media de los caracteres evaluados, se realizó la *prueba t* para la diferencia mínima significativa (LSD, “*least significance difference*”) mediante el procedimiento *glm* del programa estadístico SAS V.8.

3.1.11 Estimación de componentes de variancia

Los componentes de variancia para cada variable se estimaron a partir de las esperanzas de los cuadrados medios ($E(CM)$) obtenidas en los cuadros de análisis de variancia.

$$\sigma^2_g = \text{Variancia genética} \quad \sigma^2_g = (CM_p - CM_e)/r$$

CM_p = Cuadrado medio de poblaciones

CM_e = Cuadrado medio del error experimental

r = Número de repeticiones

$$\sigma^2_e = \text{Variancia ambiental} \quad \sigma^2_e = CM_e$$

$$\sigma^2_f = \text{Variancia fenotípica} \quad \sigma^2_f = \sigma^2_g + \sigma^2_e$$

3.1.12 Estimación del grado de determinación genética (GDG)

La heredabilidad en sentido amplio o grado de determinación genética expresa la variabilidad genética potencial (Falconer, 1989). Sin bien, ésta estimación engloba los efectos aditivos, dominantes y epistáticos, podríamos suponer que si un carácter tiene un alto GDG, indica al menos que los procesos de diferenciación poblacional (posibles efectos fundadores, deriva y selección natural) han sido efectivos y sugerirían la posibilidad de realizar selección sobre ellos. Sin embargo queda claro que la ganancia esperada por selección deberá ser estimada en futuros trabajos

que estimen la varianza genética aditiva, por ejemplo a través de familias de medios hermanos (Falconer, 1989).

Una vez obtenidos las estimaciones de los componentes de variancia a partir del análisis de variancia, se estimó el GDG (Burton, 1952; Burton y De Vane, 1953; Shing *et al*, 1993):

$$GDG = \sigma^2_g / \sigma^2_f$$

También se calcularon los coeficientes de variación genética (CVg) y fenotípica (CVf) (Burton y De Vane, 1953; Singh y Chaudhary, 1979) de la siguiente manera:

$$CVg = \sqrt{(\sigma^2_g)} / \text{media}$$

$$CVf = \sqrt{(\sigma^2_f)} / \text{media}$$

En forma conjunta el coeficiente de variación genética y la estimación de la heredabilidad de un carácter nos da idea del potencial para efectuar una posible selección en la población analizada (Burton y De Vane, 1953).

3.1.13 Estimación de la correlación fenotípica

La asociación entre dos caracteres que pueden ser directamente observados es la correlación de valores fenotípicos o correlación fenotípica. Esta se determina a través de la medición de dos caracteres en un número de individuos de la población, se realiza para conocer el grado de asociación entre los caracteres para ser utilizados en futuros procesos de selección. Para esta estimación se realizó un análisis de variancia y covariancia (Cuadro 4), mediante el procedimiento *corr* del paquete estadístico SAS/V8 (coeficiente de correlación de Pearson).

Cuadro 4: Fuentes de variación, grados de libertad (GL) y esperanza de los cuadrados medios (E(CM)), esperanza de los productos medios (E(PM)) para cada componente de variancia y covariancia en el análisis entre poblaciones

Fuente de Variación	GL	E(CM)	E(PM)
Repeticiones	$r - 1$		
Entre Poblaciones	$p - 1$	$\sigma^2_e + r\sigma^2_g$	$\text{Cov}_e(XY) + r\text{Cov}_g(XY)$
Error	$(r - 1)(p - 1)$	σ^2_e	$\text{Cov}_e(XY)$
Total	$pr - 1$		

X e Y= par de caracteres

σ^2_e = componente de la variancia ambiental

Cov_e = componente de la covariancia ambiental

σ^2_g = componente de la variancia genética

Cov_g = componente de la covariancia genética

La covariancia genética (Cov_g) se estimo a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Cov}_g = \frac{[\text{Cov}_e(XY) + r\text{Cov}_g(XY)] - \text{Cov}_e(XY)}{r}$$

Correlación fenotípica (r_f), según Mariotti (1986):

$$r_f = \frac{[\text{Cov}_g(XY) + \text{Cov}_e(XY)]}{\{[\sigma^2_e(X) + \sigma^2_g(X)] [\sigma^2_e(Y) + \sigma^2_g(Y)]\}^{1/2}}$$

3.1.14 Análisis Multivariado

Con los datos obtenidos de las variables morfo-fisiológicas, se decidió aplicar análisis multivariado con el objetivo de detectar diferencias y/o similitudes entre las poblaciones (Crisci y Lopez Armengol, 1983), en respuesta a los caracteres evaluados. Los análisis aplicados fueron: Análisis de Componentes Principales y Análisis Jerarquizado (Cluster).

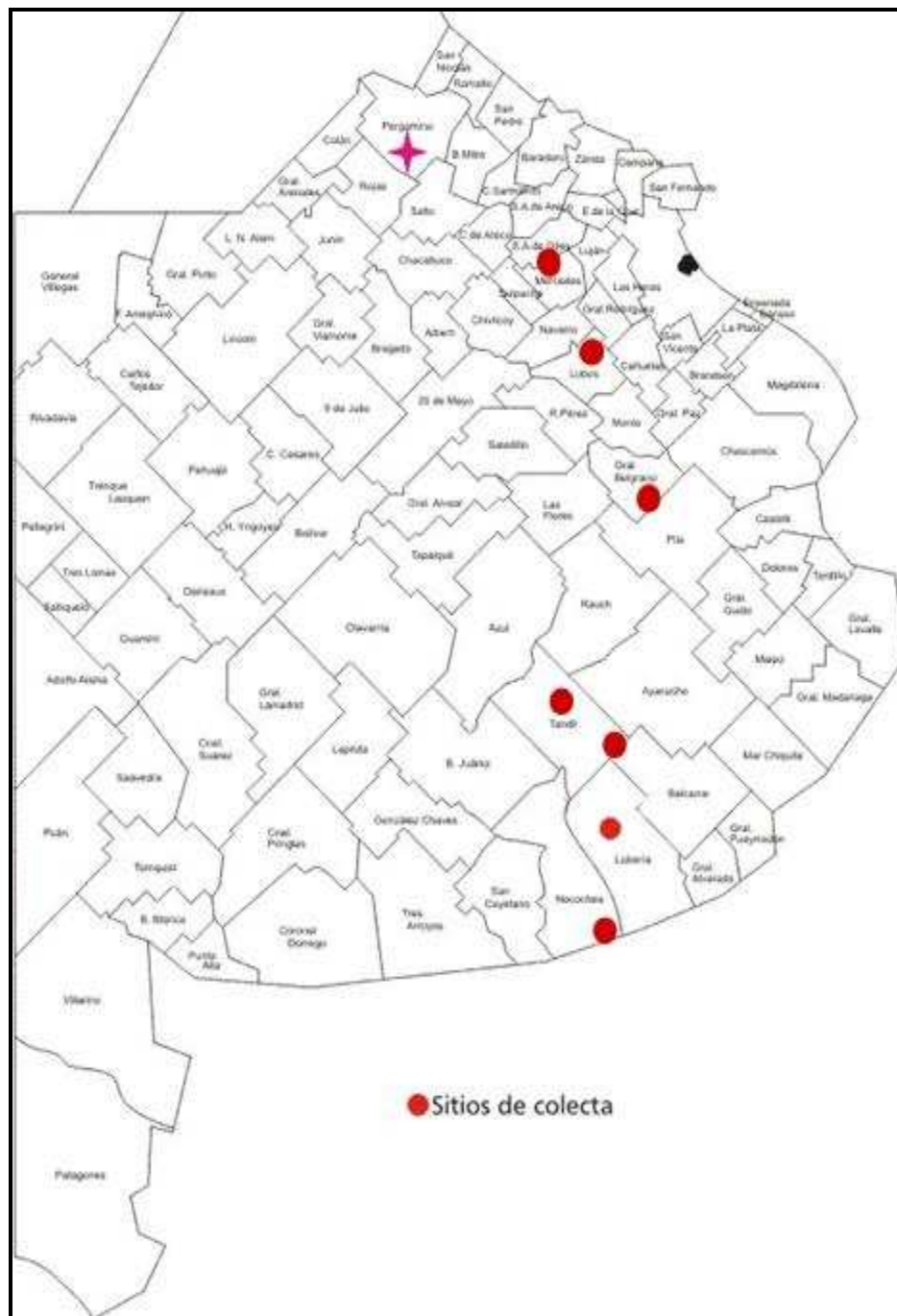
El Análisis de Componentes Principales se basa en la transformación de un conjunto de variables cuantitativas originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales. El objetivo de este análisis es poder condensar la información obtenida, en unas pocas componentes principales que expliquen la mayor variabilidad posible. El mismo se realizó mediante *Análisis de Componentes Principales* del paquete estadístico InfoStat/Profesional Versión 1.1.

Por su lado el Análisis Jerarquizado o Cluster es una técnica de agrupamiento que se basa en las similitudes o distancias entre las observaciones o variables para ello se utilizó como medida de distancia la distancia euclídea. Los resultados del agrupamiento se pueden observar a través de un dendrograma y el método empleado fue el del centroide no ponderado Ward, el cual promedia todas las distancias entre pares de poblaciones (en este caso) ajustando por las covariancias. El mismo se realizó mediante *análisis de conglomerados* del paquete estadístico InfoStat/Profesional Versión 1.1.

3.2 Caracterización Molecular

3.2.1 Poblaciones Evaluadas

Para realizar la caracterización de la variabilidad genética a nivel molecular, no se consideraron todas las poblaciones evaluadas en la caracterización morfo-fisiológica, sino algunas de ellas. El criterio de inclusión se fundamentó en la elección de aquellas poblaciones que en el análisis de cluster pertenecían a distintos sub-grupos. Este análisis se realizó considerando tres caracteres de importancia agronómica en cualquier programa de selección de especies forrajeras: materia seca total (peso seco acumulado de 3 cortes) por planta, peso total de semillas por planta y número de espigas por planta. También se incluyeron poblaciones que en análisis de cluster estuvieron muy cercanas, de manera de tener una medida comparativa de la efectividad de ambos análisis (morfo-fisiológico y molecular) en la discriminación de las poblaciones. Las poblaciones que pasaron a la etapa de análisis molecular fueron las siguientes: 10, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 (Gráfico 3).



3.2.2 Material vegetativo y extracción de ADN

Se realizó la puesta a punto de la extracción de ADN en las poblaciones 10, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (cuadro 1), se utilizó tejido verde fresco de plántulas individuales, cuyas semillas fueron sembradas en macetas con tres partes de tierra y una parte de compost (Foto 1). Se sembraron 100 semillas por población, las que fueron mantenidas en un invernáculo sin calefacción durante 20 días. El objetivo fue promover el crecimiento vegetativo y obtener al menos 3-4 hojas.

Foto 1: Poblaciones sembradas en macetas, plántulas de 20 días de crecimiento para obtener tejido verde fresco para la extracción de ADN



La extracción de ADN se realizó utilizando la metodología de Kleinhofs *et al*, 1993 con algunas modificaciones:

1. Se tomó la mayor cantidad de hojas que presentó cada plántula con un crecimiento de 20 días pesando en promedio aproximadamente 100 mg.
2. Se colocó el tejido fresco en microtubos de 2ml y éstos dentro de nitrógeno líquido, dejándolos unos minutos para que se congelen. Se retiró el microtubo del nitrógeno líquido y se molió rápidamente las muestras sin que se descongelen, con un vástago de punta cónica.
3. Se agregó 600µl de buffer de extracción (sin CTAB), caliente (65°C) en cada microtubo y se molió nuevamente.
4. Se realizó la incubación de los microtubos en baño de agua a 65°C, 10 min.
5. Se agregó 75µl de SDS y 75µl de CTAB, calientes (65°C)
6. Se incubó en baño de agua a 65°C, 30 min a 1 hora (con inversiones cada 15 minutos)
7. Se agregó 750µl de cloroformo
8. Se mezcló suavemente mediante inversiones durante 10 minutos
9. Se centrifugó a 10.000 rpm, 30 minutos
10. Se extrajo el sobrenadante ($\pm 670\mu\text{l}$) y se volcó en un microtubo de 1,5ml (1er cambio de tubo)
11. Se agregó un volumen igual de cloroformo.
12. Se mezcló suavemente mediante inversiones durante 10 minutos.
13. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos.
14. Se extrajo el sobrenadante y se volcó en un microtubo de 1,5 ml (2do cambio)
15. Se precipitó el ADN con isopropanol frío, se agregó un 60% del volumen (aproximadamente 500µl). Se mezcló suavemente.
16. Se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm
17. Se descartó el sobrenadante quedando el pellet.

Luego se realizó el lavado de pellet, como se detalla a continuación:

1. Se agregó 1ml de etanol al 70%
2. Se centrifugó 8-10 minutos.
3. Se descartó el sobrenadante y se realizó el 2do lavado con etanol
4. Se centrifugó y descartó el sobrenadante.
5. Se dejó secar el pellet, hasta evaporación total del etanol (tubitos abiertos).
6. Se resuspendió el ADN con 40µl de TE 1X

Buffer de extracción:

	Concentración Final
1M TrisClH (pH 8)	100mM
5M NaCl	700mM
0,5M EDTA (pH 8)	50mM
SDS 20%*	2%
CTAB 10%*	1%
H ₂ O	

*Se agregó después de calentar a 65°C

3.2.3 Cuantificación y Dilución de ADN

Se cuantificó el ADN extraído, en forma visual sembrando 2µl de ADN y 8µl de BPB (Azul de bromofenol) en geles de agarosa 0,8 % con bromuro de etidio (0,1µg/µl). Se compararon con muestras de ADN de concentración conocida y se visualizaron mediante transiluminador de luz ultravioleta. Una vez cuantificadas las muestras del ADN extraído se procedió a realizar las diluciones de trabajo con TE 1/10 (1:Tris 10:EDTA) , llegándose a una concentración final de 10 ng/µl.

3.2.4 Amplificación del ADN

Se realizó la puesta a punto de las técnicas de SSR, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de 10 individuos de cada población sólo a los fines de ajustar la técnica y se probaron 10 microsatélites públicos de la especie *Lolium perenne* L. extraídos de Jones *et al* (2001): LPH01A02, LPH01A07, LPH01A10, LPH01D09, LPH01E10, LPH01F02, LPH01H06, LPH02C11, LPH01A03, LPH01A1 (Cuadro 5).

Cuadro 5: Descripción de primers tentativos utilizados para la determinación de variabilidad genética a nivel molecular

Primer	Secuencia	Identificación
LPH01A02-F	aaagaccgcatacgaagt	LPH01A02
LPH01A02-R	aaccaaagcctcaagaca	
LPH01A07-F	tggagggtctgtggagaagt	LPH01A07
LPH01A07-R	cggttcccacgccttgc	
LPH01A10-F	gaggcaccggccatggag	LPH01A10
LPH01A10-R	aggacgagccactcacttg	
LPH01D09-F	caagtgccaccatagatacaa	LPH01D09
LPH01D09-R	cgtgaagatcactataaacacga	
LPH01E10-F	cgcagcttaatttagtc	LPH01E10
LPH01E10-R	gctttgagtatgtaaagtt	
LPH01F02-F	tcgtgggtccttctggat	LPH01F02
LPH01F02-R	tcgggtgatgatgttgactt	
LPH01H06-F	attgactggcttcctgtgtt	LPH01H06
LPH01H06-R	cgcgattgcagattcttg	
LPH02C11-F	tggataacgatgaaaag	LPH02C11
LPH02C11-R	catcacgaattaacaagag	
LPH01A03-F	ggacgaactgccgagaca	LPH01A03
LPH01A03-R	cgggcatggtgagaagga	
LPH01A1-F	cggccacccttgatagag	LPH01A1
LPH01A1-R	tcgtcaaggatccggaga	

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100, utilizándose el programa touch-down:

- Temperatura inicial de desnaturalización de 94°C, durante 5 minutos
- Ciclos: (15)
 - ❖ Desnaturalización 94°C, 30 segundos

- ❖ Temperaturas de hibridación con un gradiente de temperatura comenzando a 65°C y finalizando a 50°C después de los 15 ciclos (-1°C/ciclo)
- ❖ Extensión 72°C, 30 segundos cada ciclo
- Ciclos: (35)
 - ❖ Desnaturalización 94°C, 30 segundos
 - ❖ Temperaturas de hibridación de 55°C durante 30 segundos cada ciclo
 - ❖ Extensión 72°C, 30 segundos cada ciclo
- Extensión: 72°C, 10 minutos
- Final 4°C

Los SSR que no amplificaron con la temperatura de hibridación o annealing de este programa, se procedieron a amplificar con la temperatura obtenida a partir del siguiente cálculo (Rybicki, 2005. <http://www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBiolManual>):

$$T_m: 4(G+C) + 2(A+T)$$

Donde:

T_m: temperatura de fusión o melting (temperatura of melting)

G: cantidad de bases de Guanina

C: cantidad de bases de Citosina

A: cantidad de bases de Adenina

T: cantidad de bases de Timina

Para aquellos SSR que no amplificaron con ésta T_m , se siguió ajustando estimando la T_m para cada primer dentro de cada SSR y al menor valor de los dos se le redujo 5°C (Innis y Gelfand, 1990) como se observa en el cuadro 6.

Cuadro 6: Descripción de primers probados utilizados para la determinación de variabilidad genética a nivel molecular, T_m (temperatura de hibridación, °C), T_m promedio (temperatura de hibridación promedio °C, entre ambos primers Forward-F- y Reverse-R-), T_m -5°C (temperatura de hibridación reduciendo 5°C a la temperatura menor entre F y R), identificación del SSR

Primer	Secuencia	T_m (°C)	T_m promedio (°C)	T_m (-5°C)	IDENTIFICACION
LPH01A02-F	aaagaccgcatacgaagt	52	52	47	LPH01A02
LPH01A02-R	aaccaaaagcctcaagaca	52			
LPH01A07-F	tggagggtcgtggagaagt	64	61	53	LPH01A07*
LPH01A07-R	cgggtcccacgccttgc	58			
LPH01A10-F	gaggcaccggccatggag	62	61	55	LPH01A10
LPH01A10-R	aggacgagccactcacttg	60			
LPH01D09-F	caagtgcaccatagatacaa	60	62	55	LPH01D09*
LPH01D09-R	cgtgaagatcactataaacacga	64			
LPH01E10-F	cgcagcttaatttagtc	34	42	29	LPH01E10
LPH01E10-R	gctttgagtatgtaaagtt	50			
LPH01F02-F	tcgtgggtccttctggat	58	58	53	LPH01F02
LPH01F02-R	tcgggtgatgatgttgactt	58			
LPH01H06-F	attgactggcttcggtgtt	56	55	49	LPH01H06*
LPH01H06-R	cgcgattgcagattcttg	54			
LPH02C11-F	tggataacgatgaaaag	48	50	43	LPH02C11
LPH02C11-R	catcacgaattaacaagag	52			
LPK01A03-F	ggacgaactgccgagaca	58	58	53	LPK01A03*
LPK01A03-R	cgggcatggtgagaagga	58			
LPK01A1-F	cggccacccttgatagag	58	58	53	LPK01A1
LPK01A1-R	tcgtcaaggatccggaga	58			

*Finalmente se establecieron las siguientes temperaturas para los SSR amplificados:

SSR	Temperatura de hibridación °C
LPH01A07	55
LPH01D09	55
LPH01D06	50
LPK01A03	50

Para la puesta a punto de las amplificaciones también se probó con cada temperatura estimada diferentes concentraciones de los componentes de la Mix PCR. Variando la concentración del Cl_2Mg desde 1,5 mM hasta 2 mM, la concentración de primers desde 0,5 μM hasta 1,5 μM y la concentración de TAQ desde 0,5U a 0,9U. Ajustándose así las concentraciones de trabajo, las reacciones de amplificación finales se realizaron en un volumen final de 13 μl en placas de 96 wells para PCR y en las concentraciones que se mencionan:

Mix PCR

	Concentración final
Primer (F+R)	0,92 μM
TAQ pol (Invitrogen TM)	0,75 U/ μl
ADN	10 ng/ μl
Buffer	10X
Cl_2Mg	1,5mM
dNTP	2mM
H_2O ultrapura	

3.2.5 Preparado de vidrios, corrida, tinción y revelado

La separación de los productos de amplificación se realizó en geles desnaturizantes de poliacrilamida 6% (19:1 acrilamida: bis-acrilamida) de 0,4 mm de espesor, mediante electroforesis vertical en cubas de secuenciación (Sequi-Gen[®] GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell, BioRad). Los geles y armado de la cuba se realizaron según especificaciones de BioRAD. En cada gel se sembró 3 μl de los productos de amplificación y 25 individuos por población por SSR para realizar el análisis de la misma.

La corrida electroforética se realizó a 55 Watts el tiempo de duración de la corrida se adecuó al peso molecular (PM) estimado del SSR obtenido de Jones *et al*, 2001. En cada corrida se utilizaron como marcadores de peso molecular DNA Step Ladder DNA (Invitrogen™ 10 pb y 25 pb) para estimar el peso molecular de los alelos presente en cada SSR de las diferentes poblaciones. Una vez finalizada la corrida se realiza al revelado de la bandas mediante la tinción con plata siguiendo el Protocolo de Tinción con Plata para Secuenciación de Promega Corp. Efectuado el revelado se procedió a evaluar manualmente los tamaños de pares de base de los alelos presentes, utilizando un transiluminador de luz blanca considerando los diferentes tamaños de bandas amplificados como diferentes alelos.

3.2.6 Análisis estadístico de los resultados

Se realizó el análisis estadístico de los datos con el fin de cuantificar la variabilidad genética, mediante la existencia de polimorfismos, la frecuencia de alelos y la diversidad genética. La estructura genética de una población se estimó mediante los estadísticos F de Wright, y se trató de establecer el grado de asociación entre poblaciones por medio de análisis multivariado.

3.2.7 Cuantificación de la variabilidad genética

Mediante el programa Genetic Analysis in Excel -GenAlEx6©- (Peakall y Smouse, 2006) se analizaron los siguientes parámetros estadísticos:

- **N**: número de individuos analizados por población.
- **Ne**: número efectivo de alelos por locus. Es una medida de diversidad e indica el tamaño de una población ideal en la cual dada las frecuencias alélicas existentes todos

los individuos son totalmente diferenciados (Peakall y Smouse, 2006). Se calculó como:

$$N_e = 1/(1-H_e)$$

Donde: H_e , es la heterocigosis esperada de la población

- **p_i** : frecuencia del alelo i^{mo}
 - o Alelos comunes: aquellos alelos que se encuentran en una frecuencia por encima del 5% ($p_i > 0,05$)
 - o Alelos raros: se denomina aquellos alelos que se encuentran en una frecuencia por debajo del 5% ($p_i \leq 0,05$)
 - o Alelos privativos: son aquellos alelos que solo están presentes en una población, pueden o no ser alelos raros.
 - o Alelos compartidos: son aquellos alelos que indistintamente de la frecuencia que se encuentre están presente en todas las poblaciones analizadas.

- **H_o** : heterocigosis observada, se determinó en forma directa y es la cantidad de heterocigotos presentes en la población (Peakall y Smouse, 2006). Se calculó como:

$$H_o = N^o \text{ heterocigotos} / N$$

Donde: N , es el tamaño de la muestra.

- **H_e** : heterocigosis esperada. es una estimación del poder discriminatorio de un locus tiene en cuenta el número de alelos y su frecuencia relativa. En este programa (Peakall y Smouse, 2006) la H_e es equivalente al contenido de información polimórfica (PIC),

que es un parámetro utilizado para medir la capacidad discriminatoria de los loci es decir la variabilidad genética de cada SSR, según Anderson *et al*, 1993:

$$He = PIC = 1 - \sum_{i=1}^N p_i^2$$

Donde: p_i , es la frecuencia alelica del i^{mo} alelo

N , el número de alelos observados

- **Nm:** es el número de migrantes. Si $Nm < 1$, indica una diferenciación local de poblaciones, mientras que si $Nm > 1$, indica que ocurrió una diferenciación entre las poblaciones (Peakall y Smouse, 2006). Se calculó como:

$$Nm = \frac{[1/F_{st}] - 1}{4}$$

3.2.8 Análisis de la estructura genética de la población

Mediante los estadísticos F de Wright (Wright, 1951) se determinó la estructura genética de cada población este método es el más utilizado y se basa en la idea de que la subdivisión de una población lleva consigo un efecto similar a la endogamia, por lo tanto es posible medir este efecto en términos de la reducción en la proporción de genotipos heterocigóticos, es decir en términos de heterocigosidad.

- **Estadísticos F de Wright:**

Mide la reducción de heterocigosis esperada con apareamiento al azar a cualquier nivel de jerarquía poblacional en relación a otro nivel más inclusivo de la misma. Los estadísticos F jerarquizados definidos a continuación son todos coeficientes de endogamia, pero se

diferencian según la población de referencia. Fis se refiere a la endogamia en individuos (i), en relación con la de la subpoblación (s) a la que pertenecen; Fst se refiere a la endogamia en subpoblaciones (s), en relación con la de la población total de la que son una parte; Fit se refiere a la endogamia en individuos (i), en relación con la de la población total (t). Se calcularon de la siguiente forma:

- **Fis:** es el coeficiente de endogamia dentro de individuos de una misma población. Nos da idea de la reducción en heterocigosidad de un individuo debido al apareamiento no aleatorio en su subpoblación. Valores cercanos a cero indican cruzamientos al azar dentro de la población, valores sustancialmente positivos indican endocria o alelos nulos no detectados y valores negativos indican un exceso de heterocigotos, debido a cruzamientos negativos o selección heterocigotos. Se calcula como:

$$Fis = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Donde: $\hat{H}_e$, es la heterocigosis esperada por población

H_o , es la heterocigosis observada por población

- **Fst:** es el índice de fijación y mide el efecto de la subdivisión de la población que es la reducción promedio de la heterocigosidad de una subpoblación debido a la deriva génica por azar. Si todas las subpoblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg con la misma frecuencia alélica, $Fst=0$.

$$Fst = \frac{H_T - H_e}{H_T}$$

Donde: H_T , es la heterocigosis esperada en la población total

- **Fit:** es el coeficiente de endogamia total de un individuo, incluye la contribución debida a los cruzamientos no al azar ocurridos dentro de las subpoblaciones (F_{is}) y la contribución debida a la propia subdivisión (F_{st}). El F_{it} mide la reducción en heterocigosidad de un individuo en relación a la población total. Se calcula como:

$$Fit = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

3.2.9 Análisis Multivariado

Dentro de los análisis se realizó la matriz básica de datos, la matriz de similitud, el análisis de variancia correspondiente para evaluar la variabilidad entre y dentro de poblaciones, el método de ordenamiento, el método de clasificación, se trató de establecer la existencia de patrones de estructuración geográfica de los genotipos y el método para consensuar los datos moleculares con los datos agronómicos. De esta forma el conjunto de resultados obtenidos a través del análisis multivariado permitió tipificar las poblaciones y establecer relaciones entre ellas.

3.2.10 Matriz Básica de Datos (MBD)

Se consideraron 20 individuos de cada una de las poblaciones en estudio. A partir de los alelos identificados se construyó una Matriz Básica de Datos (MBD) computando la frecuencia relativa de presencia/ausencia de banda o alelo por SSR, mediante 1 y 0 respectivamente, obteniendo una MBD para individuos dentro de poblaciones.

3.2.11 Matriz de distancia genética

El grado de asociación o relación genética entre poblaciones se estableció mediante la distancia genética de Prevosti (Prevosti, 1974, citado por Wrigth, 1978) también conocida como distancia genética de Gregorious (Gregorious, 1974, 1984):

$$d_{ij} = \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p \sum_{l=1}^q |x_{ikl} - x_{jkl}|^2$$

Donde d_{ij} es la medida de distancia genética entre unidades i y j , basadas en las frecuencias alélicas (relativas) correspondientes a p loci cada uno de ellos con q alelos. $k=1, 2, \dots, p$ y $l=1, 2, \dots, q$. Esta distancia se eligió por simplicidad, por ser una distancia euclídea lo que garantiza su representación en un espacio cartesiano y por poseer resultados altamente satisfactorios para ser aplicada en marcadores multialélicos (demostrados en estudios de simulación Carbonell *et al*, 2002, 2003). Los datos fueron analizados mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomic System, ver. 2.11) (Rohlf, 2002).

3.2.12 Análisis de Variancia (AMOVA)

La matriz de distancias entre individuos dentro de poblaciones permitió evaluar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, la hipótesis nula a testear fue “no existe diferencia entre poblaciones”. Los datos fueron analizados mediante el programa Genetic Analysis in Excel (Peakall y Smouse, 2006)

3.2.13 Análisis de Ordenamientos. Análisis de Coordenadas Principales

El objetivo de este análisis es poder concentrar la información obtenida, en unas pocas coordenadas principales que expliquen la mayor variabilidad posible. El Análisis de Coordenadas Principales (Gower, 1966) es un método adecuado para variables cualitativas y se realizó a partir de la matriz de distancia genética entre poblaciones transformándola mediante multiplicación (-1) y sumando (1), obteniendo así la matriz de similitud, y con esta se realizó el consiguiente análisis. Los datos fueron analizados mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomic System, ver. 2.11) (Rohlf, 2002).

3.2.14 Análisis de Agrupamiento. Análisis de Cluster

Para ordenar, clasificar y agrupar las poblaciones según su caracterización molecular, se partió de la matriz de distancia genética donde d_{ij} midió el grado de asociación entre poblaciones. Fueron reveladas mediante el método jerarquizado de promedios aritméticos no ponderados entre grupos por pares (“Unweighted Pair Group Arithmetic Average”) (Sneath y Sokal, 1973). El algoritmo utiliza como regla de jerarquización la minimización de la distancia genética entre grupos, definida como el promedio aritmético no ponderado entre un grupo i de m individuos y otro grupo j de n individuos:

$$d_{ij} = \frac{1}{m \cdot n} \sum_{h=1}^m \sum_{l=1}^n d(ih, jl)$$

donde el h^{mo} y el l^{mo} individuo pertenecen al i^{mo} y j^{mo} grupo respectivamente.

Los datos fueron analizados mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomic System, ver. 2.11) (Rohlf, 2002).

3.2.15 Coeficiente de Correlación Cofenética

Para medir la distorsión ocasionada en el manejo de los datos durante la construcción de los dendrogramas se utilizó el Coeficiente de Correlación Cofenética (CCC) propuesto por Sokal y Rohlf (1981). Los datos fueron analizados mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomic System, ver. 2.11) (Rohlf, 2002).

3.2.16 Test de Mantel

El Test de Mantel (Mantel, 1967) permitió determinar la existencia de patrones de estructuración geográfica de los genotipos ya que permitió cuantificar la relación existente entre la distancia genética de las poblaciones y la distancia geográfica de las zonas de colección de las mismas, mediante un coeficiente de regresión. Los datos fueron analizados mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomic System, ver. 2.11) (Rohlf, 2002).

3.3 Análisis conjunto de la Caracterización Agronómica y la Caracterización Molecular

El objetivo de realizar el análisis conjunto de los caracteres morfológicos y moleculares fue determinar las posibles relaciones existentes entre ambos en aquellas poblaciones que se analizaron con ambas caracterizaciones. Para ello se realizó el análisis de procrustes generalizado.

3.3.1 Análisis de Procrustes Generalizados

El Análisis de Procrustes Generalizados (Gower, 1975) permitió utilizar para cada tipo de variable una medida de distancia y un método de ordenación particular, obteniendo tantas configuraciones de individuos como fueran necesarias, para luego promediarlas en una única configuración denominada configuración de consenso (Bramardi, 2000). De esta forma se obtuvo un dato consenso entre los datos moleculares y los agronómicos para cada población, como también su dispersión desde el punto consenso. Los datos fueron analizados mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomic System, ver. 2.11) (Rohlf, 2002).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización Agronómica

4.1.1 Caracteres Vegetativos

En el cuadro 7, se presenta el comportamiento del análisis conjunto de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide: media, desvío estándar, máximo, mínimo, coeficiente de variación y significancia ($Pr > F$), para todos los caracteres vegetativos estudiados. Mientras que en el cuadro 8, se observa el comportamiento promedio de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide para los caracteres vegetativos. En general se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para la mayoría de las variables analizadas, con excepción del número de macollos vegetativos y la altura de planta previo al segundo corte.

Cuadro 7: Comportamiento promedio de las poblaciones de raigrás anual diploide en caracteres vegetativos.

Media, desvío estándar, máximo, mínimo, coeficiente de variación, nivel de significancia ($Pr > F$)

Variable	Media	Desvío estándar	Máximo	Mínimo	Coeficiente de Variación	Pr > F
Hábito de crecimiento (1=postrado...4=erecto)	1,84	1,09	4,00	1,00	59,09	0,0001
Vigor de planta (1=regular...3=muy bueno)	1,83	0,86	3,00	1,00	46,99	0,0001
Ancho de hoja (1=angosta...3=ancha)	1,84	0,88	3,00	1,00	47,88	0,0001
Número de macollos vegetativos	60,41	17,32	119,00	20,00	28,68	NS
Altura de planta previo al segundo corte (cm)	13,31	3,57	23,00	7,30	26,84	NS
Peso de materia seca primer corte (g)	22,55	1,26	72,00	10,50	5,58	0,0001
Peso de materia seca segundo corte (g)	22,44	1,24	95,00	11,00	5,54	0,0001
Peso de materia seca tercer corte (g)	38,13	1,36	128,60	15,00	3,5	0,0001
Peso de materia seca total (g)	55,88	17,77	152,60	11,70	31,80	0,0001

NS: no significativa

Cuadro 8: Medias aritméticas de los caracteres vegetativos de las poblaciones de raigrás anual diploide evaluadas en condiciones de planta aislada en la EEA Pergamino durante 2004

Poblaciones	Hábito de crecimiento (1... 4)	Vigor de planta (1....3)	Ancho de hoja (1...3)	Número de macollos vegetativos	Altura de planta al 2º corte (cm)	Peso de materia seca 1º corte (g)	Peso de materia seca 2º corte (g)	Peso de materia seca 3º corte (g)	Peso de materia seca total (g)
2	1,15	1,00	1,15	76,83	13,23	22,14	22,08	37,80	56,23
3	1,30	1,20	1,30	64,17	12,33	19,19	22,46	38,67	57,75
4	1,65	1,45	1,50	49,00	9,77	20,42	21,00	34,86	58,72
5	2,50	2,85	1,50	58,33	11,53	21,10	19,14	27,13	56,31
6	1,05	1,10	1,05	65,00	11,47	21,46	22,94	39,17	51,01
9	1,05	1,40	1,70	52,17	14,57	24,13	21,76	37,37	56,34
10	1,25	1,10	1,20	63,83	13,77	23,63	21,81	37,37	56,48
11	1,10	2,85	2,35	56,67	10,80	22,51	21,56	37,04	50,79
12	3,35	2,45	2,10	53,50	11,43	25,01	23,53	40,75	59,13
13	2,00	2,40	2,20	59,00	13,10	21,09	25,57	43,00	59,30
14	2,30	1,75	2,25	56,50	13,53	22,80	21,41	37,02	54,34
15	2,25	1,90	2,30	43,50	15,67	21,98	21,68	37,07	53,07
16	1,60	1,95	1,40	61,17	12,23	18,57	19,17	34,20	50,02
17	1,05	1,05	1,05	62,67	17,20	19,70	21,07	36,52	39,86
18	1,60	1,25	1,10	50,83	13,77	21,57	24,50	42,75	56,18
19	1,95	2,70	2,90	61,83	16,33	22,85	22,68	38,73	54,80
20	1,70	2,00	2,95	56,67	16,80	20,01	22,98	39,58	54,39
21	2,15	2,55	2,95	68,33	16,47	22,53	20,81	34,77	51,91
22	1,05	2,25	1,60	53,33	12,87	21,55	21,02	35,27	50,92
25	3,85	3,00	2,60	66,67	13,67	25,37	23,41	40,11	57,36
26	1,30	1,35	1,30	60,00	11,23	21,06	21,20	36,97	52,44
27	1,70	1,45	1,80	61,83	10,23	21,34	21,18	36,95	52,66
28	3,50	2,40	2,90	55,00	15,57	23,19	23,14	39,92	58,50
29	2,35	2,70	2,10	74,83	11,23	25,39	26,66	43,07	61,43
30	1,00	1,15	1,25	62,33	13,90	23,69	21,99	37,45	56,27
31	1,45	1,50	1,45	67,33	11,23	24,44	21,09	36,63	53,17
32	1,05	1,15	1,00	74,33	11,10	23,61	21,94	37,39	60,58
33	1,10	1,15	1,20	72,33	15,00	24,23	27,21	43,13	64,48
34	2,35	1,40	2,90	47,67	12,33	23,24	22,38	38,63	58,52
35	1,60	1,45	1,15	58,17	13,67	23,78	23,48	40,67	60,33
36	3,50	1,95	2,05	67,17	15,80	26,12	24,23	41,11	64,80
37	2,20	2,70	2,70	52,00	13,97	24,00	22,87	38,96	59,93
Media	1,84	1,83	1,84	60,41	13,31	22,55	22,44	38,13	55,88
LSD/LSR	0,13	0,36	0,37	19,12	5,66	1,09	1,08	1,12	7,06

Nota: LSD (*diferencias mínimas significativas*: $\alpha=0,05$); LSR (*cocientes mínimos significativos* $\alpha=0,05$)

1. Hábito de crecimiento

La media del hábito de crecimiento considerando todas las poblaciones correspondió al tipo semipostrado (Cuadro 7), este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). El mayor porcentaje de plantas mostró un hábito de crecimiento postrado (53,91%), seguido por un hábito semipostrado (22,19%). Los porcentajes menores correspondieron a plantas con hábito erecto (14,38%) y semierecto (9,53%) (Gráfico 4).

2. Vigor de planta

El vigor de planta promedio entre todas las poblaciones fue calificado como bueno (Cuadro 7), y se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). El mayor porcentaje de plantas (46,88%) evidenció un vigor regular y el resto osciló entre muy bueno (29,84%) y bueno (23,28%) (Gráfico 5).

3. Ancho de hoja

El tipo promedio de ancho de hoja de todas las poblaciones fue medio (Cuadro 7) y se evidenciaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). El mayor porcentaje de plantas logró un ancho de hoja tipo angosta (47,97%), seguido por un alto porcentaje (32,19%) con hojas anchas, y un porcentaje menor (19,84%), de hojas de ancho intermedio (Gráfico 6).

4. Número de macollos vegetativos

La media del número de macollos vegetativos por planta fue de 60,40 considerando todas las poblaciones, con un rango de 20 a 119 (Cuadro 7), y no se detectaron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). La población 2 logró el mayor número de macollos vegetativos por planta (76,83) mientras que la población 15 presentó el menor número de macollos (43,50) (Cuadro 8). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 48 % logró entre 42 y 66 macollos vegetativos (Gráfico 7).

5. Altura de planta previo al segundo corte

La altura media de planta, entre todas las poblaciones, previo al segundo corte fue de 13,31 cm, con un rango que osciló entre 7,3 y 23 cm (Cuadro 7). Similarmente al número de macollos vegetativos, este carácter no presentó diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). La población 17 logró la mayor altura (17,20 cm), mientras que la población 4 presentó la menor (9,77 cm) (Cuadro 8). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 32 % logró entre 11 y 14 cm de altura previo al segundo corte (Gráfico 8).

6. Peso de materia seca al primer corte

La media del peso de materia seca al primer corte por planta fue 22,55 g, con un rango que osciló entre 10,50 a 72 g (Cuadro 7). Este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). La población 36 logró el mayor peso de materia seca promedio por planta (26,12 g), mientras que la población 16 presentó el menor valor (18,57 g).

Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 58 % logró entre 8 y 16 g de materia seca (Gráfico 9).

7. Peso de materia seca al segundo corte

La media del peso de materia seca al segundo corte fue 22,44 g (Cuadro 7), oscilando entre 11g y 95g. Similarmente a lo ocurrido en el primer corte, se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). El mayor peso seco fue para la población 33 (27,21 g) mientras que la población 5 presento el menor peso (19,14 g). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 73 % logró entre 7 y 17 g de materia seca (Gráfico 10).

8. Peso de materia seca al tercer corte

La media del peso de materia seca al tercer corte fue 38,13 g, con un rango de 15 a 128,6g (Cuadro 7). Al igual que los dos cortes previos, este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 8). La población 33 presentó el mayor peso (43,13 g) mientras que la población 5 presento el menor valor (27,13 g). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 42 % logró entre 21 y 33 g de materia seca (Gráfico 11).

9. Peso de materia seca total

La media del peso de materia seca al total fue 55,88 g, con un rango de 11,7 a 152,6 g (Cuadro 7). Este carácter también evidenció diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre poblaciones (Cuadro 8). La población 36 logró el mayor peso acumulado (64,80 g) mientras que la población 17 logró el menor valor (39,86 g). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 56 % logró entre 40 y 64 g de materia seca (Gráfico 12).

10. Porcentaje de plantas afectadas por roya (*Puccinia spp*):

Se realizaron tres mediciones del porcentaje de plantas afectadas por roya (Gráfico 13):

- ❑ La primera medición realizada el 14/10 presentó una única población con plantas afectadas con roya fue la población 32 con un valor del 2% de plantas afectadas.
- ❑ Durante la segunda medición las poblaciones más afectadas que presentaron valores superiores al 20% fueron la población 33, 32, y 5 con valores de 29%, 24% y 21% respectivamente seguida de las poblaciones de mayor a menor afección: 26 (14%), 28 (13%), 36 (13%), 18 (11%), 25 (11%), 12 (11%) y 3 (10%) entre las menos afectadas están las poblaciones: 19 (9%), 22 (9%), 37 (9%), 2 (7%), 6 (7%), 9 (7%), 14 (7%), 17 (7%), 27 (7%), 4 (4%), 30 (4%), 16 (2%), 31 (2%) y 20 (2%). Mientras que las poblaciones 10, 11, 13, 15, 21, 34 y 35 no presentaron plantas afectadas con roya en la segunda medición.
- ❑ Para la tercera medición las poblaciones más afectadas que presentaron los valores más altos fueron la población 33, 32, 4, 10 14, 5, y 17 con valores de 31%, 29%, 25%, 24%, 23%, 21% y 20% respectivamente seguida de las poblaciones de mayor a

menor afección: 25 (18%), 28 (18%), 29 (18%), 34 (18%), 2 (17%), 13 (16%), 30 (16%), 20 (16%), 18 (15%), 11 (14%), 3 (14%), 35 (14%), 22 (14%), 26 (14%), 36 (14%), 21 (13%), 12 (13%), 19 (13%), 37 (13%), 27 (11%), 31 (11%) y 15 (10%) entre las menos afectadas están las poblaciones: 16 (9%), 9 (7%) y 6 (7%).

4.1.2 Caracteres Reproductivos

En el cuadro 9, se presenta el comportamiento del análisis conjunto de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide: media, desvío estándar, máximo, mínimo, coeficiente de variación y nivel de significancia ($Pr > F$), para todos los caracteres reproductivos estudiados. Mientras que en el cuadro 10, se observa el comportamiento promedio de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide para los caracteres reproductivos. Se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para todos los caracteres analizados.

Cuadro 9. Comportamiento promedio de las poblaciones de raigrás anual diploide en caracteres reproductivos.

Media, desvío estándar, máximo, mínimo, coeficiente de variación, nivel de significancia ($Pr > F$)

Variable	Media	Desvío estándar	Máximo	Mínimo	Coeficiente de Variación	Pr > F
Días a floración desde el transplante	167,01	6,06	178,00	153,00	3,63	0,0001
Número de macollos reproductivos	135,48	50,14	370,00	15,00	37,00	0,0001
Largo de espiga (cm)	23,92	3,96	39,33	11,53	16,75	0,0001
Peso total de semilla (g)	21,83	9,82	83,70	1,71	45,01	0,0001
Peso de mil (g)	2,02	0,57	5,40	0,15	28,40	0,0001

Cuadro 10. Medias aritméticas de los caracteres reproductivos de las poblaciones de raigrás anual diploide evaluadas en condiciones de planta aislada en la EEA Pergamino durante 2004

Poblaciones	Días a floración desde el transplante	Número de macollos reproductivos	Largo de espiga (cm)	Peso total de semilla (g)	Peso de mil (g)
2	172,00	136,61	24,10	19,91	1,95
3	175,00	128,25	23,31	26,21	1,78
4	172,00	99,97	23,17	16,00	2,15
5	175,00	160,50	22,54	21,91	2,13
6	172,00	187,56	23,19	29,64	2,35
9	160,00	133,01	23,37	17,49	1,58
10	165,00	137,17	22,84	23,63	2,14
11	178,00	142,94	25,24	22,60	2,08
12	178,00	125,25	23,99	18,85	2,16
13	172,00	115,78	23,47	23,28	2,11
14	165,00	128,36	26,67	23,86	2,43
15	162,67	129,08	23,73	16,36	1,97
16	165,00	149,50	21,77	22,56	1,73
17	162,67	136,25	23,31	13,34	1,83
18	163,33	142,53	24,46	24,15	1,61
19	162,67	145,64	23,33	21,71	1,73
20	156,67	133,92	24,57	23,54	2,32
21	162,67	147,75	21,41	30,52	2,08
22	165,00	147,58	23,03	23,49	1,80
25	162,67	134,03	22,23	23,43	1,87
26	160,00	164,78	25,13	21,06	1,63
27	162,67	103,86	24,08	16,80	1,86
28	162,67	86,56	30,87	16,38	2,98
29	165,00	127,33	24,50	17,95	1,83
30	160,00	141,11	22,58	18,78	1,73
31	172,00	145,64	22,30	18,13	1,79
32	175,00	156,23	24,56	22,95	1,81
33	175,00	142,94	24,80	29,46	2,46
34	162,67	136,47	24,69	25,30	2,18
35	165,00	119,64	24,55	23,34	2,15
36	172,00	137,47	25,04	26,72	2,27
37	165,00	111,78	22,61	19,24	2,31
Media	167,01	135,48	23,92	21,83	2,02
LSD (0.05)	3,04	21,74	2,15	4,17	0,23

Nota: LSD (diferencias mínimas significativas: $\alpha=0,05$)

1. Fecha de floración

La fecha de floración promedio fue de 167 días desde el transplante (Cuadro 9) oscilando entre 153 y 178 días, y se evidenciaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 10). Para analizar la evolución de la floración se realizaron cinco mediciones (14/10, 21/10, 26/10, 02/11, 08/11), obteniéndose tres grupos a destacar:

- ▣ Precoces: aquellas poblaciones que presentaron alrededor del 50% de plantas con espiga emergiendo en la segunda fecha de medición (Gráfico 14.a), representando el 41% de las poblaciones analizadas.
- ▣ Intermedias: aquellas poblaciones que presentaron alrededor del 50% de plantas con espiga emergiendo en la segunda fecha de medición (Gráfico 14.b), representando el 22% de las poblaciones analizadas.
- ▣ Tardías: aquellas poblaciones que presentaron alrededor del 50% de plantas con espiga emergiendo en la tercera fecha de medición (Gráfico 14.c), representando el 37% de las poblaciones analizadas.

2. Número de macollos reproductivos

El número de macollos reproductivos promedio producido por planta fue de 135,48, aunque algunas plantas produjeron 15 y otras 370 macollos (Cuadro 9). Este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 10). La población 6 fue la que alcanzó el mayor número (187,56) mientras que la población 28 presentó el menor número (86,56) (Cuadro 10). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 37% logró entre 100 y 150 macollos reproductivos por planta (Gráfico 15).

3. Largo de espiga

La media para el largo de espiga por planta fue de 23,92cm, con un rango de 11,53 a 39,30cm (Cuadro 9). Este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 10). Las espigas de la población 28 fueron las mas largas (30,87 cm) mientras que las de la población 21 fueron las mas cortas (21,41 cm) (Cuadro 4). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 40% logró entre 20 y 24 cm de largo de espiga por planta (Gráfico 16).

4. Peso total de semillas

La media del peso total de semillas por planta fue de 21,83 g, con un rango que osciló entre 1,71 a 83,70 g (Cuadro 9). Este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las poblaciones (Cuadro 10). La población 21 fue la que evidenció el mayor peso (30,52 g) mientras que la población 17 presentó el menor peso total de semillas por planta (13,34 g) (Cuadro 10). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 39% logró entre 15 y 25 gramos de peso total de semilla por planta (Gráfico 17).

5. Peso de mil semillas

La media del peso de mil semillas por planta fue de 2,02 g, con un rango que osciló entre 0,15 a 5,4 g (Cuadro 9). Similarmente a todos los caracteres anteriores el peso de mil semillas por planta también presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre poblaciones (Cuadro 10). La población 28 fue la de mayor valor (2,98 g), mientras que la población 9 presentó el menor

peso de mil semillas por planta (1,58 g) (Cuadro 10). Del total de las plantas analizadas en todas las poblaciones el 43% logró entre 1,65 y 2,25 g de peso de mil semillas por planta (Gráfico 18).

4.1.3 Estimación de los componentes de la variancia

4.1.3.1. Grado de determinación genética (GDG), coeficiente de variación genética (CVg) y coeficiente de variación fenotípica (CVf)

Las estimaciones del GDG para los caracteres vegetativos en promedio para todas las poblaciones fue variable oscilando desde 0,012 hasta 0,891 según el carácter analizado (Cuadro 11). Dentro de los caracteres vegetativos, los de mayor GDG fueron: vigor de planta, ancho de hoja, hábito de crecimiento, peso de materia seca segundo corte, peso de materia seca primer corte; mientras que los de menor GDG fueron: altura de planta previo al segundo corte, número de macollos vegetativos, peso de materia seca total y peso de materia seca al tercer corte (Cuadro 11).

Cuadro 11. Variancia fenotípica (σ^2_f), variancia genética (σ^2_g), variancia ambiental (σ^2_e), grado de determinación genética (GDG), para los caracteres vegetativos de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide.

Variable	σ^2_f	σ^2_g	σ^2_e	GDG
Hábito de crecimiento	0,547	0,477	0,069	0,873
Vigor de planta	3,046	2,714	0,331	0,891
Ancho de hoja	3,236	2,882	0,354	0,891
Nº de macollos vegetativos	320,268	39,264	281,004	0,123
Altura de planta previo al segundo corte	12,171	0,143	12,028	0,012
Peso de materia seca primer corte	0,026	0,017	0,009	0,660
Peso de materia seca segundo corte	0,023	0,015	0,008	0,662
Peso de materia seca tercer corte	0,033	0,016	0,016	0,498
Peso de materia seca total	541,440	250,109	291,331	0,462

El comportamiento tanto del coeficiente de variación genética como fenotípica para los caracteres vegetativos, fue muy variable oscilando entre 0,028 a 0,922 y 0,112 a 0,976 respectivamente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Coeficiente de variación genética (CVg), coeficiente de variación fenotípica (CVf), para los caracteres vegetativos de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide.

Variable	CVg	CVf
Hábito de crecimiento	0,529	0,566
Vigor de planta	0,900	0,954
Ancho de hoja	0,922	0,976
Nº de macollos vegetativos	0,104	0,296
Altura de planta previo al segundo corte	0,028	0,262
Peso de materia seca primer corte	0,097	0,120
Peso de materia seca segundo corte	0,091	0,112
Peso de materia seca tercer corte	0,081	0,115
Peso de materia seca total	0,283	0,416

Con respecto a los caracteres reproductivos todos presentaron valores de GDG superiores a 0,5 siendo de mayor a menor: días a floración desde el transplante, peso de mil semillas, peso total de semillas, número de macollos reproductivos y largo de espiga (Cuadro 13).

Cuadro 13: Variancia fenotípica (σ^2f), variancia genética (σ^2g), variancia ambiental (σ^2e), grado de determinación genética (GDG), para los caracteres reproductivos de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide.

Variable	σ^2f	σ^2g	σ^2e	GDG
Días a floración desde el transplante	37,569	34,125	3,442	0,908
Número de macollos reproductivos	6005,948	3796,389	2209,559	0,632
Largo de espiga	49,324	27,691	21,632	0,561
Peso total de semilla	265,259	184,022	81,237	0,694
Peso de mil	1,266	1,018	0,248	0,804

El comportamiento tanto del coeficiente de variación genética como fenotípica para los caracteres reproductivos, fue variable oscilando entre 0,041 a 0,621 y 0,035 a 0,746 respectivamente (Cuadro 14).

Cuadro 14: Coeficiente de variación genética (CVg), coeficiente de variación fenotípica (CVf), para los caracteres reproductivos de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide.

Variable	CVg	CVf
Días a floración desde el transplante	0,041	0,035
Número de macollos reproductivos	0,455	0,572
Largo de espiga	0,220	0,294
Peso total de semilla	0,621	0,746
Peso de mil	0,498	0,556

4.1.4 Asociación entre caracteres

4.1.4.1 Correlaciones fenotípicas

En el análisis general se observó algunas correlaciones fenotípicas significativas (Cuadro 15).

- ❑ el número de macollos reproductivos por planta presentó una correlación negativa y significativa con la producción de materia seca al tercer corte por planta ($r=-0,307$; $p<0,05$)
- ❑ el peso total de semillas por planta presentó una correlación negativa y significativa con el peso de materia seca al tercer corte por planta ($r=-0,416$; $p<0,01$) y se correlacionó en forma positiva y significativa con el número de macollos reproductivos ($r=0,485$; $p<0,0001$).
- ❑ el largo de espiga presentó una correlación positiva y significativa con el peso de materia seca al segundo corte por planta ($r=0,152$; $p<0,01$) y significativa y negativa con el número de macollos reproductivos por planta ($r=-0,189$; $p<0,05$).
- ❑ el peso de mil semillas presentó correlación significativa y negativa con el número de macollos reproductivos ($r=-0,278$; $p<0,01$) y significativa y positiva con el largo de espiga ($r=0,466$; $p<0,01$).
- ❑ en cuanto a la producción de materia seca, el peso de materia seca al primer corte presentó una correlación positiva con el peso de materia al segundo corte ($r=0,487$; $p<0,0001$) y con el peso de materia seca total ($r=0,636$; $p<0,01$). El peso de materia seca al segundo corte tuvo una correlación positiva y significativa tanto con el peso de materia seca al tercer corte ($r=0,223$; $p<0,05$) como con el peso de materia seca total ($r=0,683$; $p<0,05$). Por último el peso de materia seca al tercer corte presentó una correlación positiva y significativa con el peso de materia seca total por planta ($r=0,606$; $p<0,0001$).

Cuadro 15: Coeficiente de correlación de Pearson, $H_0: r=0$ (para el número de observaciones). En la primera fila se observa el coeficiente de correlación y en la segunda fila el nivel de significancia.

	pms1	pms2	pms3	pmst	nesp	psem	lesp	pmil
pms1	1	0,487 ***	-0,270 NS	0,636 **	-0,010 NS	0,030 NS	0,130 NS	0,049 NS
pms2		1	0,223 *	0,683 *	0,092 NS	0,120 NS	0,152 **	0,278 NS
pms3			1	0,606 ***	-0,307 *	-0,416 **	-0,078 NS	-0,048 NS
pmst				1	-0,026 NS	-0,064 NS	0,132 NS	-0,054 NS
nesp					1	0,485 ***	-0,189 *	-0,278 **
psem						1	0,247 NS	0,241 NS
lesp							1	0,466 **
pmil								1

Referencias: **pms1**: peso de materia seca al primer corte; **pms2**: peso de materia seca al segundo corte; **pms3**: peso de materia seca al tercer corte; **pmst**: peso materia seca total; **nesp**: número de macollos reproductivos; **psem**: peso total de semillas; **lesp**: largo de espiga; **pmil**: peso de mil semillas. **NS** (no significativo); * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,0001$)

4.1.5 Análisis Multivariado

Al realizar el análisis de componentes principales, considerando las variables: peso de materia seca al primer corte, peso de materia seca al segundo corte, peso de materia seca al tercer corte, peso de materia seca total, número de macollos vegetativos, altura de planta previo al segundo corte, número de macollos reproductivos, peso total de semillas, largo de espiga, y peso de mil semillas, se observa que solo dos o tres autovalores producen una buena síntesis de los datos, dado que las dos primeras variables explican el 72,12% de la variación morfo-fisiológica total de las 32 poblaciones; mientras que si consideramos las tres primeras componentes explican el 82,5% de la variación (Cuadro 16). Al construir la componente principal 1 (Prin1) (Gráfico 19), la variable peso de materia seca total por planta fue la que explicó la mayor variabilidad (Cuadro 17). Las poblaciones 33 y 36 fueron las de mayor peso de materia seca total por planta y contrariamente las poblaciones 17, 16 y 11 las de menor peso (Cuadro 8). Al construir la segunda componente principal (Prin2) (Gráfico 19) la variable peso de semilla es la que explica la mayor variabilidad (Cuadro 17). Las poblaciones 21, 33 y 6 las que presentaron mayor peso de semilla por planta y contrariamente las poblaciones 17, 4 y 15 las que menor valor de peso de semillas por planta (Cuadro 10) y por ende menor valor en las ordenadas.

Cuadro 16: Autovalores de la matriz de correlación, proporción que explica cada autovalor y proporción acumulada.

Componente	Autovalor	Proporción	Acumulado
1	5,84439679	0,5844	0,5844
2	1,36803858	0,1368	0,7212
3	1,03741292	0,1037	0,8250
4	0,66016627	0,0660	0,8910
5	0,61722989	0,0617	0,9527
6	0,23798310	0,0238	0,9765
7	0,12978853	0,0130	0,9895
8	0,07368785	0,0074	0,9969
9	0,02960188	0,0030	0,9998
10	0,00169420	0,0002	1,0000

Cuadro 17: Autovectores (e) correspondientes a la CP1 (e1) y a la CP2 (e2) para las variables analizadas.

Variable	e1	e2
pms1	0,35	0,13
pms2	0,41	0,12
pms3	0,30	0,18
pmst	0,51	0,23
nesp	-0,30	0,48
psem	0,09	0,52
lesp	0,34	-0,33
pmil	0,37	-0,18
nmac	0,03	0,47
hreb2	0,04	-0,13

Referencias: **pms1**: peso de materia seca al primer corte; **pms2**: peso de materia seca al segundo corte; **pms3**: peso de materia seca al tercer corte; **pmst**: peso materia seca total; **nesp**: número de macollos reproductivos; **psem**: peso total de semillas; **lesp**: largo de espiga; **pmil**: peso de mil semillas

Por otro lado se realizó el análisis jerarquizado mediante el método Ward, para las 32 poblaciones discriminadas por las variables peso de materia seca total por planta, número de macollos reproductivos por planta y peso de semillas por planta. Al 25% de la distancia planteada (1,98) se forman ocho subgrupos o clusters dentro de los cuales las poblaciones que los conforman cuentan con perfiles morfo-fisiológicos con mayor grado de similaridad para estas tres variables (Gráfico 20). Los subgrupos quedaron conformados de la siguiente manera:

1. 21, 6;
2. 22, 16, 11, 32, 26, 19, 5;

3. 36, 33;
4. 20, 14, 18, 25, 10, 34, 3;
5. 35, 13, 37, 29, 12;
6. 27, 28, 4;
7. 17;
8. 31, 15, 9, 30, 2;

De otro modo si utilizamos como distancia arbitraria el 50% de la distancia planteada (3,97), se observó la formación de dos subgrupos:

1. 21, 6, 22, 16, 11, 32, 26, 19, 5, 36, 33, 20, 14, 18, 25, 10, 34, 3;
2. 35, 13, 37, 29, 12, 27, 28, 4, 17, 31, 15, 9, 30, 2;

Gráfico 4: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter hábito de crecimiento de las 32 poblaciones evaluadas (1=postrado; 2=semipostrado; 3=semierecto; 4=erecto).

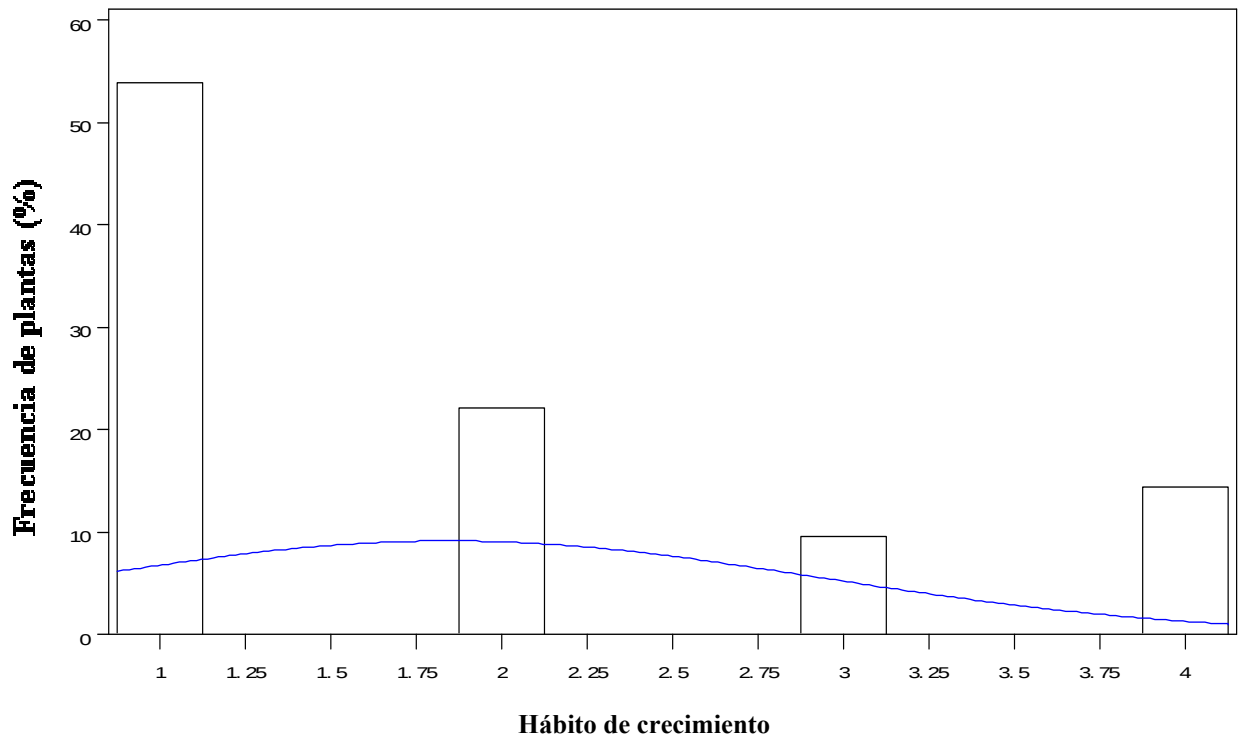


Gráfico 5: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter vigor de planta de las 32 poblaciones evaluadas (1=regular; 2=bueno; 3=muy bueno).

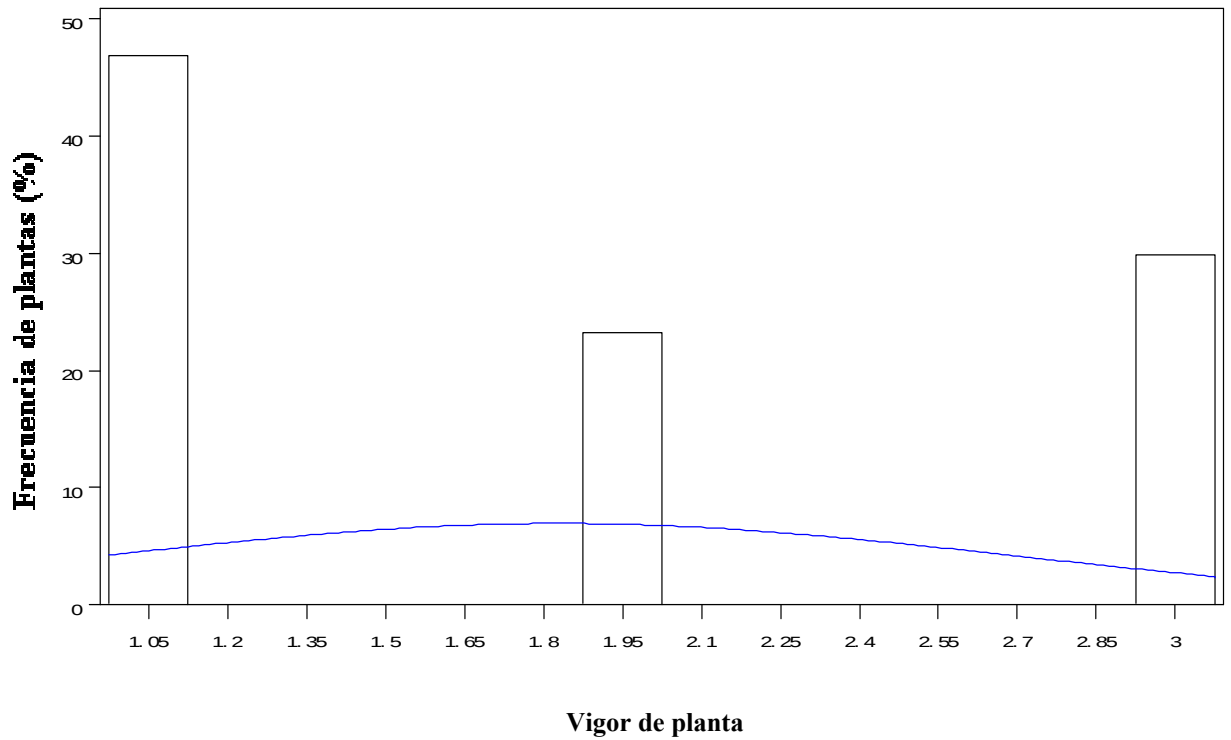


Gráfico 6: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter ancho de hoja de las 32 poblaciones evaluadas (1=angosta; 2=intermedia; 3=ancha).

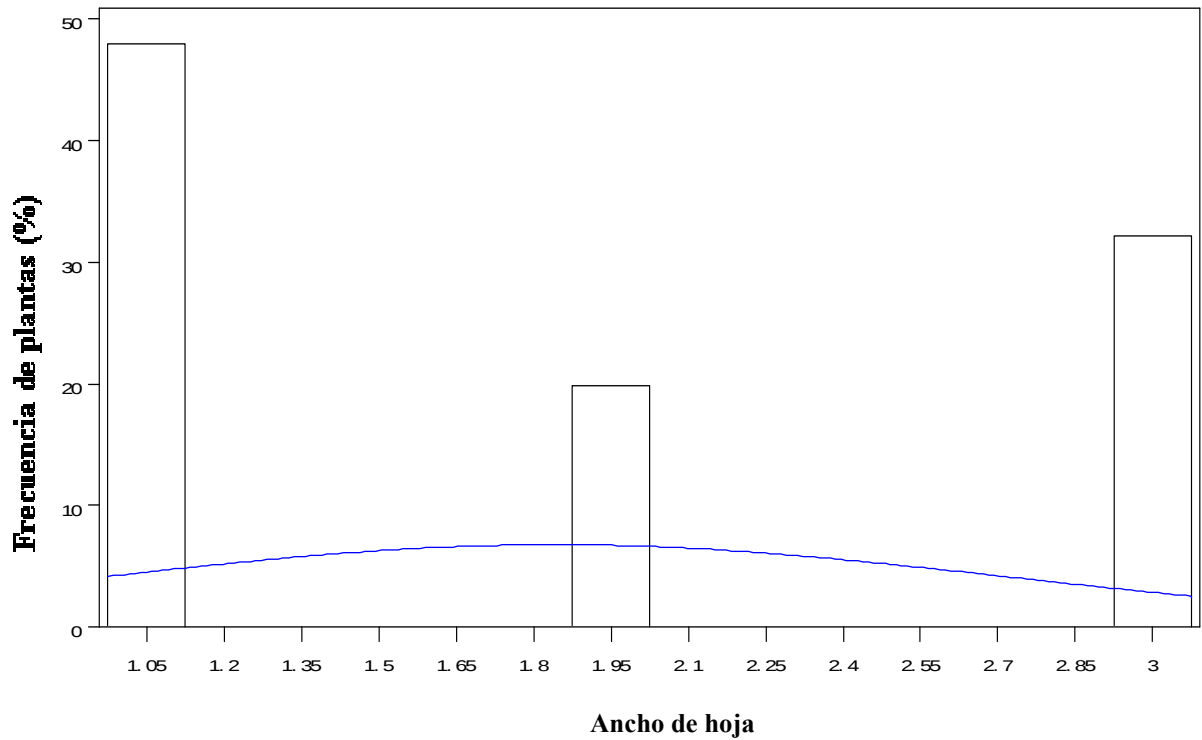


Gráfico 7: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter número de macollos vegetativos de las 32 poblaciones evaluadas.

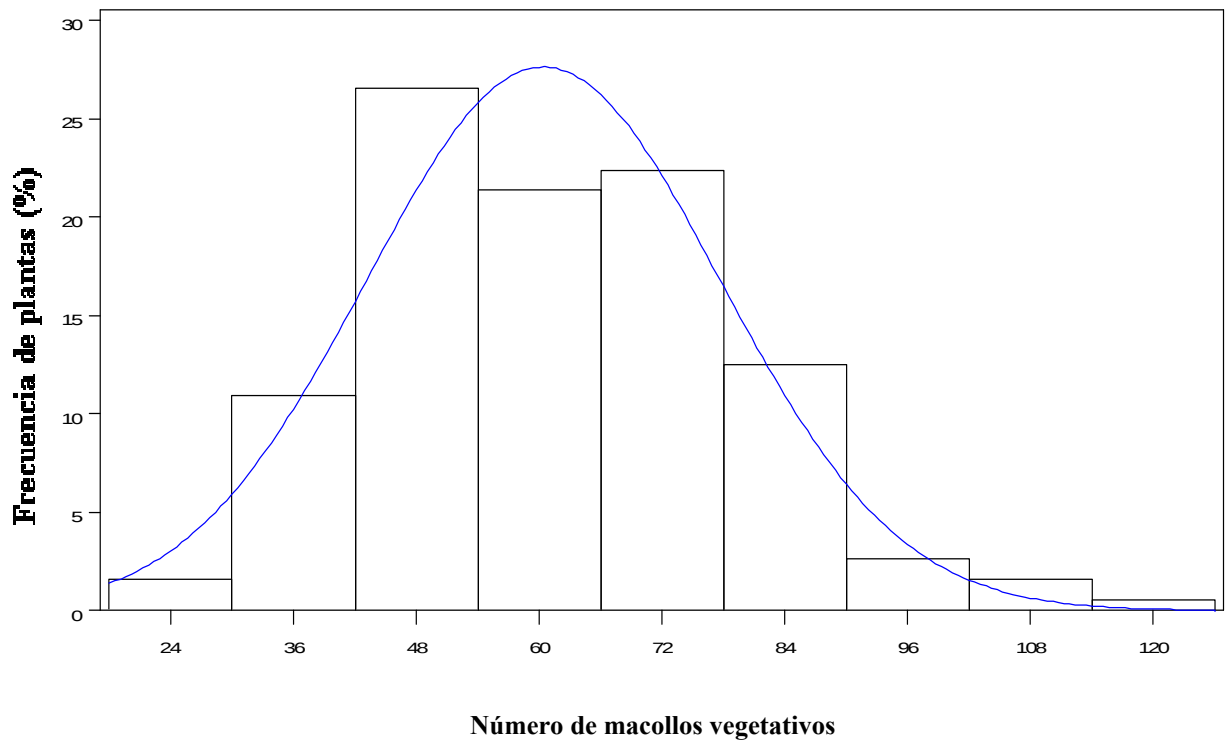


Gráfico 8: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter altura de planta previo al segundo corte en cm, de las 32 poblaciones evaluadas.

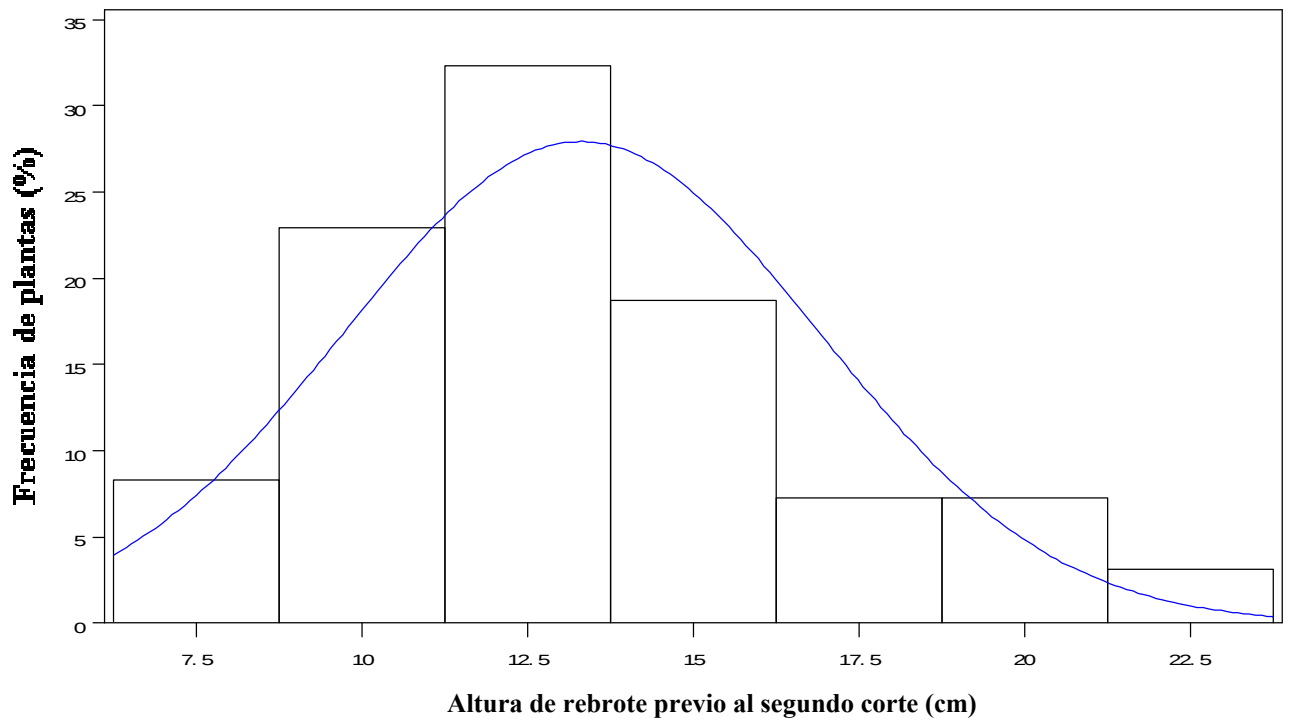


Gráfico 9: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter peso de materia seca al primer corte en gramos, para las 32 poblaciones evaluadas.

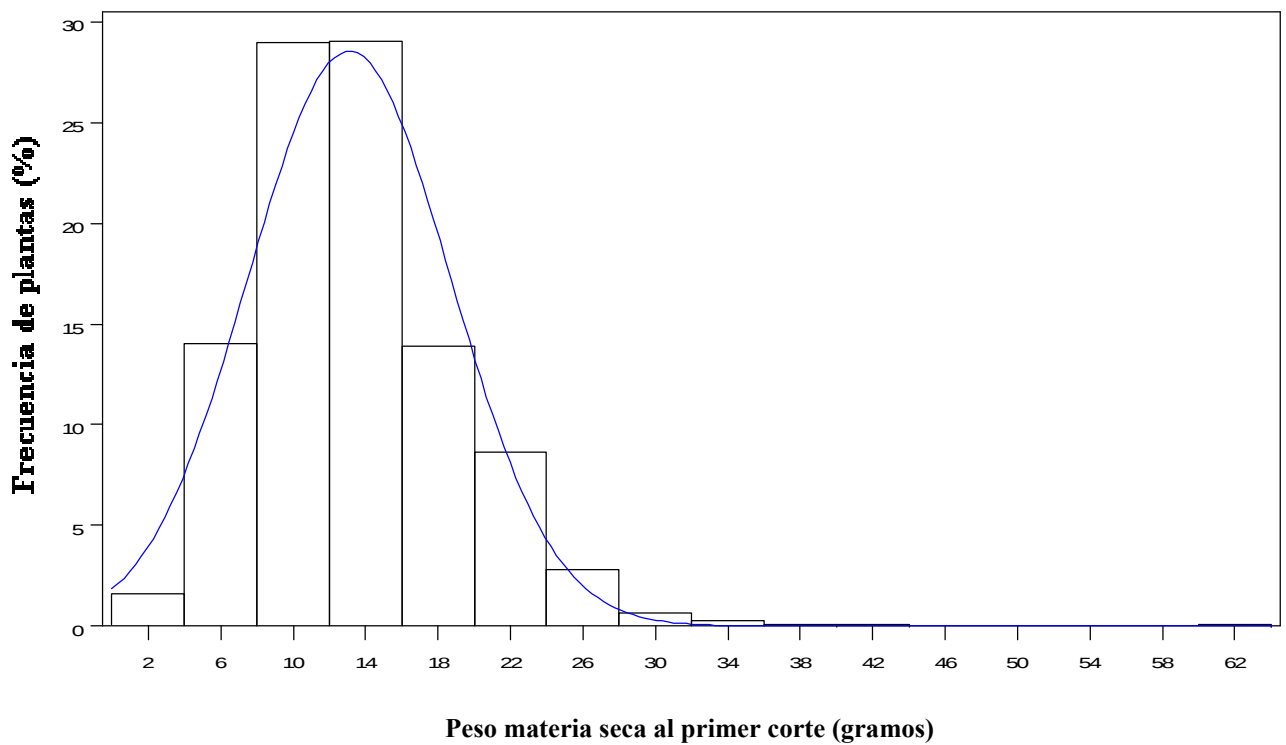


Gráfico 10: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter peso de materia seca al segundo corte en gramos, para las 32 poblaciones evaluadas.

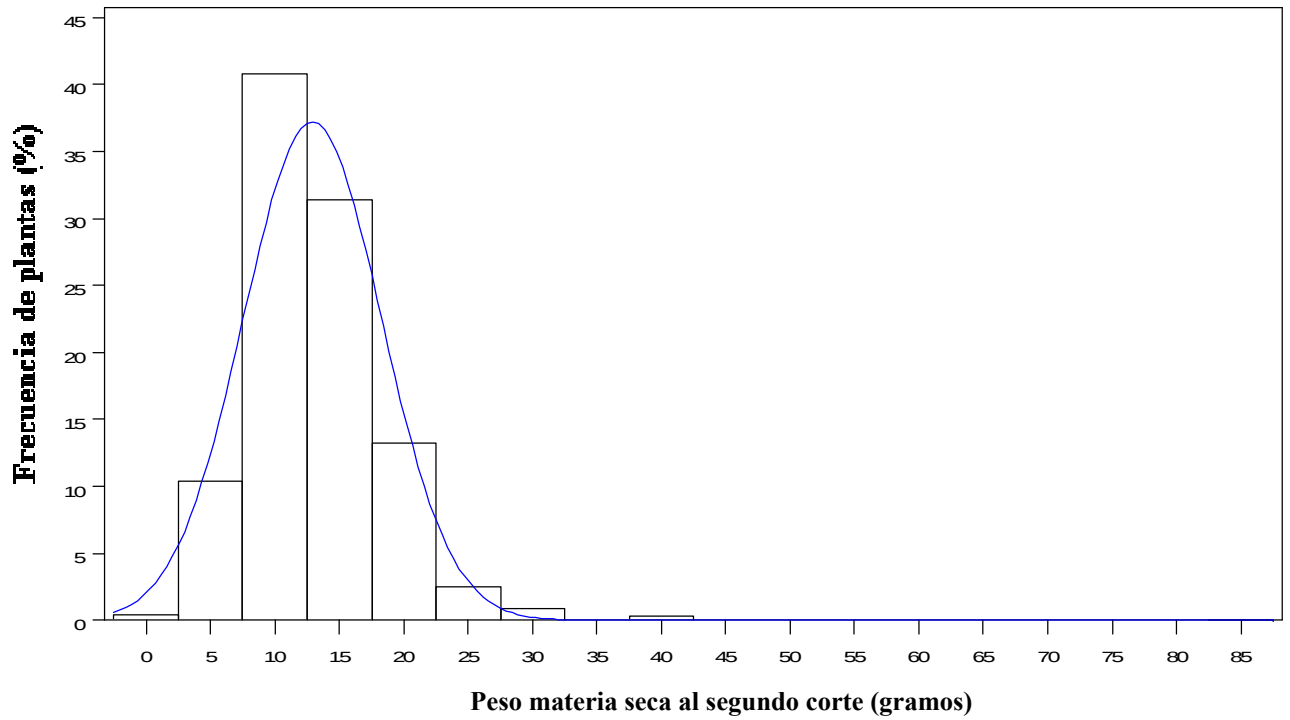


Gráfico 11: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter peso de materia seca al tercer corte en gramos, para las 32 poblaciones evaluadas.

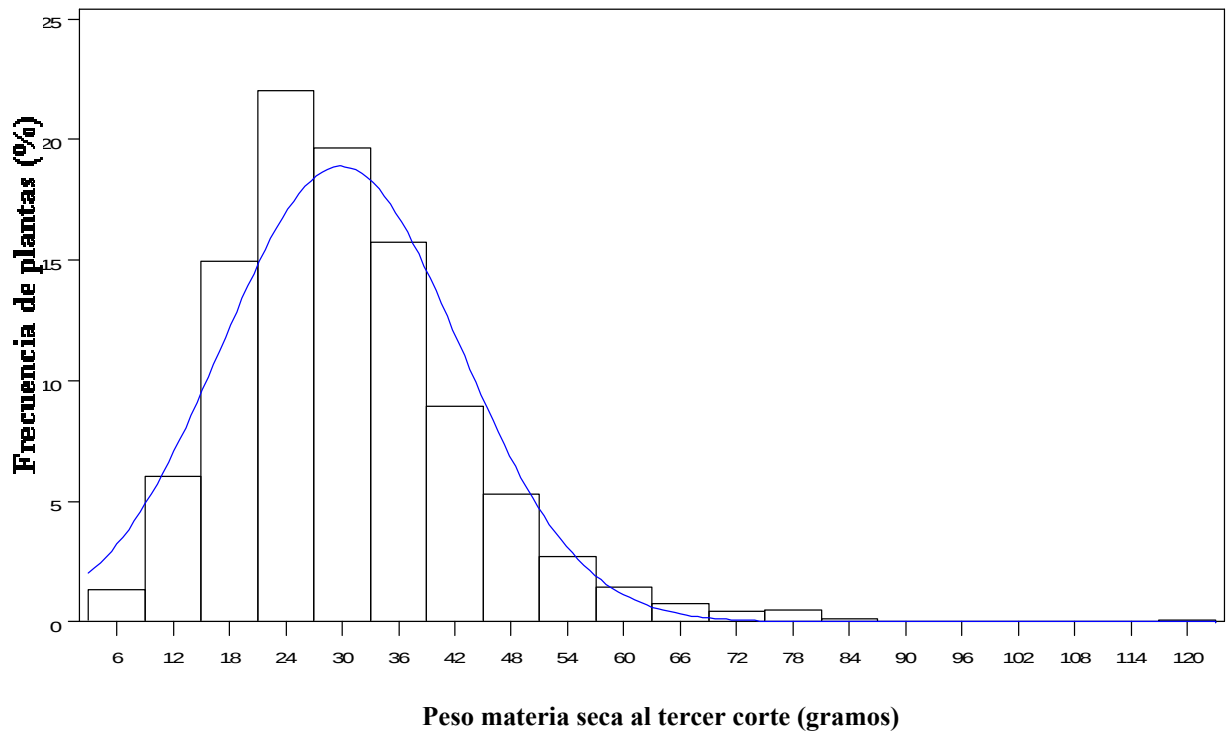


Gráfico 12: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter peso de materia seca total en gramos, para las 32 poblaciones evaluadas.

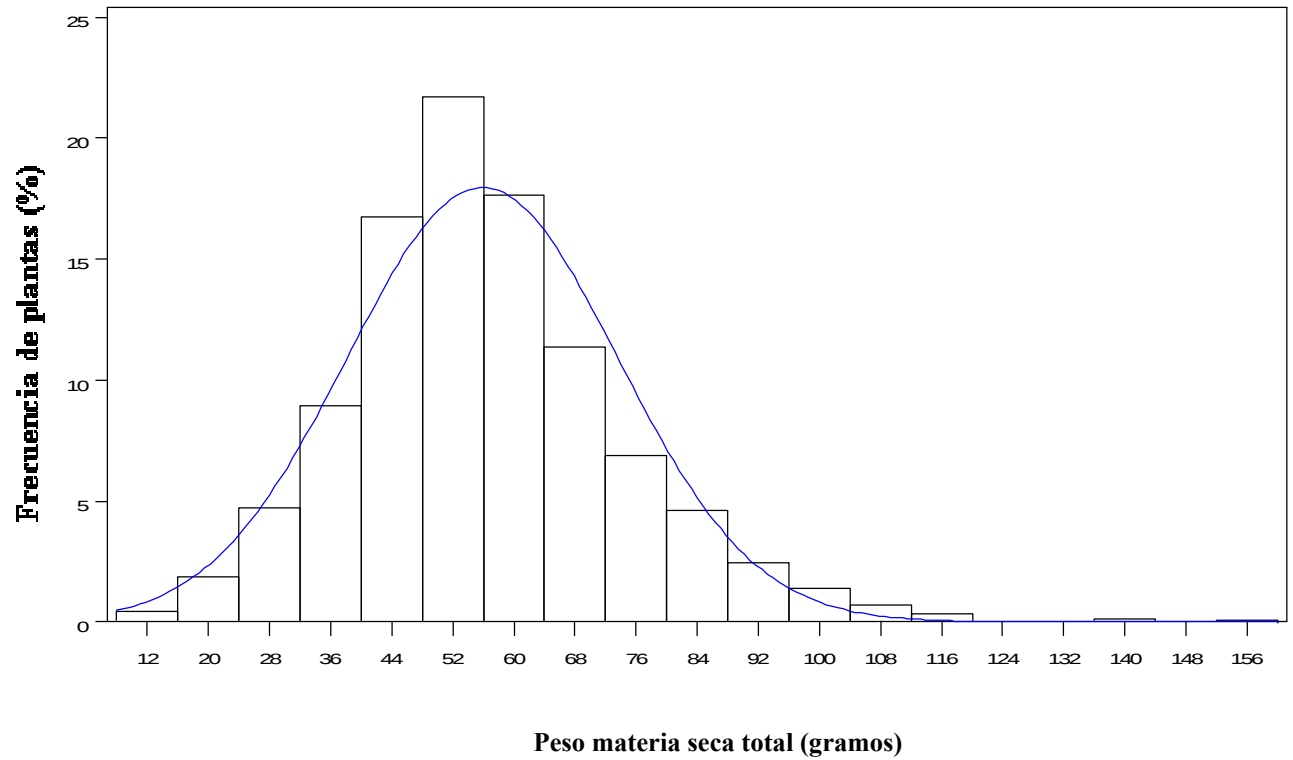


Gráfico 13: Porcentaje de plantas afectadas por roya para las tres fechas donde se realizaron las mediciones, para las 32 poblaciones evaluadas.

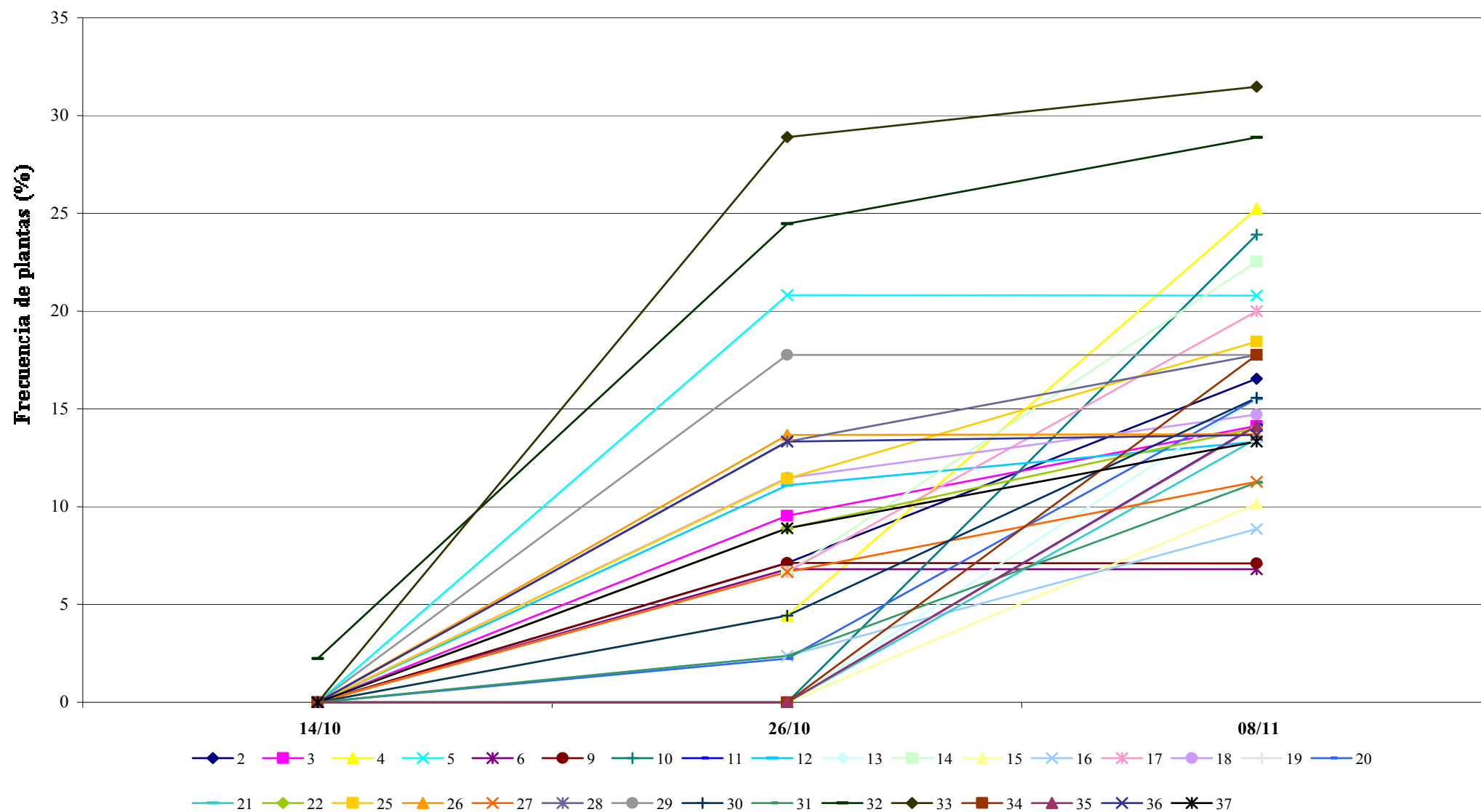


Gráfico 14: Porcentaje de plantas florecidas (%) en cada fecha de medición: 14/10, 21/10, 26/10, 02/11, 08/11, para las 32 poblaciones evaluadas. a: poblaciones precoces, b: poblaciones intermedias, c: poblaciones tardías.

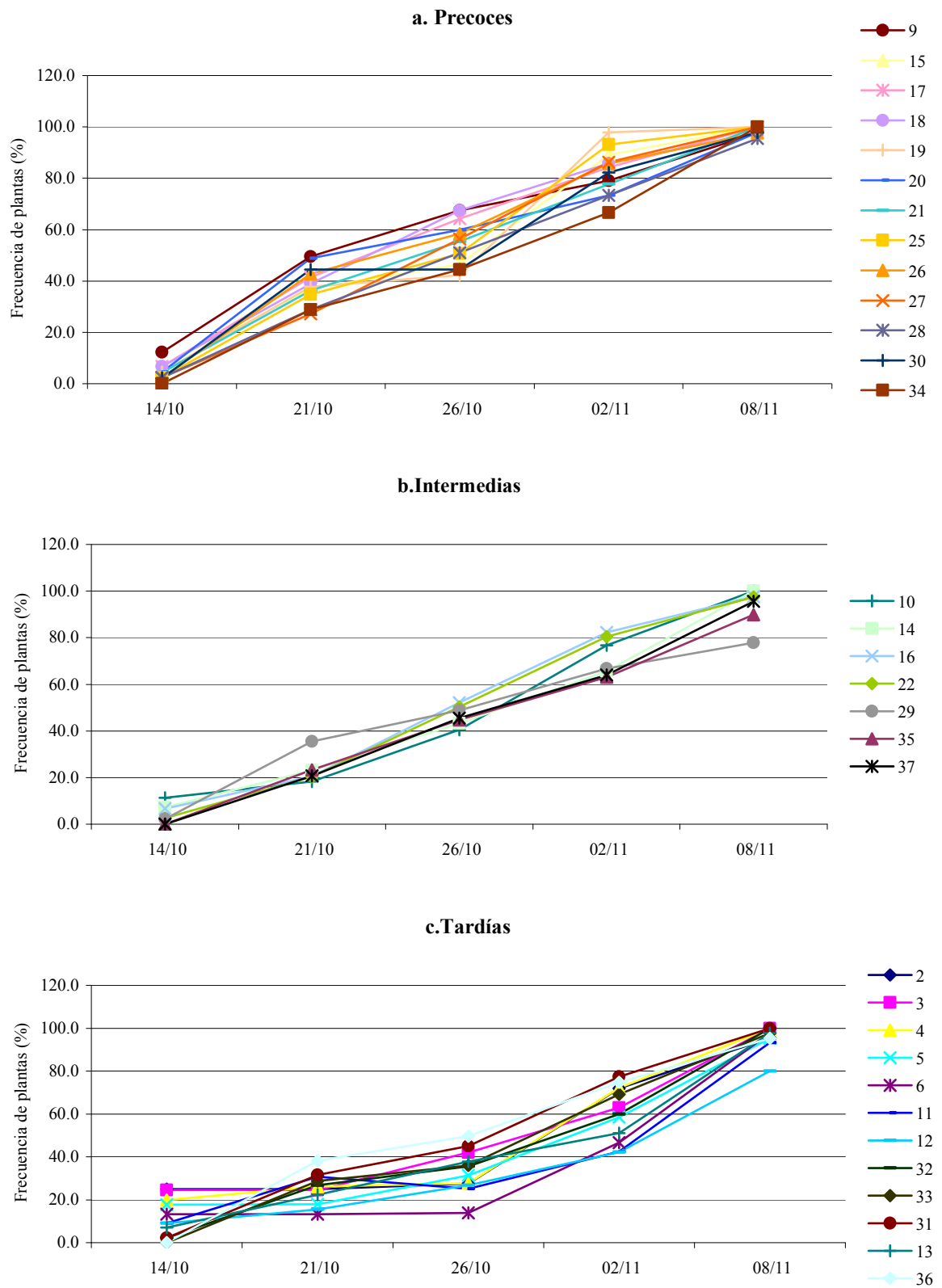


Gráfico 15: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter número de macollos reproductivos, para las 32 poblaciones evaluadas

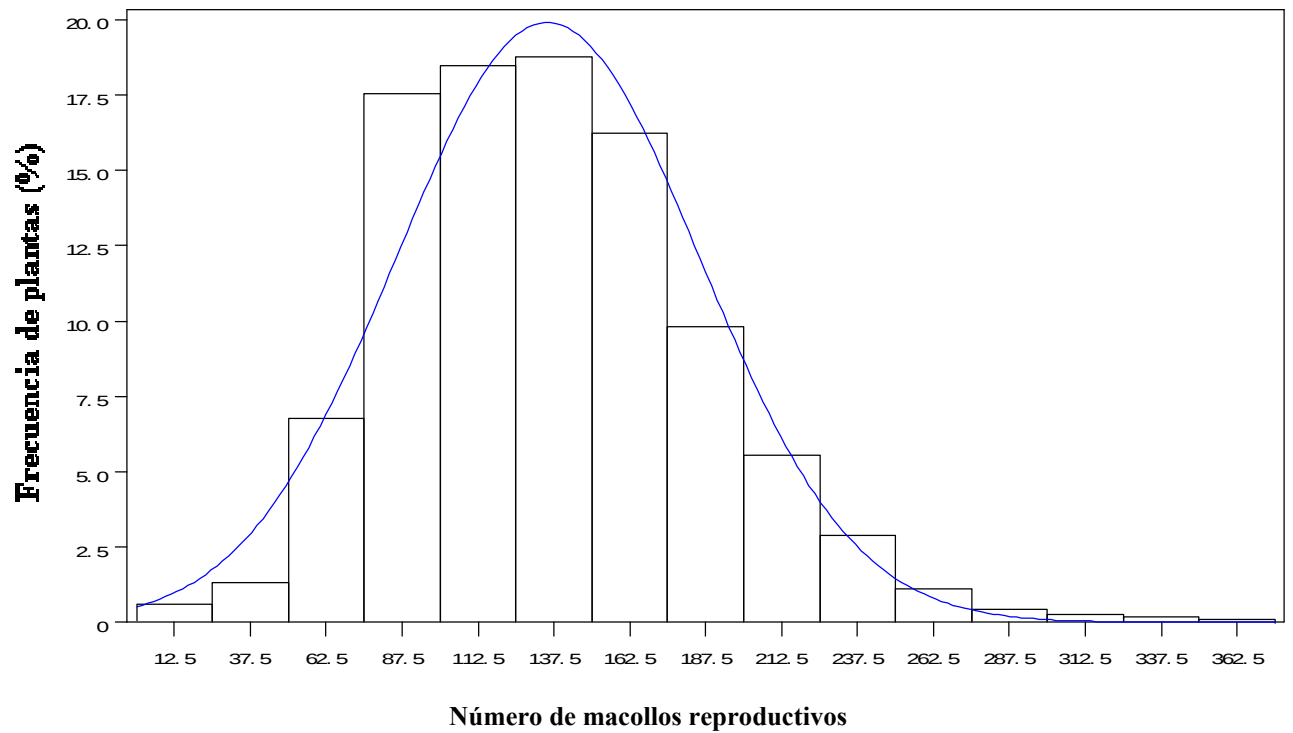


Gráfico 16: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el caracter largo de espiga en cm, para las 32 poblaciones evaluadas

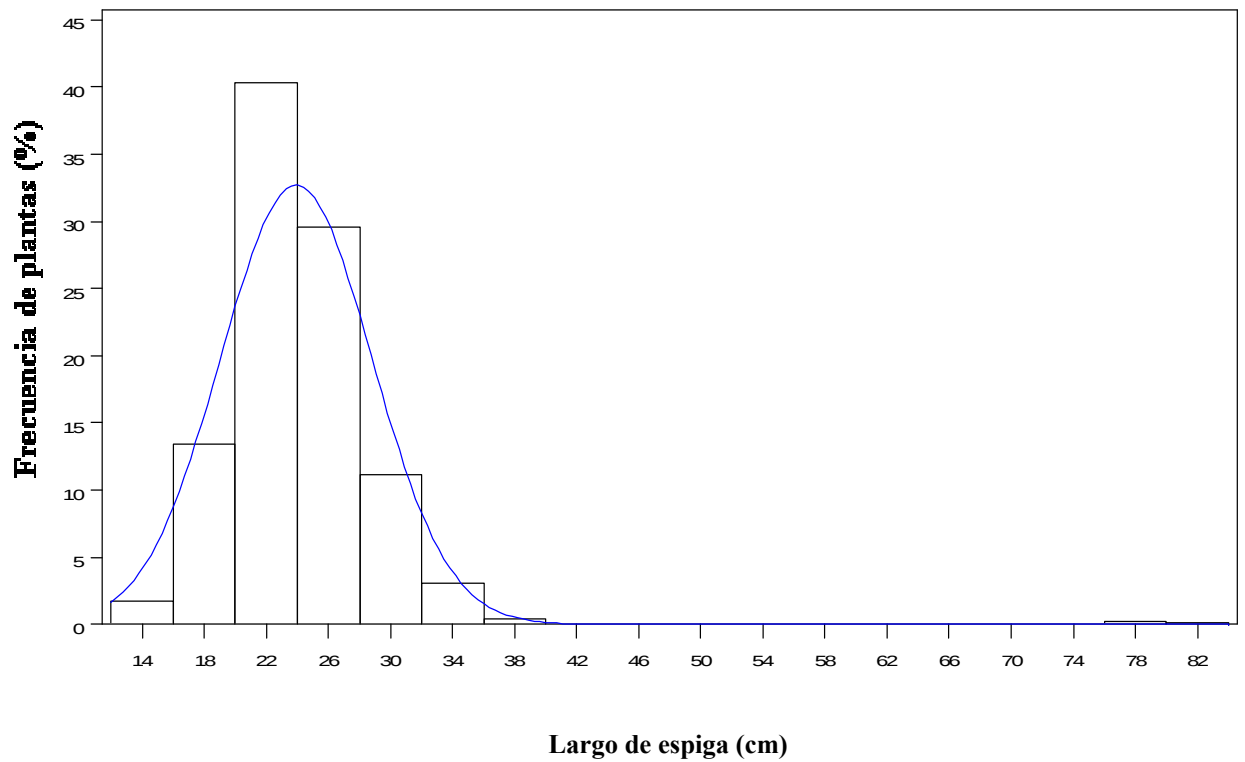


Gráfico 17: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el peso total de semillas en gramos, para las 32 poblaciones evaluadas

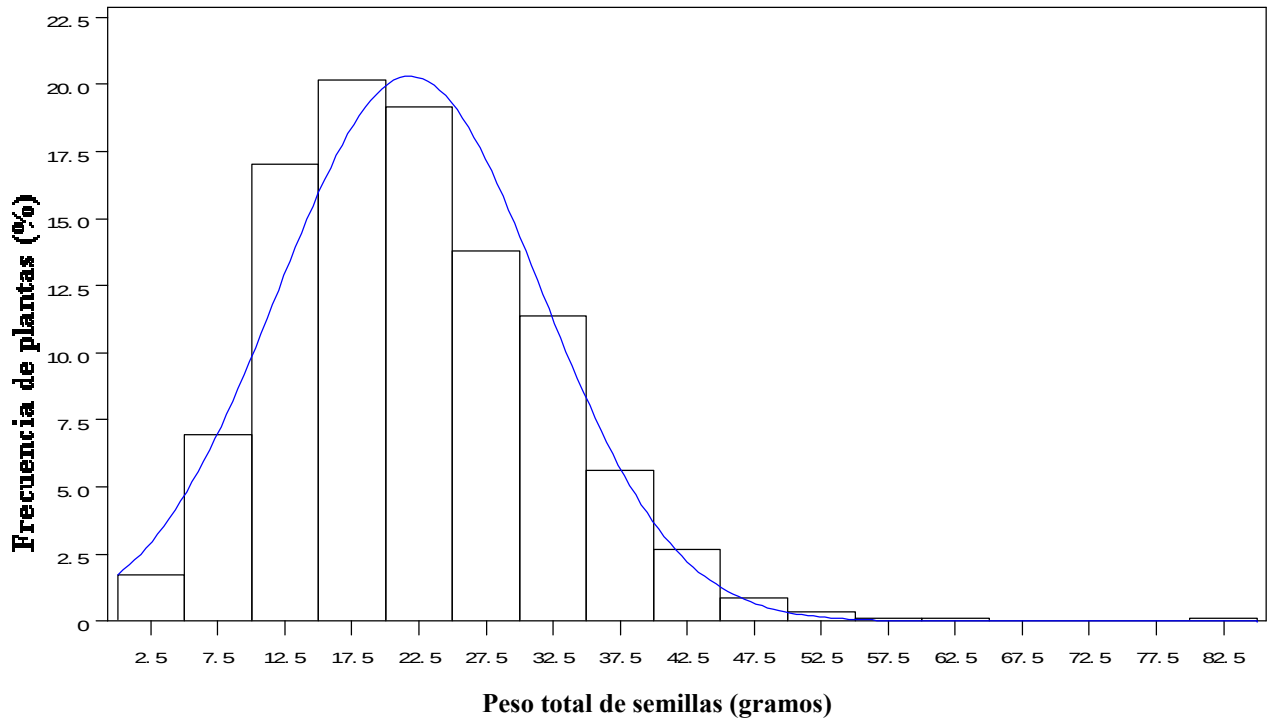


Gráfico 18: Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el peso de mil semillas en gramos, para las 32 poblaciones evaluadas

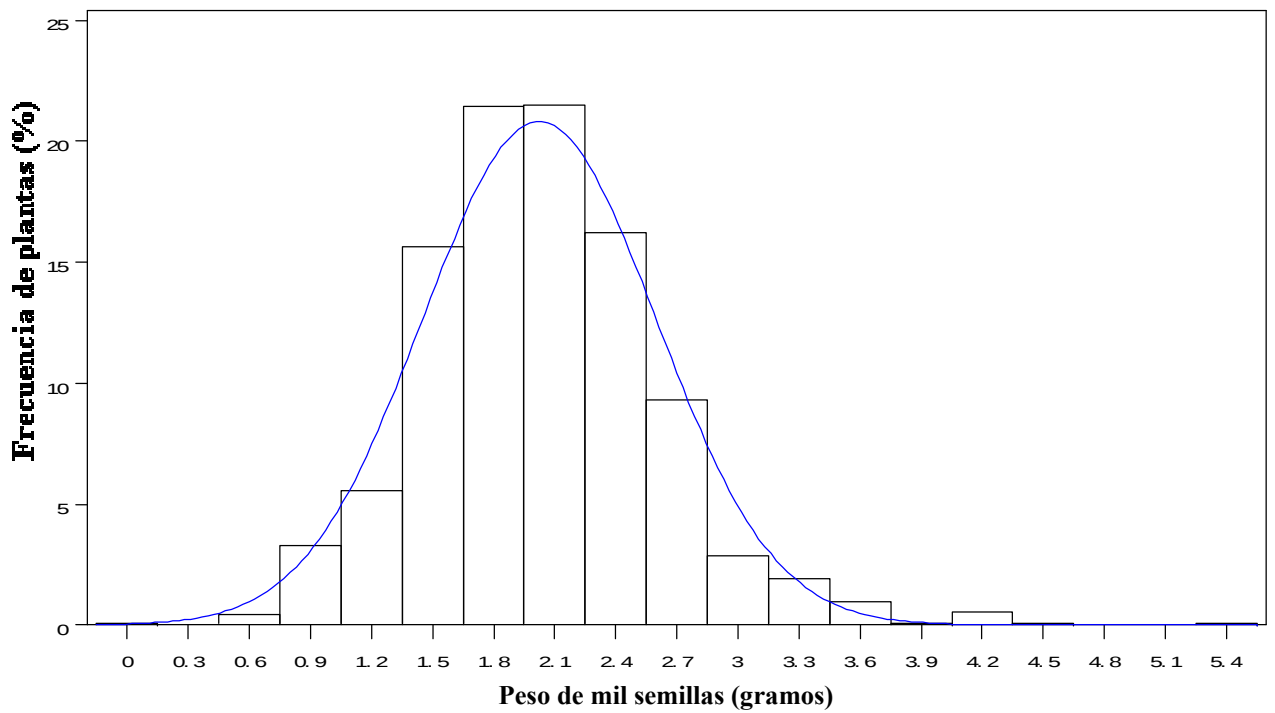


Gráfico 19: Análisis de componentes principales (Prin1, Prin2), para las 10 variables analizadas y las 32 poblaciones en estudio.

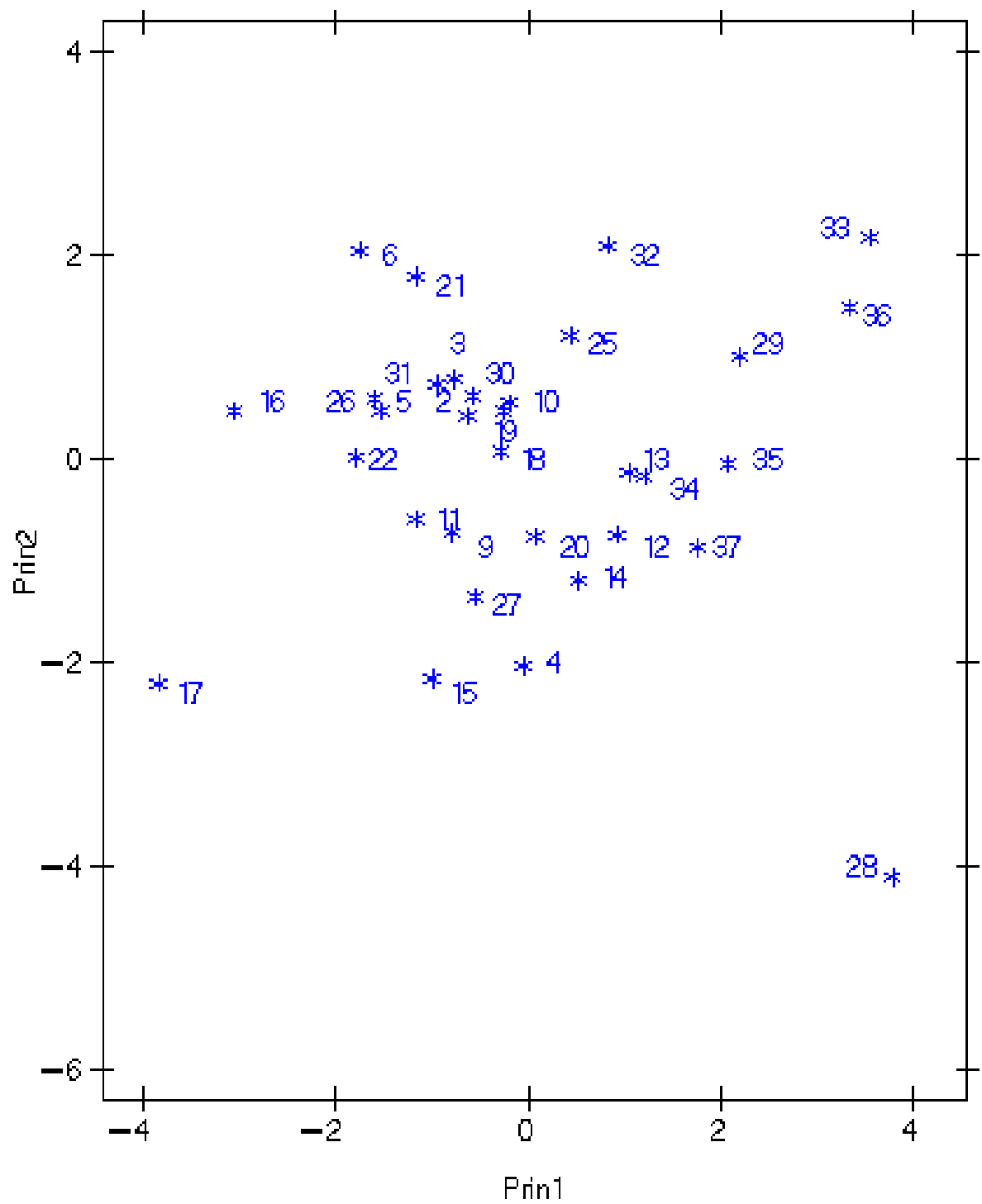
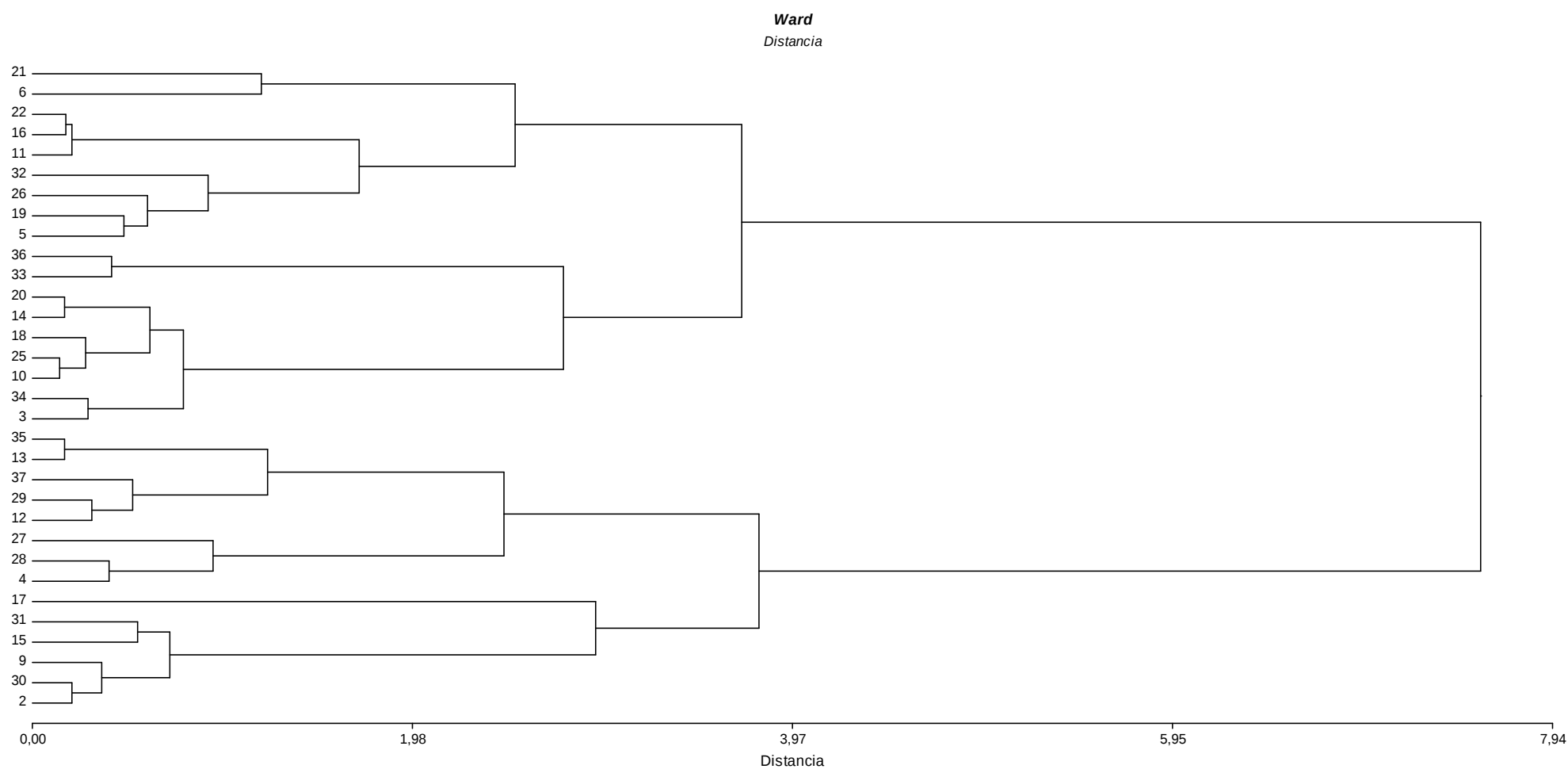


Gráfico 20: Análisis cluster mediante el método de Ward para las 32 poblaciones en estudio considerando las variables peso de materia seca total por planta, número de macollos reproductivos por planta y peso de semillas por planta.



4.2 Caracterización Molecular

4.2.1 Extracción y cuantificación de ADN

El protocolo empleado con las modificaciones ya mencionadas para la extracción de ADN, permitió lograr ADN en cantidad y calidad suficiente para generar los productos de amplificación definidos y reproducibles. En la foto 2 a modo de ejemplo se aprecia la cuantificación de ADN obtenida mediante gel de agarosa con bromuro de etidio. Los valores que se obtuvieron oscilaron entre 80-150 ng/ μ l.

4.2.2 Amplificación del ADN

La puesta a punto se logro utilizando 10 individuos por población, de las modificaciones que se iban realizando se observó que a medida que la temperatura de hibridación disminuyó los productos de amplificación o “bandas” fueron más inespecíficos formándose bandas espurias, y a medida que la temperatura de hibridación se incremento los productos de amplificación fueron más específicos pero menos nítidos. De igual manera cuando se decremento la concentración de Cl_2Mg los productos de amplificación fueron menos nítidos y cuando la concentración se incremento los fueron más inespecíficos formándose bandas espurias. El mismo efecto se observó cuando se incremento la cantidad de primer o Taq polimerasa, observándose menor nitidez en los productos de amplificación y la formación de bandas espurias, como así también cuando se disminuyo la cantidad de primer o Taq polimerasa se observó una menor nitidez en las bandas obtenidas. De esta manera las reacciones de amplificación más nítidas se obtuvieron con una temperatura de

hibridación de 50°C o 55°C de acuerdo el SSR, 1,5mM de Cl_2Mg , 0,92 μM de primer y 0,75 U/ μl de Taq polimerasa.

4.2.3 Productos Amplificados

Se lograron amplificar cuatro de los diez microsatélites (SSR) públicos que se probaron, todos los SSR amplificados fueron polimórficos. La cantidad de alelos observados se muestra en el cuadro 18, en total fueron 25 alelos en las siete poblaciones con los cuatro SSR utilizados con un rango de 3 a 9 alelos por SSR (Fotos 3, 4, 5 y 6). El SSR LPH01H06 fue el que presentó un mayor número de alelos: nueve (9), mientras que el SSR LPH01D09 fue el que presentó un menor número de alelos: tres (3). El SSR LPH01A07 fue el de menor peso molecular varió entre 59-74 pares de bases (pb) y el SSR LPH01D09 fue el mayor tamaño 260-303 pb, (Cuadro18).

Cuadro 18: Microsatélite (SSR), número (Nº) de alelos, tamaño en pares de bases (pb).

SSR	Nº Alelos	Tamaño (pb)
LPH01A07	6	59-74
LPH01D09	3	260-303
LPH01H06	9	167-183
LPK01A03	7	234-268

4.2.4 Cuantificación de la variabilidad genética

La descripción estadística para los productos de amplificación generados por todos los SSR en las poblaciones analizadas se observa en el cuadro 19. La media del número efectivo de alelos por SSR fue de 2,415 con un rango desde 2,073 (población 25) a 2,864 (población 28). La

frecuencia media de alelos para todos los locus por población ($\overline{p_i}$) presentó un promedio de 0,273, variando desde 0,211 (población 28) a 0,364 (población 27). La heterocigosis observada (H_o) presentó gran variabilidad, con promedio de 0,421 y un rango desde 0,263 (población 29) a 0,638 (población 28). Mientras que la heterocigosis esperada (H_e) presentó una media de 0,545 con un mínimo de 0,453 (población 25) y un máximo de 0,601 (población 26).

Cuadro 19: Estadística descriptiva para todos los microsatélites (SSR), muestra por población (N), número de alelos efectivos por locus (N_e), frecuencia media de alelos para todos los locus por población ($\overline{p_i}$), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e).

Población	N	N_e	$\overline{p_i}$	H_o	H_e
25	20	2,073	0,286	0,350	0,453
26	20	2,703	0,286	0,488	0,601
27	20	2,177	0,364	0,513	0,535
28	20	2,864	0,211	0,638	0,599
29	20	2,418	0,267	0,263	0,563
30	20	2,326	0,250	0,313	0,536
10	20	2,347	0,250	0,388	0,525
Promedio	20	2,415	0,273	0,421	0,545

Mediante el contenido de información polimórfica PIC se cuantificó el poder discriminatorio de los SSR analizados, variando de 0,437 a 0,653 mientras que a lo largo de las poblaciones varió de 0,453 a 0,601 (equivalente a la H_e) (Cuadro 20). Los mayores PIC fueron 0,618 y 0,653 para LPH01A07 y LPH01H06 respectivamente y los menores PIC de 0,437 y 0,470 para LPH01D09 y LPH01A03 respectivamente (Cuadro 20).

Cuadro 20: Contenido de información polimórfica (PIC) en las poblaciones y microsatélites analizados

Población	LPH01A07	LPH01D09	LPH01H06	LPK01A03	He
25	0,715	0,265	0,431	0,399	0,453
26	0,579	0,585	0,755	0,486	0,601
27	0,555	0,579	0,566	0,439	0,535
28	0,609	0,455	0,796	0,536	0,599
29	0,541	0,574	0,705	0,431	0,563
30	0,674	0,339	0,634	0,499	0,537
10	0,651	0,265	0,684	0,500	0,525
PIC	0,618	0,437	0,653	0,470	0,545

La heterocigocidad de cada población para todos los SSR se interpretó de los datos presentes en el Cuadro 21.

- Para el locus LPH01A07, todas las poblaciones mostraron un Fis positivo, cuyos valores van desde 0,261 a 0,908, este SSR fue el que presentó el mayor valor promedio de Fis 0,618; también fue el que presentó el mayor valor de Fit 0,643, mientras que el Fst fue de 0,065 y el Nm promedio fue de 3,578.
- Para el locus LPH01D09, cuatro de las siete poblaciones dieron valores negativos de Fis los cuales fueron desde -0,132 a -0,538, esto se vio reflejado en el valor promedio de Fis -0,045, presentando un valor de Fit de 0,123, un valor de Fst de 0,161 y un Nm de 1,303.
- Para el locus LPH01H06, solo se observó una población con un valor negativo de Fis -0,068 (población 28), mientras que las demás poblaciones para ese locus presentaron un valor positivo de Fis, con un valor máximo de 0,921 y un valor mínimo de 0,188. Con respecto al Fis fue de 0,486, el Fit de 0,544 y un Nm de 1,951.
- Para el locus LPK01A03 todas las poblaciones presentaron valores negativos de Fis, desde -0,026 (población 28) a -1 (población 10), presentando un Fis promedio de -0,398, un Fit de -0,350 y un Fst de 0,034, para el Nm el valor fue el mayor de todos los SSR 7,011.

Cuadro 21: Estadísticos de Wright. Deficiencia de heterocigosis (valor +) o exceso de heterocigosis (valor -), los valores dentro de cada población por SSR corresponde al Fis. El valor que se observa al final de cada columna corresponde al Fis promedio por SSR dentro de poblaciones, entre poblaciones (Fit), el índice de fijación (Fst) y el número de migrantes (Nm).

Población	LPH01A07	LPH01D09	LPH01H06	LPK01A03	Promedio
25	0,720	-0,132	0,188	-0,379	0,099
26	0,741	-0,197	0,536	-0,542	0,135
27	0,279	-0,296	0,382	-0,254	0,028
28	0,261	-0,538	-0,068	-0,026	-0,093
29	0,908	0,390	0,858	-0,275	0,470
30	0,629	0,114	0,921	-0,303	0,340
10	0,770	0,623	0,561	-1,000	0,238
Fis	0,618	-0,045	0,486	-0,398	0,165
Fit	0,643	0,123	0,544	-0,350	0,240
Fst	0,065	0,161	0,114	0,034	0,094
Nm	3,578	1,303	1,951	7,011	2,422

4.2.5 Descripción de alelos

De los 25 alelos que se encontraron los de mayor frecuencia alélica ($p_i \geq 0,8$) se observaron para el SSR LPH01D09 en las poblaciones 25, 30 y 10 (Cuadro 22). En cuanto a los alelos compartidos siete estuvieron presente en todas las poblaciones es decir el 28% de los alelos encontrados, de estos la mayor frecuencia alélica promedio ($\hat{p}_i = 0,436$) la presentó el alelo de 245pb del SSR LPK01A03 (Cuadro 23). Simultáneamente todos los SSR presentaron alelos raros ($p_i \leq 0,05$) y para seis de las siete poblaciones (25, 26, 28, 29, 30, 10) la mayoría con una frecuencia alélicas de 0,025 y 0,05, la población 27 no presentó alelos raros para ninguno de los cuatro SSR (Cuadro 22). El SSR LPH01A07 presentó tres alelos raros: 59pb, 66pb y 71pb en las poblaciones 25, 29, 20 y 10. El SSR LPH01D09 presentó dos alelos raros: 260pb y 303pb en las poblaciones 25

y 10. El SSR LPH01H06 presentó 12 alelos raros en las poblaciones 25, 26, 28, 29 y 30. Por último el SSR LPK01A03 presentó 7 alelos raros en las poblaciones 26, 28 y 30.

Cuadro 22: Frecuencia alélica (p_i) para todos los alelos (peso molecular en pb) de todas las poblaciones, n° de alelos por población: en rojo las mayores p_i , en azul los alelos raro ($p_i \leq 0,05$), en negrita todas las $p_i \neq 0$.

SSR	Alelo (pb)	Poblaciones						
		25	26	27	28	29	30	10
LPH01A07	59	0,150	0,200	0,000	0,000	0,050	0,175	0,025
	66	0,000	0,000	0,150	0,000	0,000	0,025	0,025
	67	0,400	0,225	0,250	0,525	0,425	0,300	0,475
	68	0,300	0,575	0,600	0,275	0,525	0,450	0,325
	71	0,050	0,000	0,000	0,200	0,000	0,050	0,025
	74	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125
LPH01D09	260	0,050	0,450	0,200	0,650	0,375	0,075	0,100
	275	0,850	0,450	0,575	0,350	0,525	0,800	0,850
	303	0,100	0,100	0,225	0,000	0,100	0,125	0,050
LPH01H06	167	0,725	0,275	0,450	0,300	0,275	0,475	0,475
	168	0,050	0,275	0,000	0,150	0,375	0,350	0,100
	169	0,000	0,050	0,075	0,275	0,275	0,000	0,250
	170	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,050	0,000
	172	0,200	0,275	0,475	0,075	0,025	0,000	0,125
	174	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000
	179	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000
	181	0,000	0,000	0,000	0,025	0,050	0,125	0,000
	183	0,025	0,125	0,000	0,075	0,000	0,000	0,050
LPK01A03	234	0,275	0,350	0,325	0,175	0,200	0,275	0,500
	238	0,000	0,000	0,000	0,050	0,050	0,000	0,000
	243	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000
	245	0,725	0,625	0,675	0,650	0,725	0,650	0,500
	252	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000
	261	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000
	268	0,000	0,025	0,000	0,075	0,000	0,050	0,000
N° de alelos por población		14	14	11	19	15	16	16

Cuadro 23: Alelos compartidos presentes en todas las poblaciones, tamaño en pares de bases (pb), frecuencia alélica promedio ($\hat{p}_i = \sum p_i / n^\circ$ de poblaciones).

SSR	Tamaño (pb)	$\hat{p}_i$
LPH01A07	67	0,371
	68	0,436
LPH01D09	260	0,271
	275	0,629
LPH01H06	167	0,425
LPK01A03	234	0,300
	245	0,650

Los SSR LPH01H06 y LPK01A03 presentaron alelos privativos los que se encontraron en tres de las siete poblaciones, la población 28 fue la que presentó la mayor cantidad de estos alelos, todos los alelos privativos tuvieron una frecuencia alélica menor o igual a 0,05 (Cuadro 24).

Cuadro 24: Alelos privativos de las poblaciones, tamaño en pares de bases (pb) y frecuencia alélica (p_i).

Población	SSR	Alelo (pb)	p_i
28	LPH01H06	174 pb	0,050
28	LPH01H06	179 pb	0,025
28	LPK01A03	243 pb	0,050
29	LPK01A03	252 pb	0,025
30	LPK01A03	261 pb	0,025

4.2.6 Análisis de la variancia (AMOVA)

A partir de los alelos presentes en cada SSR analizado se determinó el grado de diferenciación genética entre poblaciones mediante del análisis de variancia (Cuadro 25), del cual se evidenció que del total de la variación genética el 12% se debe a la variación entre poblaciones, es

decir las poblaciones se diferencian en un 12% con una significancia de $p=0,001$; el resto de la variación (88%) se debe a la variación entre individuos.

Cuadro 25: Análisis de la variancia molecular entre y dentro de las siete poblaciones. G.L: grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Var est: variancia estimada.

Fuente	G.L.	SC	CM	Var Est	Var Est (%)	Probabilidad
Entre Poblaciones	6	63,700	10,617	0,390	12	0,001
Dentro de Poblaciones	133	373,850	2,811	2,811	88	
Total	139	437,550		3,201	100	

El análisis de variancia entre pares de poblaciones permite determinar si existió diferencia significativa entre dos poblaciones, en el cuadro 26 observamos la distancia genética de Prevosti y el nivel de significancia ($p<0,05$) para la comparación del par de poblaciones. Entre las poblaciones 26 y 29, 25 y 30, 29 y 30 no hay diferencias significativas mientras que entre las poblaciones 10 y 25 ($p=0,046$), 29 y 30 ($p=0,05$) los valores de significancia se encuentran cercanos al nivel de significancia establecido ($p<0,05$).

Cuadro 26: Matriz de distancia genética (primera fila) y significancia (segunda fila) para los pares comparados de poblaciones.

	26	27	28	29	30	10
25	0,182 0,001	0,124 0,001	0,275 0,001	0,158 0,001	0,045 0,060	0,050 0,046
26		0,066 0,012	0,112 0,002	0,026 0,163	0,088 0,006	0,145 0,004
27			0,234 0,001	0,117 0,001	0,123 0,001	0,127 0,001
28				0,051 0,045	0,208 0,001	0,204 0,001
29					0,049 0,050	0,100 0,005
30						0,057 0,029

4.2.7 Análisis Multivariado

4.2.7.1 Análisis de Ordenamientos. Análisis de Coordenadas Principales

Al realizar el análisis de coordenadas principales, vemos que la primera y la segunda variable explican el 27,91 y 21,79% de la variación molecular total de las siete poblaciones, es decir ambas variables explican un 49,7% de la variación (Gráfico 21). Mientras que la tercera variable explica el 18,65% de la variación (Gráfico 22), explicando las tres variables el 68% de la variación.

4.2.7.2 Análisis de Agrupamiento. Análisis de Cluster

Se definió mediante el método UPGMA el dendrograma para las poblaciones analizadas mediante los microsatélites. Como se puede observar en el gráfico 23, los perfiles moleculares de las poblaciones 25 y 10 son muy similares y se unen a la población 30 formando así un grupo. Los perfiles moleculares de las poblaciones 26 y 29 se unieron con una distancia menor que el resto de las poblaciones conformando así otro grupo, el cual se unió al perfil molecular de la población 27 a una distancia un tanto mayor. La población 28 que es la de mayor distancia genética y se agrupa en forma separada de las demás poblaciones.

La distorsión ocasionada con el manejo de los datos durante la construcción del dendrograma, se obtuvo a través de la obtención del coeficiente de correlación cofenética, cuyo valor fue de $r = 0,76$.

4.2.7.3 Test de Mantel

Al realizar el test de Mantel, método por el cual comparamos la matriz de distancia genética con matriz de distancia geográfica presentó como valor de correlación $r = -0,08994$ (Gráfico 24).

Foto 2: Cuantificación de ADN, de los individuos de algunas de las poblaciones seleccionadas. A: ADN testigo [100ng/ μ l]; B: ADN tesigo [200ng/ μ l]

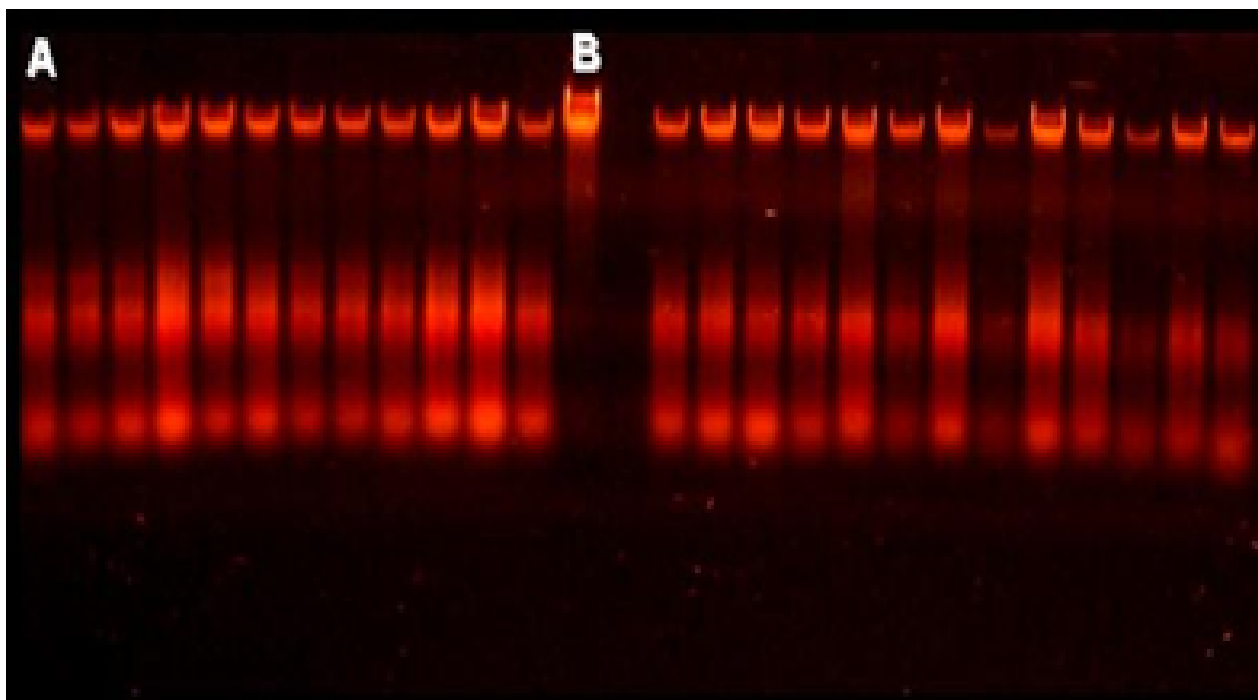


Foto 3: Productos amplificados por SSR LPH01A07 desde A (más pesado) a F (más liviano).

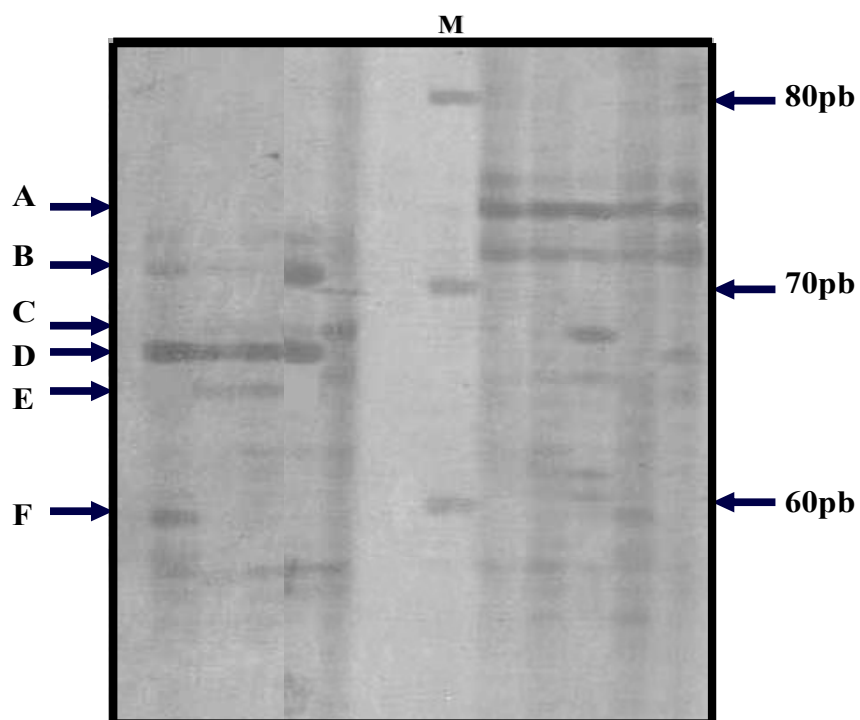


Foto 4: Productos amplificados por SSR LPH01D09 desde A (más pesado) a C (más liviano).

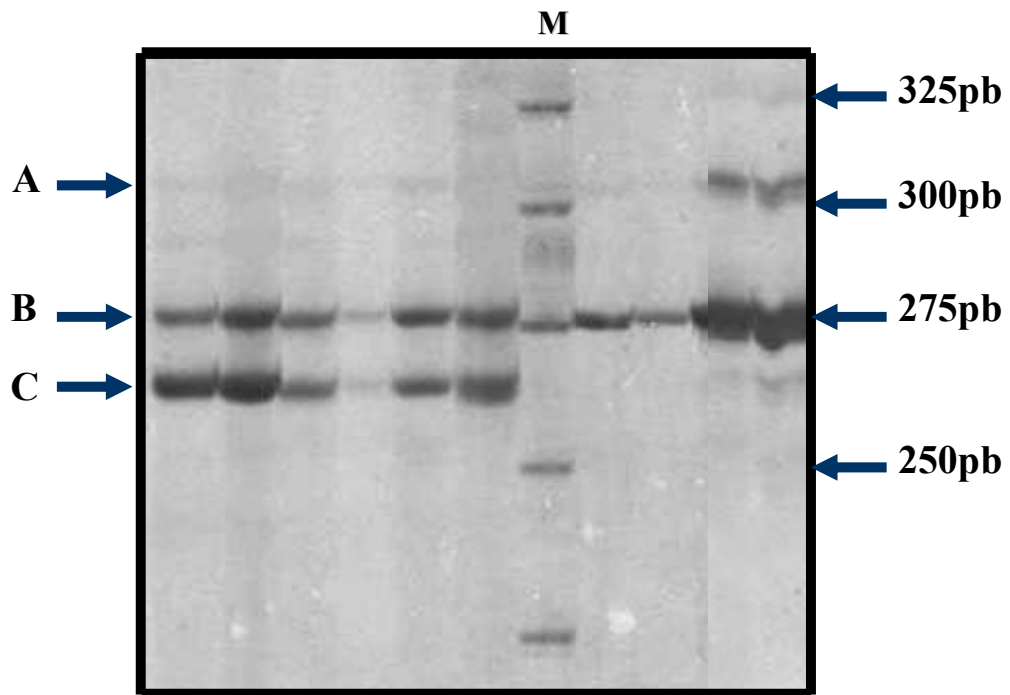


Foto 5: Productos amplificados por SSR LPH01H06 desde A (más pesado) a I (más liviano).

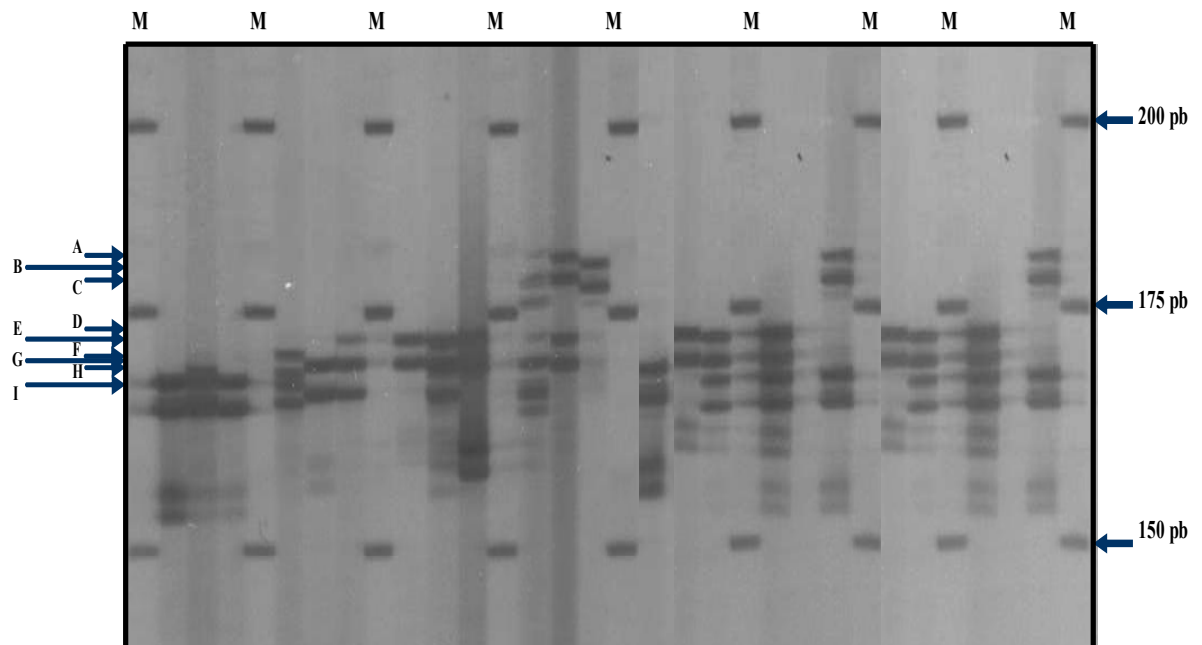


Foto 6: Productos amplificados por SSR LPK01A03 desde A (más pesado) a G (más liviano).

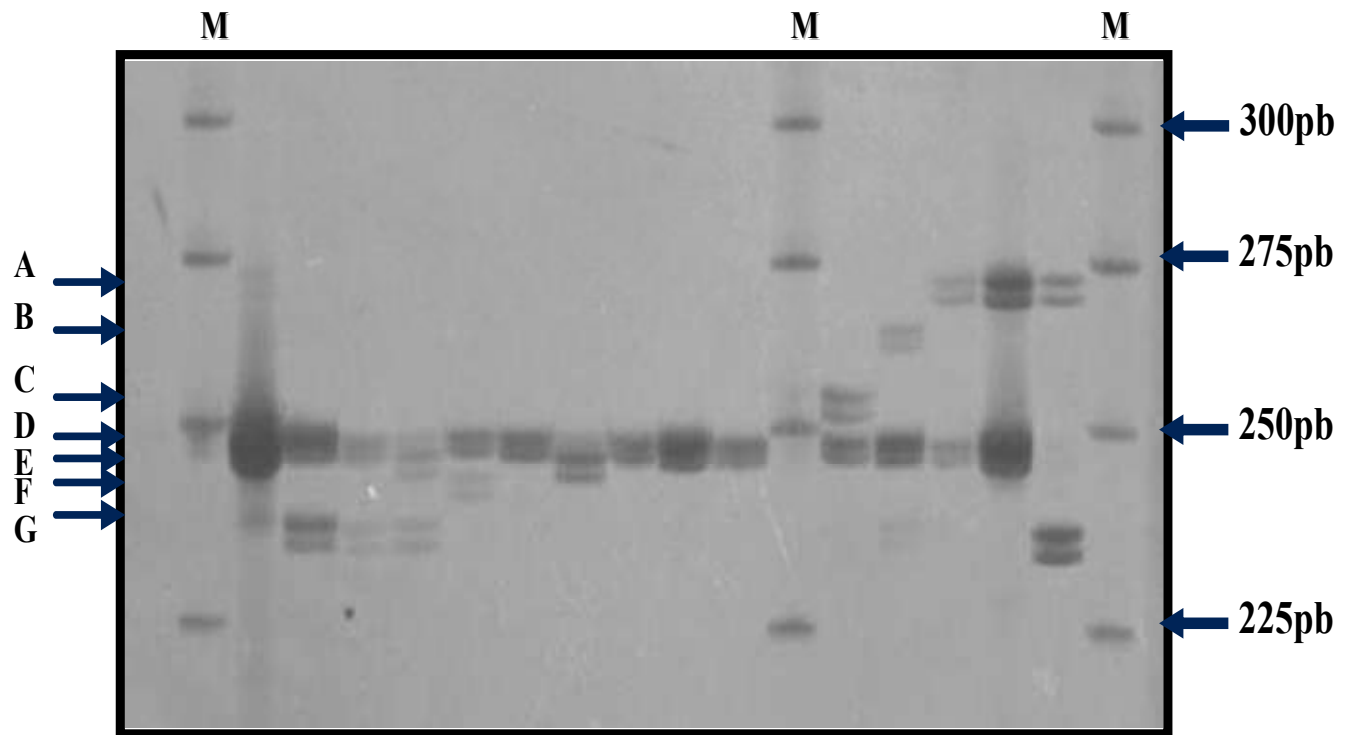


Gráfico 21: Análisis de coordenadas principales basado en la distancia de Prevosti (C1: componente principal 1; C2: componente principal 2)

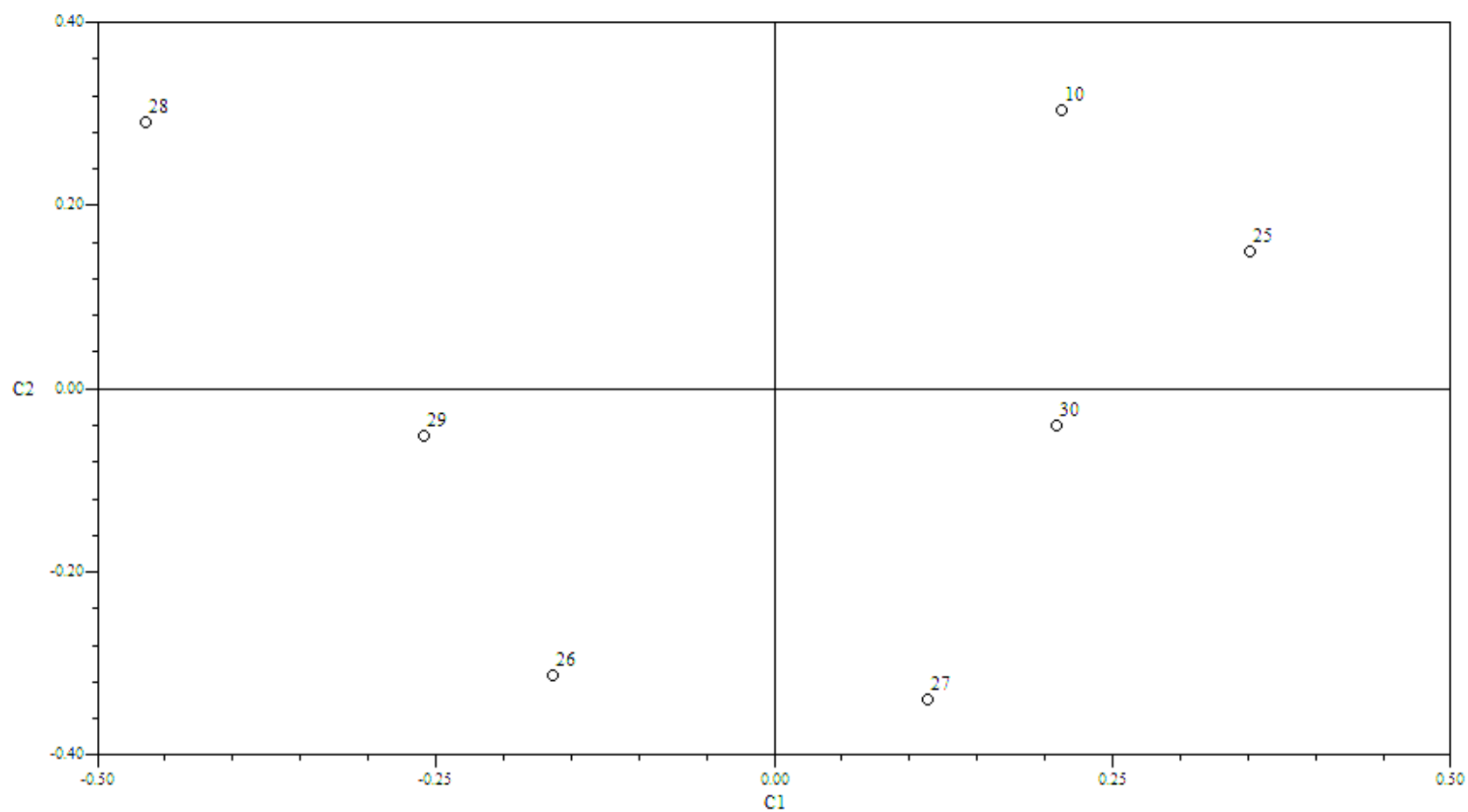


Gráfico 22: Gráfico tridimensional de coordenadas principales que muestra la disposición de las siete poblaciones, basado en la distancia de Prevosti (C1: componente principal 1; C2: componente principal 2; C3: componente principal 3)

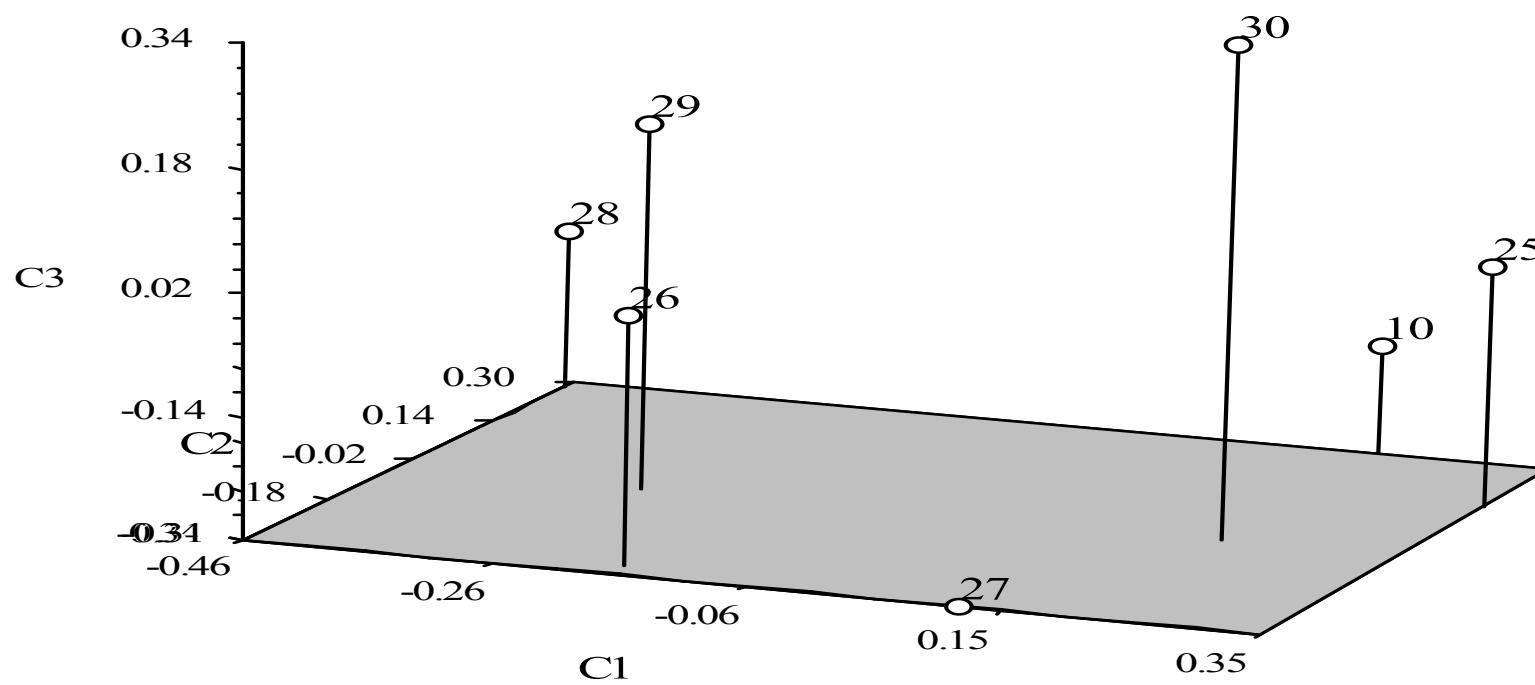


Gráfico 23: Dendrograma de las poblaciones (en ordenadas) basada en los datos de SSR y construido acorde a el método de UPGMA con la distancia de Prevosti

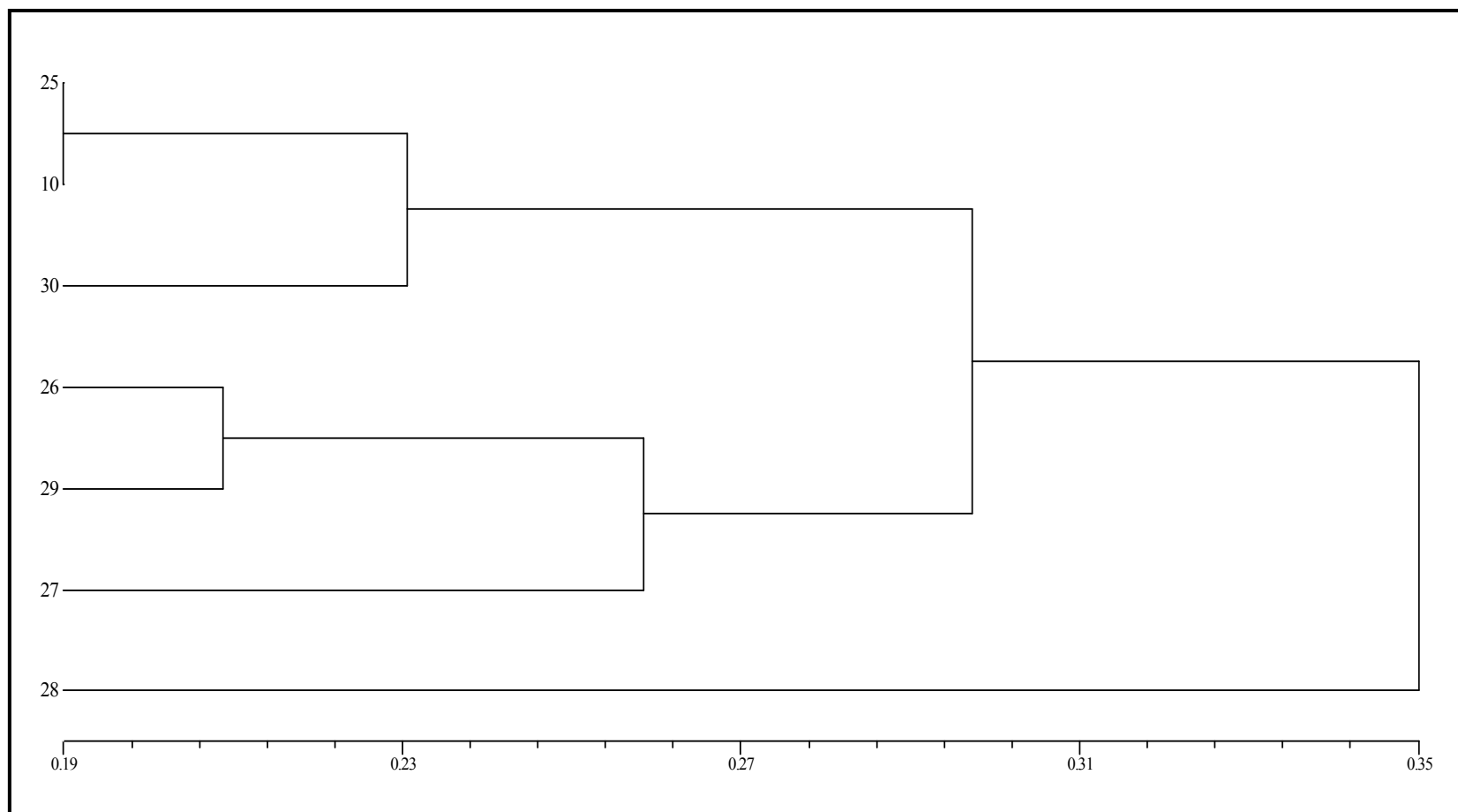
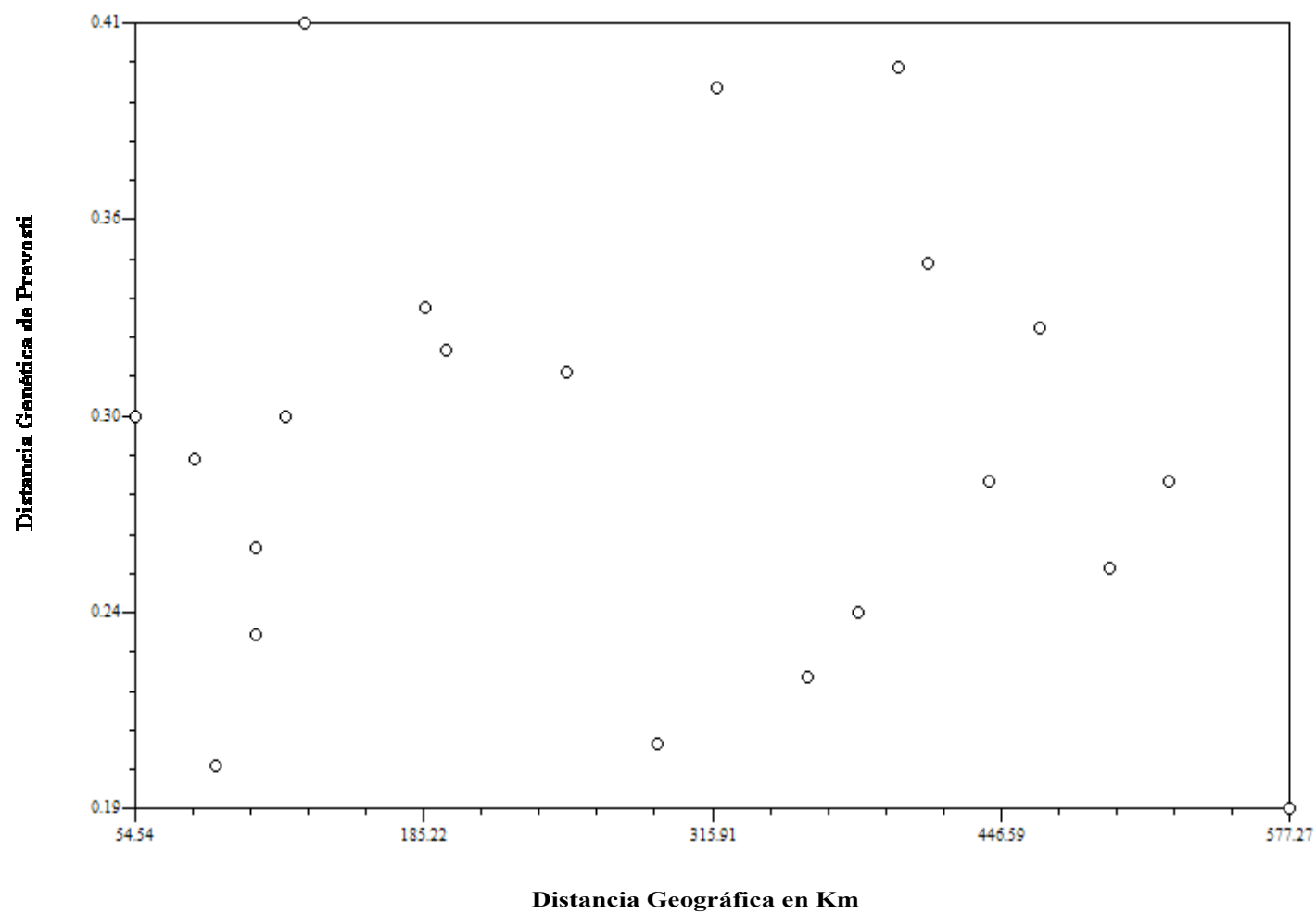


Gráfico 24: Test de Mantel, correlación entre la distancia genética (Prevosti) y la distancia geográfica (Km),



4.3 Caracterización Agronómica y Molecular

4.3.1 Análisis de Procrustes Generalizado

En la gráfico 25 se observa representada la matriz de consenso entre los datos moleculares y agronómicos. Dentro de los caracteres agronómicos que se comparó contempla número de macollos reproductivos por planta, peso de semillas por planta y peso de materia seca total por planta. El punto de consenso se representa con un círculo y los datos agronómicos y moleculares se representan con un cuadrado. Cada punto de consenso se encuentra a una distancia equidistante de los parámetros moleculares y agronómicos, poblaciones como la 30 y 26 presentan mayores distancias al punto de consenso, es decir presentan una mayor dispersión entre los datos agronómicos y los datos moleculares. Las poblaciones 10 y 27 presentan una menor distancia al punto de consenso por ende una menor dispersión entre los datos agronómicos y moleculares. Las poblaciones 10 y 25 se ubican prácticamente en el mismo espacio.

Al comparar los dendrogramas correspondiente a cada caracterización agronómica (Gráfico 26) para estas siete poblaciones y a la caracterización molecular de las mismas (Gráfico 23) se observó que las poblaciones 10 y 25 se dispusieron siempre cercanas formando parte del mismo subgrupo.

Gráfico 25: Matriz de consenso (○) entre datos agronómicos y moleculares (ambos □).

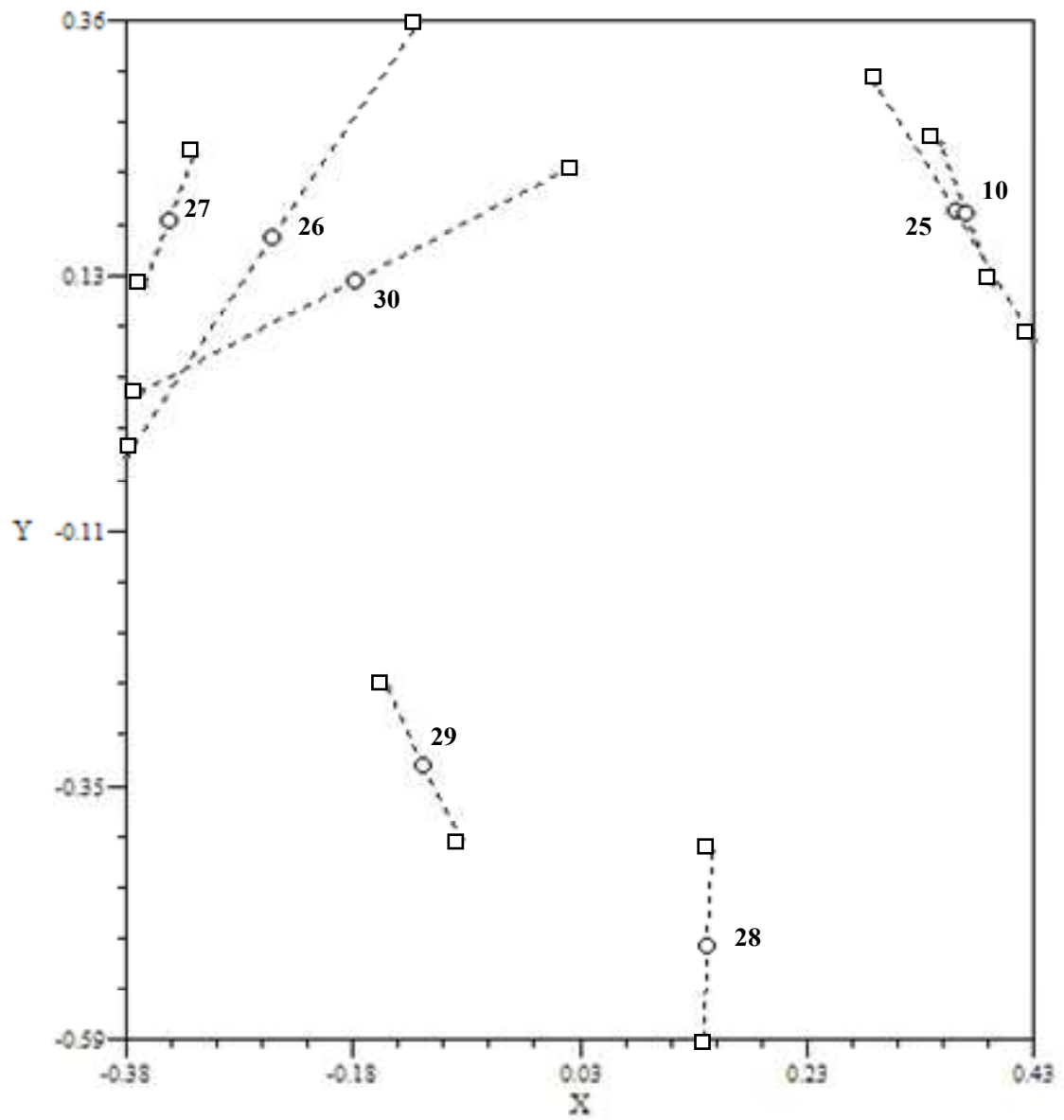
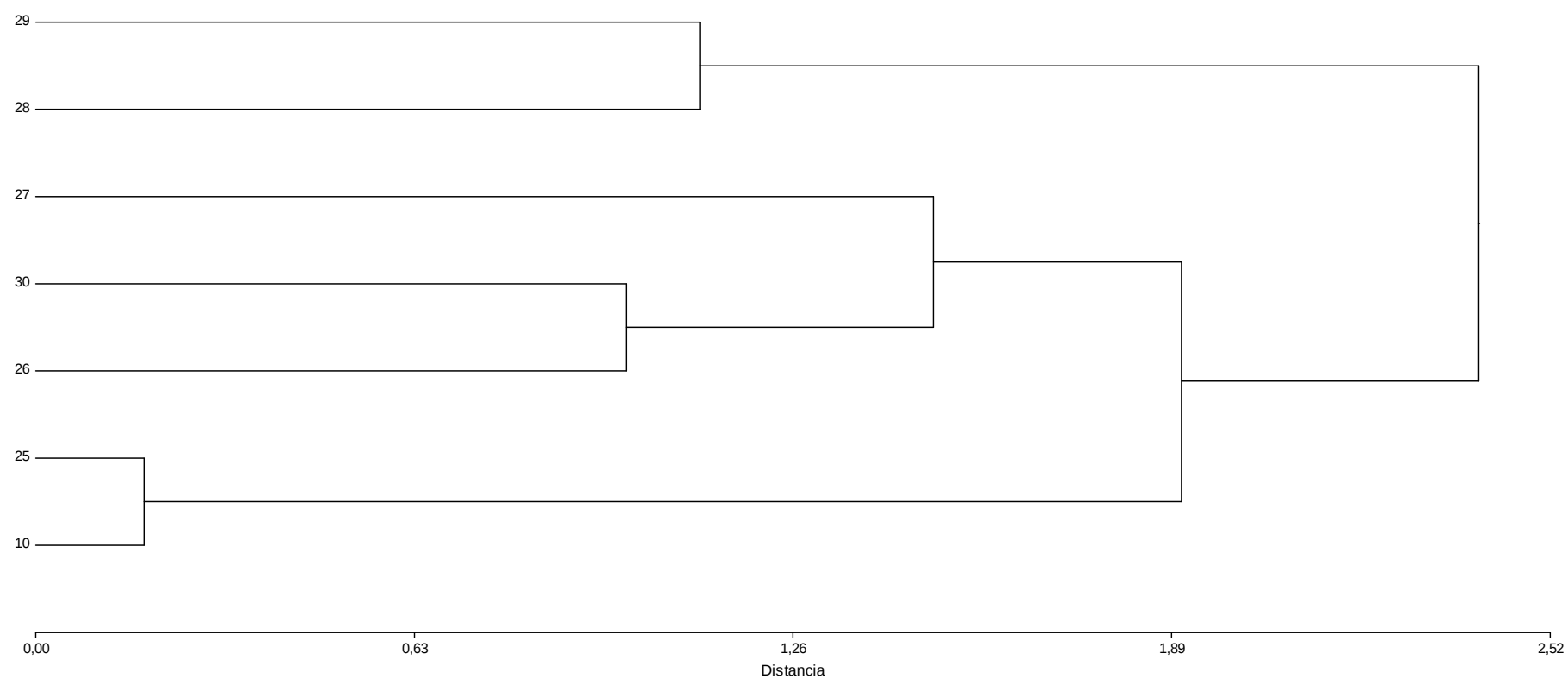


Gráfico 26: Dendrograma obtenido a partir de los datos agronómicos: peso de materia seca total por planta, número de espigas y peso de semilla total por planta para las siete poblaciones analizadas molecularmente



5. DISCUSION

5.1 Caracterización Agronómica

5.1.1 Colecta de las Poblaciones

El mejoramiento genético de cualquier especie forrajera requiere de la presencia de variabilidad genética en caracteres productivos que permita la selección y la generación de nuevos cultivares. En general, las poblaciones naturalizadas que demuestran una elevada adaptación a diferentes ambientes son una fuente muy importante de variabilidad, en particular en especies predominantemente alógamas. De este modo la colecta de germoplasma de una especie vegetal tiene como objetivos principales la conservación de la diversidad genética, la caracterización y el posterior almacenamiento de las semillas. Dependiendo del objetivo principal de la colecta, la estrategia de muestreo que se aplica persigue la obtención de una muestra representativa de los genotipos que componen la(s) población(es), y está condicionada por las características reproductivas y la distribución geográfica de la especie a recolectar (Allard 1970, Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

En el presente estudio la recolección de las 32 poblaciones de raigrás anual diploide se realizó en bulk y se seleccionaron las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Córdoba, debido a la importancia que tiene la especie en los ambientes ganaderos de dichas regiones (Cuadro 1). Esta colecta tuvo como objetivo principal generar una colección de germoplasma para ser utilizada en futuros programas de mejoramiento genético, además de contribuir a la conservación de

la especie, aportando semillas al Banco Activo de Germoplasma de forrajeras del INTA Pergamino y caracterizando los ambientes o sitios de colecta.

El número elevado de poblaciones recolectadas y el rango geográfico que se exploró, se sustentó en un concepto genético-ecológico, que sostiene que la variación presente entre y dentro de poblaciones puede estar fuertemente asociada a los procesos de selección predominantes en cada ambiente particular (Hedrick *et al*, 1976). La detección de la variabilidad genética entre las poblaciones fue la siguiente etapa del presente estudio.

5.1.2 Variabilidad entre Poblaciones

El punto de inicio de cualquier programa de mejora es examinar la variación presente en el germoplasma disponible. Las especies alógamas, entre las cuales se incluyen la mayoría de las forrajeras de clima templado como *Loilium multiflorum* Lam., presentan un alto grado de variabilidad morfo-genética entre poblaciones y dentro de ellas (Tyler *et al*, 1987; Schultze-Kraft, 1990).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican en términos generales la presencia de variabilidad genética entre las poblaciones en la mayoría de los caracteres evaluados (Cuadros 8 y 10), y esto es coincidente con la literatura reportada para la especie (Edwards y Emara, 1970; Rhodes, 1973; Alonso, 1991; Andrés y Bertín, 1998; Andrés, 1999; Andrés *et al*, 2000; De Battista *et al*, 2001; Rosso y Andrés, 2001; Rosso, 2002; Castro *et al*, 2003; Giammaría, 2003; Alonso, 2004; Castaño *et al*, 2004; Andrés *et al*, 2005, Monteverde y De Battista, 2008).

Las estimaciones del Grado de Determinación Genética lograron valores intermedios a elevados, y ello dependió del carácter considerado. Caracteres como el hábito de crecimiento, el

vigor de planta, el ancho de hoja, la fecha de floración y el peso de mil semillas presentaron valores de GDG superiores a 0,8. Por otro lado los caracteres, producción de materia seca, número de macollos reproductivos, largo de espiga, peso total de semilla, presentaron valores de GDG que oscilaron entre 0,4 y 0,7. Mientras que el número de macollos vegetativos y altura de planta previo al segundo corte estuvieron por debajo de 0,12 (Cuadro 11 y Cuadro 13).

La diversidad de los ambientes en los que fueron recolectadas las poblaciones de raigrás anual estuvo fuertemente determinada por diversos efectos, tales como el pastoreo, la frecuencia e intensidad de defoliación, la competencia con otras especies y el tipo de suelo, entre otros (Cuadro 1). Simultáneamente, el modo reproductivo predominantemente alógamo de la especie, puede ser identificado como uno de los factores de mayor influencia sobre la estructura genética de las poblaciones estudiadas (Loveless y Hamrick, 1984), y de esta forma explicar la elevada variabilidad encontrada (Brown y Jain, 1979).

5.1.3 Caracteres Vegetativos

La estructura del canopeo en plantas forrajeras está determinada por el **hábito de crecimiento** y por la disposición de las hojas, y condiciona el manejo de las pasturas (Pearson e Ison, 1994). Dependiendo de la heterogeneidad microambiental, principalmente la intensidad y frecuencia de defoliación y la competencia (Snaydon, 1978), el hábito de crecimiento puede cambiar. Existen evidencias (Davies, 1960; Smeatham, 1972; Seaney, 1974) que indican que los genotipos con hábito de crecimiento postrado sobreviven mejor que los de tipo erecto en sistemas con defoliaciones continuas y frecuentes, aunque no son los de mayor productividad (Cooper y McColl, 1966; Rhodes, 1971). En el presente estudio se encontró variabilidad significativa en el

hábito de crecimiento de las poblaciones ($P < 0,0001$) (Cuadro 8), y predominó el tipo semipostrado (Cuadro 8; Gráfico 4). Estos resultados son coincidentes con los detectados por otros autores (Alonso, 1991; Rosso, 2002), en los que expresan que la mayoría de las poblaciones naturalizadas argentinas de raigrás anual diploide (raigrás criollo) tienen este tipo de crecimiento en estado vegetativo. Entre las 32 poblaciones se observaron extremos en la expresión fenotípica del carácter, siendo las poblaciones 9, 17, 22 y 32 las más postradas y la 25 la más erecta (Cuadro 8). Tanto el GDG como CVg y CVf presentaron valores elevados (Cuadro 11 y Cuadro 12), indicando la existencia de variación genética para este carácter, coincidente con resultados hallados en la literatura (Alonso, 2004; Monteverde y De Battista, 2008).

En estados iniciales de la implantación de una pastura, el **vigor de planta** es un carácter de mucho valor para la selección, ya que determina en forma indirecta la velocidad de crecimiento de las plántulas, y está asociado a la acumulación de materia seca posterior. En el presente estudio se demostró variabilidad significativa ($P < 0,0001$) entre poblaciones para el vigor de planta (Cuadro 8), y predominó el tipo regular (Gráfico 5). La población 25 fue la de mayor vigor de planta, mientras que la población 2 presentó el menor vigor (Cuadro 8). Este carácter también presentó un alto GDG, CVg y CVf indicando la existencia de variación genética para el vigor de planta (Cuadro 11 y Cuadro 12), coincidente con resultados hallados en la literatura (Rosso y Andrés, 2001; Giammaria, 2003). Sin embargo Alonso (2004) no encontró variabilidad para este carácter en condiciones de alta salinidad en el suelo.

El **ancho de hoja** es un componente importante que conforma el rendimiento de materia seca en el raigrás anual (Edwards y Cooper, 1963; Sugiyama *et al*, 1985). El área foliar está determinado tanto por el ancho como por el largo de hoja, sin embargo es el ancho de hoja el más

utilizado para la selección (Cooper y Edwards, 1963) inclusive por haber sido utilizado como variable para la selección de mayor digestibilidad de materia seca (Lentz y Buxton, 1991). En el presente estudio las poblaciones variaron significativamente ($P < 0,0001$) en el ancho de hoja, y en las plantas predominó el tipo de hoja de ancho medio (Cuadro 8), coincidente con otros estudios (Alonso, 1991; Andrés y Bertín, 1998; Andrés *et al*, 2000). El test de diferencia de medias destacó a las poblaciones 20 y 21 con el mayor valor de ancho de hoja y a la 32 con el valor menor (Cuadro 8). Este carácter también presentó un alto GDG, CVg y CVf (Cuadro 11 y Cuadro 12) indicando la existencia de variación genética, coincidente con resultados hallados en la literatura (Alonso, 2004).

El **número de macollos vegetativos** y el peso de los macollos son los principales determinantes el rendimiento de forraje en una pastura (Jewis, 1972; Zarrouh, 1983). Rashal y Kholms (1983) mantienen que el número de macollos podría utilizarse como caracter para la selección indirecta del rendimiento de materia seca siendo éste un caracter confiable. Los resultados obtenidos indicaron que no existió variabilidad para el número de macollos vegetativos (Cuadro 8). Contrariamente a estos resultados, otros estudios realizados en la especie han encontrado variabilidad para este carácter (Hume, 1991; Castro *et al*, 2003). La ausencia de diferencias significativas podría ser atribuida a dos causas: a) un tamaño de muestra poblacional reducido (tres plantas en dos repeticiones) o b) ausencia de variabilidad. Tanto el GDG como el CVg para el carácter fueron bajos (Cuadro 11 y Cuadro 12), indicando la falta de variación genética, por lo que se supone que el efecto producido por el escaso número de plantas por repetición, pudo arrastrar el mismo error evidenciado en las medias fenotípicas.

La **altura de planta previo al segundo corte** es un indicador indirecto de la cantidad de materia seca producida. Esta variable puede ser modificada a través del manejo de la pastura, de la

fertilización y de la competencia con otras especies (Snaydon, 1978). En el presente estudio no existieron diferencias significativas entre poblaciones (Cuadro 8) y al igual que para el carácter anterior tanto el GDG como el CVg y CVf fueron bajos (Cuadro 11 y Cuadro 12), indicando la falta de variación genética.

La **producción de materia seca** es la variable de mayor valor en los programas de selección de especies forrajeras. El raigrás anual diploide tiene un ciclo de producción de forraje otoño-inverno-primaveral, y contribuye a mejorar la oferta invernal de forraje de calidad (Fernández *et al*, 2003). Presenta un período de utilización mayor que los raigrases tetraploides, que se extiende hasta mediados de primavera (Amigone y Kloster, 1997; Madaloni y Ferrari, 2001). Rashal y Kholms (1983) sostienen que el principal índice de productividad del raigrás anual es el rendimiento de materia seca. En el presente estudio se detectaron diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre las 32 poblaciones estudiadas, para los tres cortes realizados (24/08; 14/09; 25/10), y para el peso acumulado total. Se detectaron diferencias en los patrones de producción poblacionales. Por ejemplo la población 36 fue una de las que presentó mayor producción de materia seca sostenidamente en los tres cortes (24/08; 14/09; 25/10) y ello se tradujo en una elevada acumulación de forraje total. Por otro lado la población 16 fue la que logró el menor peso de materia seca en los dos primeros cortes (24/08 y 14/09), y esto redundó en un menor peso seco acumulado total. (Cuadro 8). Otras poblaciones mostraron comportamientos extremos, como la población 33 y la 5 que lograron la mayor y menor producción en el tercer corte, respectivamente (Cuadro 8). Considerando la importancia de la producción de forraje en un futuro programa de selección se destacaron las poblaciones 36 y 33. Otros autores también hallaron variabilidad para el carácter (Rosso y Andrés, 2001; Giammaria, 2003; Castaño *et al*, 2004; Sacido y Latorre, 2006; Monteverde y De Battista, 2008).

Los GDG del peso de la materia seca en los tres cortes y en el acumulado total fueron elevados (Cuadro 11 y Cuadro 12). El CVg y CVf para los tres cortes presentó valores bajos mientras que para la producción de materia seca total el valor fue mayor. Considerando que el carácter es de tipo poligénico y altamente influenciado por el ambiente, los valores detectados son muy auspiciosos para incorporar las poblaciones más productivas en futuros programas de selección. Monteverde y De Battista (2008) obtuvieron valores elevados de GDG para la producción de biomasa, similares a los dos primeros cortes del presente estudio.

La infección por **roya de la corona** (*Puccinia coronata*) es considerada la principal limitación de producción de forraje y rendimiento de semilla en raigrás anual. Andrés y Bertín (1998) detectaron que varios cultivares extranjeros fueron susceptibles a esta enfermedad afectando sobre todo el rendimiento en materia seca principalmente por la falta de adaptación a las condiciones ambientales de nuestro país. Numerosos trabajos discuten el efecto de la roya de la corona sobre el rendimiento foliar. Lancashire y Latch (1966) sostienen que la roya de la corona reduce principalmente el rendimiento de materia verde, más que el de materia seca, que incluye también partes vegetales muertas. Estudios en raigrás perenne concluyen (Price, 1987) que la infección sobre un cultivar susceptible produce una disminución del 37 % en el rendimiento de materia seca y del 94 % en el de materia verde. Otros parámetros afectados por la enfermedad son el rebrote, número de macollos y área foliar (Lancashire y Latch, 1966; Potter, 1987; NIAB, 1988). En el presente estudio a través de la medición del número de plantas con presencia de roya en tres momentos (14/10; 26/10; 08/11) se determinó variabilidad en la respuesta de las poblaciones analizadas, siendo la población 32 la primera en presentar signos de la enfermedad; mientras que las poblaciones con mayor número de plantas afectadas fueron la población 33 y la 32. Las poblaciones

menos afectadas fueron las poblaciones 16, 9 y 6 (Gráfico 13). Giammaría (2003) también encontró variabilidad al evaluar familias de medios hermanos en raigrás diploide donde determinó que se expresaron en forma diferencial en función del ambiente en el que crecieron. Andrés (1999) señaló que Pergamino es un sitio altamente conductivo (*hot spots*) para la expresión de enfermedades.

5.1.4 Caracteres Reproductivos

La **fecha de floración** está determinada por el fotoperíodo, la temperatura y el suministro de agua (Rhebergen, 1985; Ernst, 1987), y en raigrás anual es afectada por diversos factores como el manejo de la defoliación (Breese y Charles, 1962). Se ha demostrado que un retraso en la fecha de floración podría mantener por un período de tiempo mayor un alto valor nutritivo, alto valor de digestibilidad y alto valor de palatabilidad del forraje (McLean y Watson, 1992). En el presente estudio se detectó variabilidad significativa entre poblaciones ($P < 0,0001$) para los días a floración desde el transplante, con una media de 167 días (Cuadro 10). Las poblaciones mostraron diferentes patrones de floración, por ejemplo las poblaciones 20, 9, 26 y 30 fueron las más precoces, mientras que las poblaciones 12 y 11 fueron las más tardías en florecer (Cuadro 10). El GDG fue el más elevado de todos los caracteres considerados reproductivos (Cuadro 13), y contrariamente, los CVg y CVf fueron los más bajos (Cuadro 14). Otros autores también encontraron variabilidad significativa para el carácter (De Bastista *et al*, 2000; Rosso y Andrés, 2001; Castro *et al*, 2003; Monteverde y De Battista, 2008). Estos resultados indicaría elevadas probabilidades de lograr progresos en la selección por grupos de precocidad en futuros programas de selección para el desarrollo de cultivares de raigrás con diferente comportamiento productivo.

El **número de macollos reproductivos** es uno de componentes más importante del rendimiento de semilla y en la mayoría de las especies forrajeras esta variable está altamente correlacionada a la cantidad de macollos vegetativos (Smith *et al*, 1994). Por otro lado Elgersma *et al* (1989) sostienen que en determinados cultivares de raigrás anual el número de inflorescencias podría ser un factor limitante para obtener altos rendimientos de semilla. Mientras que Bugge (1984) encontró que en raigrás anual el número de espigas es el componente de rendimiento más afectado por el ambiente. En el presente estudio las poblaciones mostraron variabilidad significativa ($P < 0,001$) (Cuadro 10). La media de este carácter para todas las poblaciones fue muy elevada (135 macollos reproductivos/planta). Las población 6 se destacó por lograr el mayor número (188) y las poblaciones 28 (87), 4 (100) y 27 (104) presentaron la menor cantidad (Cuadro 10). El GDG, el CVg y el CVf presentaron valores intermedios (Cuadro 13 y Cuadro 14), indicando la existencia de variación genética para este carácter. Resultados similares fueron declarados por Giammaría (2003) y Bertín (2004) al realizar estudios de componentes de rendimientos en cultivares y sintéticas de raigrás anual.

El **largo de espiga** es una de las variables indirectas del rendimiento de semilla, generalmente está asociada al peso de semilla y es una variable muy dependiente del origen del germoplasma (Andrés *et al*, 1998; Ruíz Díaz y Andrés, 1998). En el presente estudio se encontró variabilidad significativa ($P < 0,0001$) entre poblaciones para el carácter (Cuadro 10). La media del largo de espiga fue de 23,91cm. Otros estudios del comportamiento de cultivares de raigrás anual tetraploide, detectaron un largo de espiga mayor (Giammaría, 2003), pero este hecho está asociado directamente al nivel de ploidía del germoplasma estudiado. La población 28 logró plantas con el mayor largo de espigas, mientras que la población 21 presentó plantas con las espigas más cortas

(Cuadro 10). El GDG para este carácter fue intermedio mientras que el CVg y el CVf presentaron valores bajos (Cuadro 13 y Cuadro 14).

El **peso total de semillas** es otro carácter de gran interés en todos los programas de mejoramiento de especies forrajeras, y es indicativo del éxito en la difusión del nuevo cultivar, ya que está directamente asociado al rendimiento de semillas. Este carácter es altamente dependiente del ambiente y ha sido muy bien estudiado (Bugge, 1984; Elgersma *et al*, 1989; Bertín, 2004). En el presente estudio las poblaciones naturalizadas demostraron diferencias significativas ($P < 0,0001$) (Cuadro 10). La media de este carácter fue de 21,83 gramos de semilla por planta. Las poblaciones 21 (30,52g), 6 (29,64g) y 33 (29,46g) fueron las de mayor peso total y la 17 la de menor peso (13,34g) (Cuadro 10). Tanto el GDG como CVg y el CVf presentaron valores elevados (Cuadro 13 y Cuadro 14), los cuales indicarían la existencia de variación genética posible de seleccionar para este carácter en futuros programas de selección, coincidente con otros resultados (Cooper, 1960; Rosso y Andrés, 2001).

El **peso de mil semillas** es otro de los componentes más importante para la determinación del rendimiento en semilla. En algunas especies la asociación entre el peso de mil semillas y el vigor inicial de las plántulas y su sobrevivencia es positiva (Twamley, 1967, 1974; Raja y Bean, 1979; Schaal y Smith, 1980). Sin embargo no siempre esta relación es directa, ya que en algunos casos no relaciona con una germinación diferencial (Andrés y Guillen, 2001). En el presente estudio se encontró variabilidad significativa ($P < 0,0001$) entre poblaciones para el carácter (Cuadro 10). Bertín (2004) también encontró variabilidad en el peso de mil semillas en cultivares y sintéticas experimentales de raigrás anual. La media de este carácter fue de 2,02 g, valores similares a la media reportó Bertin (2004) para especies diploides. Las poblaciones 28 (2,98g), 33 (2,46g) y 14

(2,43g) fueron las de mayor peso de mil, y la población 9 (1,58g) presentó el menor valor de peso de mil (Cuadro 8). En general los cultivares de raigrás anual diploides logran menor peso de mil semillas que los tetraploides, y escasamente superan los 2g. El GDG fue elevado (Cuadro 13), y los CVg y el CVf (Cuadro 14) fueron intermedios, indicando la existencia de variación genética para este carácter. Los resultados obtenidos en las poblaciones naturalizadas indicarían que existen posibilidades de seleccionar en futuros programas de mejoramiento, por elevado peso de mil semillas.

5.1.5 Asociación entre Caracteres

La asociación entre dos caracteres puede explicarse tanto por efectos genéticos como por efectos ambientales o por ambos. Las causas ambientales de la asociación de los valores fenotípicos pueden acentuar o atenuar los causales genéticos de la correlación (Mariotti, 1986). En el presente estudio, se discuten aquellas correlaciones fenotípicas significativas ($p < 0,05$) consideradas de mayor importancia desde el punto de vista de un programa de mejoramiento.

Entre las asociaciones de mayor importancia desde el punto de vista del mejoramiento genético del rendimiento de forraje se destacan las correlaciones fenotípicas entre los diferentes cortes de **materia seca**, las que siempre fueron positivas (0,223 a 0,683) (Cuadro 15). Todos los caracteres de producción de materia seca presentaron valores de GDG de intermedios a elevados (Cuadro 11), de esta manera la selección indirecta por rendimiento de materia seca podría realizarse a través de la selección por la materia seca producida en etapas tempranas de evaluación (Rashal y Kholms, 1983).

Entre las asociaciones de mayor importancia desde el punto de vista del mejoramiento genético del rendimiento de semilla se destacan el **peso total de semillas**, que estuvo correlacionado ($r_f=0,485$; $P<0,0001$) significativamente con el número de macollos reproductivos (Cuadro 15). Ambos caracteres presentaron valores de GDG similares (0,632 para el número de macollos reproductivos y 0,694 para el peso total de semillas) y elevados. Existen numerosos estudios que indican la existencia de una elevada correlación significativa entre el número de macollos reproductivos y el peso total de semilla en diversas especies forrajeras templadas (Ceron, 1993; Barufaldi, 1999; Guillen, 2002)

Otra asociación interesante para el mejoramiento genético del rendimiento de semillas es la correlación entre el **peso de mil semillas** con el número de macollos reproductivos ($r_f=-0,278$) y con el largo de espiga ($r_f=0,466$) ambas significativas ($P<0,01$) (Cuadro 15). Los tres caracteres presentan valores de GDG de intermedios a elevados (0,804 para el peso de mil semillas, 0,632 para el número de macollos reproductivos, 0,561 para el largo de espiga) (Cuadro 13).

Por otro lado el **largo de espiga** presentó una correlación fenotípica negativa con el número de macollos reproductivos ($r_f=-0,189$) y una asociación positiva con la producción de materia seca al segundo corte ($r_f=0,152$) (Cuadro 15), ambas significativas ($P<0,01$ y $P<0,05$ respectivamente). Los tres caracteres presentan valores de GDG de intermedios a elevados (0,561 para el largo de espiga, 0,662 para la producción de materia seca al segundo corte y 0,632 para el número de macollos reproductivos) (Cuadro 13 y Cuadro 11).

5.1.6 Análisis Multivariado

El análisis de agrupamiento y ordenamiento permitió separar las poblaciones según la producción de materia seca total por planta, carácter que explicó la mayor variabilidad conjuntamente con el peso total de semillas, explicando un 72,12% de la variación morfo-fisiológica total. En el gráfico 19, cabe destacar que la población 17 y la población 28 quedan aisladas del conjunto de poblaciones, por tener el menor peso de semilla (población 17) y si bien la población 28 no presenta el mayor peso de semillas, presenta el mayor peso de mil semillas. Mientras que las poblaciones 33 y 36 quedan agrupadas en el cuadrante derecho superior indicando valores altos de producción de materia seca. Similares valores hallaron Castro *et al* (2003), en el análisis de poblaciones naturalizadas de raigrás anual donde las dos primeras componentes también explicaron el 72,82% de variación morfo-fisiológica, coincidiendo en que el peso de materia seca total explica la mayor parte de la variabilidad. De esta manera, las variables que fueron consideradas para realizar el análisis de cluster y decidir las poblaciones que se caracterizarían posteriormente en forma molecular fueron peso de materia seca total y peso total de semilla.

5.2 Caracterización Molecular

5.2.1 Cuantificación de la variabilidad genética

El número de alelos efectivos indica el tamaño de una población ideal en la cual dada las frecuencias alélicas existentes todos los individuos son totalmente diferenciados (Peakall y Smouse, 2006). En el presente estudio el mayor valor del número de alelos efectivo promedio por población fue para la población 28 (2,864), indicando que si bien en dicha población se analizaron 20 individuos, con solo 3 individuos se lograría detectar diferencias alélicas (Cuadro 19). Si bien estos resultados son coincidentes con los hallados por otros autores, dependiendo de la especie a analizar los valores podrían ser superiores, como los hallados en poblaciones de maíz con igual cantidad de individuos analizados (Barcaccia *et al*, 2003).

Según algunos autores (Barcaccia *et al*, 2003), la frecuencia alélica promedio por población esta correlacionada en forma proporcionalmente inversa a la cantidad de alelos presentes en la misma. Los resultados obtenidos en las poblaciones de raigrás anual estudiadas, indicaron que la población 27 presentó la mayor frecuencia alélica media (0,364) (Cuadro 19), y consecuentemente la menor cantidad de alelos (11) (Cuadro 22). Contrariamente a estos resultados, la población 28 presentó el menor valor de frecuencia alélica media (0,211) (Cuadro 19) y la mayor cantidad de alelos por población (19) (Cuadro 22).

De acuerdo a estudios anteriores (Labate *et al*, 2003) se predice que un valor de heterocigosidad observada (H_o) inferior a la heterocigosidad esperada (H_e) indicaría una tendencia a la endogamia dentro de las poblaciones. En este estudio, la mayoría de las poblaciones de raigrás

anual presentaron un valor de H_o inferior a la H_e , a excepción de la población 28 (Cuadro 19). La población que mayor diferencia presentó entre estos estimadores fue la 30 (Cuadro 19). Diferencias superiores fueron detectadas entre cultivares de *Lolium perenne* (Kubik *et al*, 2001), mientras que las diferencias fueron menores entre poblaciones de *Lolium rigidum* (Oliveira y López, 1999).

El contenido de información polimorfa (PIC) (o la heterocigosidad esperada, H_e según Peakall y Smouse, 2006), es una medida de la diversidad genética y provee una estimación del poder discriminatorio de cada microsatélite (SSR), contemplando el número de alelos y sus frecuencias relativas en cada población. El valor promedio del PIC para el total de los SSR fue de 0,548 (Cuadro 20). Resultados inferiores (Baoulfourier *et al*, 1998), similares (Oliveira y López, 1999) y superiores se hallaron en la literatura (Kirigwi *et al*, 2008), para la especie. Indicando entonces una diversidad intermedia dentro del género *Lolium spp.* (Charmet y Belfourier, 1994).

Dentro del análisis de estructura de poblaciones mediante los estadísticos F de Wright, se observa que el SSR LPK01A03 fue el que evidenció un mayor valor de F_{is} negativo para todas las poblaciones (-0,398), indicando un exceso de heterocigotos (Cuadro 21). Los resultados obtenidos en este SSR fueron completamente diferentes a los encontrados en otros trabajos realizados en la especie (Warren *et al*, 1998; Oliveira y López, 1999). Para el SSR LPH01A07, el F_{is} fue positivo para todas las poblaciones, presentando el mayor valor promedio (0,618), indicando una tendencia a la endocría o alelos nulos no detectados (Peakall y Smouse, 2006) (Cuadro 21). Por otro lado el mayor valor F_{it} corresponde al SSR LPH01A07 indicando que el nivel de consanguinidad elevado es lo que podría revelar una disminución de la heterocigosidad a nivel de esta muestra poblacional (Cuadro 21). Para el SSR LPH01H06 tanto el F_{is} como el F_{it} fueron elevados y positivos indicando

una menor presencia de heterocigotos (Cuadro 21). El SSR LPH01D09 presentó valores de Fis y de Fit bajos y cercanos a cero indicando un posible equilibrio de la población.

Al estimar el promedio general de todas las poblaciones, el valor de Fis fue de 0,165 comparable con valores reportados en cultivares (Hayward y McAdam, 1977) y poblaciones (Oliveira *et al*, 1997; Oliveira y López, 1999) de la especie. Este valor bajo indicaría que las poblaciones de raigrás anual naturalizadas estudiadas, estarían próximas al equilibrio panmítico. Con respecto al valor medio de diferenciación interpoblacional, el Fst fue de 0,094 evidenciando que existe una elevada variación dentro de poblaciones (90,5%), y una escasa diferenciación (9,5%) entre las mismas (Cuadro 21). Valores similares de Fst, fueron obtenidos (Oliveira y López, 1999; Kubik *et al*, 2001) en poblaciones y cultivares de *Lolium* spp.

Considerando que la proporción de diversidad entre poblaciones con relación a la diversidad total se expresa como $F_{st}/(1-F_{st})$ (Nei, 1977), en el presente estudio se detectó que el 10% de la diversidad genética total para los cuatro SSR estudiados fue debido a la variación entre las poblaciones, mientras que el 90% restante fue atribuible a la variación dentro de las mismas. Estos resultados fueron consistentes con el elevado valor de Nm promedio (2,422), indicando un predominio del flujo génico (Anónimo, 2005) por sobre la posible deriva génica producida por el muestreo poblacional. Por su parte otros autores (Barcaccia *et al*, 2003) sugieren que un Nm superior a 1 indicaría escasa diferenciación entre poblaciones.

5.2.2 Comportamiento de los SSR

Todos los SSR utilizados presentaron alelos raros ($p_i \leq 0,05$) (Cuadro 22) y adicionalmente los SSR LPH01H06 y LPK01A03 presentaron alelos privativos en las poblaciones de raigrás anual estudiadas (Cuadro 24). Estos resultados podrían explicar las amplias diferencias obtenidas en el presente estudio comparativamente con los alelos identificados en otros estudios (Jones *et al*, 2001) para estos SSR. Además podrían ser indicativos de la adaptación de las poblaciones naturalizadas de raigrás anual a las condiciones ambientales propias de los ambientes en las que fueron recolectadas (siempre y cuando el SSR estuviera asociado a algún carácter de adaptabilidad).

Todos los SSR fueron polimórficos presentando 25 alelos para los cuatro SSR estudiados, de los cuales el 28% estuvo presente en todas las poblaciones (Cuadro 23). Para los SSR LPH01A07 y LPH01H06 se reportaron resultados similares en los productos amplificados (Jones *et al*, 2001; Vandewalle, 2007), mientras que para los SSR LPK01A03 y LPH01D09 no fue coincidente con la bibliografía consultada (Jones *et al*, 2001) ya que estos SSR fueron considerados monomórficos. Sin embargo el tamaño en pares de bases (pb) para los alelos reportados en el presente estudio fue coincidente con el tamaño de pb estimados por Jones *et al*, (2001) para ambos SSR. Las mayores frecuencias alélicas ($p_i \geq 0,8$) se presentaron en el SSR LPH01D09 para el alelo de 275pb, en las poblaciones 25, 30 y 10 (Cuadro 22), indicando con este SSR para esos alelos una posible fijación de los mismos.

5.2.3 Análisis de la variancia (AMOVA)

Diferentes estudios realizados en especies forrajeras alógamas, y en particular en cultivares y poblaciones naturalizadas de raigrás anual, presentan elevada variabilidad a nivel molecular (Huff, 1997; Forster *et al*, 2001), indicando la amplia variabilidad genética existente en la especie a pesar de haber transcurrido mas de 60 años de selección (Casler, 1995).

Los resultados en el presente estudio evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre las poblaciones (Cuadro 25). Del total de la variación detectada, el 88% correspondió a la variabilidad entre individuos dentro de poblaciones, mientras que el resto (12%) correspondió a la variación entre poblaciones (Cuadro 8). Estos resultados son coincidentes con los hallados por numerosos autores tanto para poblaciones de *Lolium multiflorum* analizadas con SSR (Peter-Schmid *et al*, 2008) y con RAPD (Castro *et al*, 2003), como en otras especies de *Lolium spp* (Yamashita y Sawada, 1999; Kubik *et al*, 2001; Calsyn *et al*, 2003; Bolaric *et al*, 2005) y otras especies forrajeras como *Paspalum dilatatum* (García, 2001) y *Festuca pratensis* (Peter-Schmid *et al*, 2008).

Al comparar las poblaciones de a pares para determinar cuales difirieron entre sí, se destacaron las poblaciones 27 y 28 respecto al resto (Cuadro 26), distanciándose significativamente ($P \leq 0,05$). Contrariamente los pares de poblaciones que no difirieron significativamente ($P \geq 0,05$) entre sí fueron: 25-30, 26-29 y 29-30. Estos resultados indicarían que si bien la varianza interpoblacional es significativa, esta no tendría la magnitud suficiente para discriminar todas las poblaciones analizadas. Cabe destacar que los pares de poblaciones 25-10 y 28-29 estuvieron muy cercanos al nivel de significancia ($P \leq 0,05$) con valores de $P = 0,046$ y $P = 0,045$ respectivamente (Cuadro 26).

5.2.4 Análisis Multivariado

Con el objetivo de investigar la consistencia en el agrupamiento de las poblaciones se realizaron dos tipos de análisis de agrupamientos: Análisis de Coordinadas Principales (ACoorP) y Análisis de Clusters (AC). Los resultados del ACoorP indicaron que el 68% del total de la variabilidad detectada, fue explicado mediante tres componentes principales (Gráfico 22), al igual que otros autores (Bennett *et al*, 2002). Los resultados del AC (Gráfico 22), no permitieron discriminar las poblaciones 25 y 10 con los SSR empleados, indicando un perfil molecular similar entre ellas. Por su parte la población 28 quedó aislada, determinando un perfil molecular diferente al resto. Con el Test de Mantel se determinó la inexistencia de correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética de las poblaciones analizadas, similarmente a lo descrito por otros autores para *Lolium spp* (Warren *et al*, 1998) y para otras especies forrajeras (Warren *et al*, 1998; Rosso *et al*, 2007).

5.3 Caracterización Agronómica y Molecular

La caracterización de la variabilidad genética en diversas especies forrajeras, se ha basado durante muchos años en la descripción de caracteres morfológicos y fisiológicos, básicamente por el interés que tienen este tipo de caracteres en la aplicación en programas de selección y desarrollo de cultivares. La naturaleza alógama de la mayoría de las especies forrajeras más importantes ha limitado los análisis necesarios para determinar el nivel de variabilidad dentro y entre poblaciones naturales y sintéticas. Debido a que los cultivares forrajeros son poblaciones sintéticas que muestran una alta heterogeneidad genética, la posibilidad de distinguir dos poblaciones depende de la comparación de variabilidad entre y dentro de las poblaciones. Para ello, a la observación fenotípica de los caracteres y el empleo de métodos enzimáticos, se han sumado en los últimos años, análisis sobre las secuencias del DNA, como los polimorfismos amplificados al azar (RAPDs), en fragmentos de restricción (RFLPs), en el largo de los fragmentos amplificados (AFLPs) y en las secuencias simples repetidas (SSRs), técnicas más directas y predictivas, que contribuyen sensiblemente en la caracterización de las variedades.

El desarrollo y aplicación de varios sistemas de marcadores y la construcción de mapas de recombinación detallados ha permitido avanzar en el conocimiento del control genético de caracteres fenotípicos, la identificación de individuos superiores y aumentar la eficiencia de selección inclusive de ecotipos muy cercanos en *Lolium spp* (Bolaric *et al*, 2005; Fjellheim y Rognoli, 2005), entre otros beneficios.

El presente trabajo ha intentado abordar ambas caracterizaciones en las poblaciones naturalizadas de raigrás anual diploide, y demostrar la utilidad de ambas técnicas en el proceso de

caracterización de genotipos para ser incorporados a futuros programas de mejoramiento genético de la especie.

Los resultados del presente estudio revelaron tanto por caracterización agronómica como por caracterización molecular que existe variabilidad genética ($P < 0,0001$) entre poblaciones, siendo mucho más amplia la variabilidad detectada a nivel molecular dentro de las poblaciones (88%) (Cuadro 25). Similares resultados se obtuvieron en estudios realizados en poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* Lam caracterizadas agronómica y molecularmente (Castro *et al*, 2003; Peter-Schmid *et al*, 2008).y en la especie *Lolium spp.* (Calsyn *et al*, 2003).

El análisis de procrusters ha sido escasamente reportado en trabajos científicos, sin embargo algunos autores sostienen que su aplicación ha resultado en la mejor alternativa para interpretar agrupaciones de diferentes cultivares tanto en *Cucumis spp* (Bramardi *et al*, 2005) como en poblaciones locales de *Zea mays* (Defacio *et al*, 2007). El análisis conjunto de los datos permitió agrupar las poblaciones a través de los caracteres moleculares y agronómicos (Gráfico 25), demostrando consistencia entre la proximidad de las poblaciones 10 y 25, mientras que sugiere que comparten el mismo espacio las poblaciones 26, 27 y 30 variando con la agrupación propuesta por la caracterización molecular y agronómica.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización agronómica de las 32 poblaciones naturalizadas de raigrás anual diploide, realizada a campo y en condición de planta espaciada, permitió detectar una importante variabilidad genética en la mayoría de los caracteres morfo-fisiológicos estudiados.

Los elevados valores obtenidos en la estimación de los parámetros genéticos de la mayoría de las variables analizadas, sugerirían la posibilidad de realizar selección y permitiría incorporar algunas poblaciones al programa de mejoramiento de raigrás anual diploide.

Si el objetivo del programa de selección es la obtención de cultivares superiores en producción de forraje y de semilla, las poblaciones 36, 33, 21 y 29 serían las indicadas por sus elevadas productividades en el peso seco acumulado total y por su elevada cantidad de macollos reproductivos y peso total de semillas por planta. Este comportamiento quedo evidenciado en el análisis de componentes principales.

Otro de los objetivos principales en la selección es la obtención de genotipos tolerantes o resistentes a la roya de la corona. Si bien en el presente estudio no se pudo calcular el componente genético del porcentaje de tejido verde afectado por la enfermedad, se realizaron conteos de las plantas afectadas a partir de la segunda quincena de octubre hasta la primera semana de noviembre. Esto permitió detectar un grupo de poblaciones menos afectado (16, 9 y 6), y otro grupo con mayor afectación (33 y 32).

El agrupamiento de las plantas por fechas de floración, permitió también observar que en el grupo de floración tardía, se ubicaron las poblaciones más rendidoras en producción de materia seca y algunas de ellas con muy buen comportamiento ante la roya.

Del total de poblaciones estudiadas, las poblaciones 10, 25 y 28 fueron intermedias en floración, de muy buena producción de materia seca, elevado rendimiento de semilla y con un bajo porcentaje (menor al 20%) de afectación por roya. Estas poblaciones fueron las elegidas para continuar con los estudios moleculares.

La caracterización molecular de las 7 poblaciones analizadas, permitió detectar una importante variabilidad genética entre poblaciones y dentro de poblaciones. La diversidad genética se explicó sobre todo por el componente intra-poblacional (88%).

Los marcadores tipo SSR analizados en este estudio, permitieron discriminar la mayoría de las poblaciones, a excepción de las poblaciones 10 y 25, la población 28 se separó de las restantes poblaciones.

Las caracterizaciones molecular y agronómica en las poblaciones naturalizadas de raigrás anual diploide, demostraron la utilidad de tratar ambas técnicas en conjunto en el proceso de caracterización de genotipos para ser incorporados a futuros programas de mejoramiento genético de la especie.

7. BIBLIOGRAFIA

- Allard, R. W. (1970) Principios de la mejora de las plantas. – La Habana. Instituto Cubano del Libro. – 472 p
- Alonso, S. (1991). Variabilidad en poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam. naturalizadas en los pastizales de la provincia de Buenos Aires. Tesis Ms. Sc. UNMdP, Escuela de Postgrado en Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, pp 32.
- Alonso, S. (2004). Evaluation of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) populations naturalized in the flooding pampa of Argentina: I-Morphological and physiological characters at juvenile stage. Genetics Resources and Crop Evolution 51, 747-758.
- Amigone, MA y Kloster, AM (1997). Verdeos de invierno. En invernada bovina en zonas mixtas, Agro 2 de Córdoba. Capítulo II: 37-56. INTA, Centro Regional Córdoba, EEA INTA Marco Juárez.
- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley S.D. y Sorrells M.E., (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome, 36: 181-186.
- Andrés, A y Cordero, J., (1995). Aspectos genéticos-ecológicos de *Bothriochloa laguroides* (DC). Pilg I. Variabilidad genética. Informe técnico N° 301, INTA. Centro Regional Buenos Aires Norte. EEA Pergamino.
- Andrés, A. y Bertín, O., (1998). Aspectos productivos y sanitarios de cuatro cultivares tetraploides de raigrás anual. Revista de Tecnología Agropecuaria. 3,9:30-32. INTA. EEA Pergamino.
- Andrés, A. y Bertín, O., (1999). Interacción genotipo-ambiente en la producción de semilla de pasto ovinillo: efecto del riego. Actas XXIX Congreso argentino de genética. XXXII Congreso de la sociedad de genética de Chile. III Jornadas chileno-argentinas de genética. Rosario, Argentina.

- Andrés, A. y Guillen, R., (2001). Variabilidad en el crecimiento de plántulas de agropiro alargado con diferentes peso de mil semillas. *Journal of Basic and Applied Genetics*. Actas XXX Congreso Argentino de Genética. IV Jornadas Argentino Uruguayas de Genética. pp 106-107.
- Andrés, A. y Rosso, B., (2004). Variabilidad genética en poblaciones naturalizadas de raigrás anual diploide. *Revista Argentina de Producción Animal*. Actas Congreso de Producción Animal. Tandil.
- Andrés, A., (1987). Variabilidad genética en poblaciones naturales de *Agropyron scabrifolium* (Doell). Parodi. Tesis de Ms Sc. Pergamino INTA-UNR Curso de Posgrado en Mejoramiento Vegetal.
- Andrés, A., (1999). Comportamiento frente a la roya de la hoja de cultivares comerciales de raigrás anual. *Revista de Tecnología Agropecuaria*. 4,10: 2-6. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino.
- Andrés, A., Ivancovich, A. y Pérez, A. (2000) Selección por resistencia a roya de la corona (*Puccinia coronata*) de familias de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.). *Revista de Tecnología Agropecuaria*. 5,15: 54-56. INTA. EEA Pergamino.
- Andrés, A., Rosso, B. y Ruíz Díaz, M (1998). Caracterización morfológica y fitopatológica de materiales de pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.) pertenecientes al Banco Activo de Germoplasma de la EEA Pergamino INTA. XVI Seminario Panamericano de Semilla. Rueda de Negocios. Buenos Aires. Argentina. pp71.
- Andrés, A., Rosso, B., De Battista, J y Acuña, M. (2005) Genetic variability between adapted populations of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) in Argentina. Molecular breeding for the genetic improvement of forage crops and turf. Proceedings of the 4th international symposium on the molecular breeding of forage and turf, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress, July 2005, Aberystwyth, Wales. pp.275

- Anónimo, (2005). Curso de Evolución 2005. Facultad de Ciencias Montevideo Uruguay.
<http://evolucion.fcien.edu.uy/>
- Ansín, O., Berthold, M. A. y Moltoni, G. A., (2007). Efectos del pastoreo y técnicas de promoción de raigrás en el forraje acumulado de un pastizal de la pampa deprimida bonaerense. *Revista de producción animal* 27 (supl. 1): 222-223.
- Aramendía, L. (2005). El género *Lolium*. Claves dicotómicas. *Revista. Real Academia de Ciencias. Zaragoza.* 60: 143–155
- Armstead, I. P., Turner, L. B., King, I. P., Cairns, A.J., y Humphreys, M.O., (2002). Comparison and integration of genetic maps generated from F2 and BC1-type mapping populations in perennial ryegrass. *Plant Breed.* 121: 501–507.
- Balasko J.A., Evers, G.W. y Duell R.W., (1995). Bluegrasses ryegrasses and bentgrasses. In: Barnes R.F., Miller D.A., and Nelson C.J. (eds) *Forages. Vol 1. An introduction to grassland agriculture.* 5th ed. Iowa State Univ. Press. Ames, IA, USA, 357-372.
- Balfourier, F., Charmet, G., Ravel, C., (1998). Genetic differentiation within and between natural populations of perennial and annual ryegrass (*Lolium perenne* and *Lolium rigidum*). *Heredity* 81: 100-110.
- Barcaccia, G., Lucchin, M y Parrini, P., (2003). Characterization of a flint maize (*Zea mays* var *indurata*) Italian landrace, II. Genetic diversity and relatedness assessed by SSR and Inter-SSR molecular markers. *Genetics Resources and Crop Evolution.* 50: 253-271.
- Barker, R., y Warnke, S., (2001). Application of molecular markers to genetic diversity and identity in forage crops. *Molecular breeding of forage crops.* Chapter 7: 135-148.
- Barrett, S.C.H. y Kohn J.R., (1991): Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: D.A. Falk, and K.E. Holsinger (eds), *Genetics and conservation of rare plants*, 3-30. Oxford University Press, New York,

- Barufaldi, M., (1999). Variabilidad genética en poblaciones adaptadas de *Dactylis glomerata* L. Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR, pp 87.
- Becerra, V. y Paredes, M., (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agric. Téc. p.270-281. Disponible en la World Wide Web: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072000000300007&lng=es&nrm=iso. ISSN 0365-2807
- Bennett, E. (1970). Adaptation in wild and cultivated populations. In: Genetic resources in plants – their exploration and conservation (IBP Handbook Number 11) Frankel, O.H and Bennett, E (Eds) Blackwell Scientific Publications, Oxford: 115-129.
- Bennett, S., Hayward, M y Marshall, D., (2002). Electrophoretic variation as a measure of species differentiation between four species of the genus *Lolium*. Genetic Resources and Crop Evolution. 49: 59-66.
- Bert, P.F., Charmet, G., Sourdille, P., Hayward, M.D., y Balfourier, F. (1999). A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 99: 445–452.
- Bertín, O. (2004). Componentes de rendimiento y producción de semilla de raigrás anual. <http://www.aapa.org.ar/congresos/2004/PpPdf/Pp45.PDF>
- Biessmann, H., y Manson, J.M. (1994). Telomeric repeat sequence. Chromosoma, 103: 154–161.
- Bolaric S, Barth S, Melchinger A, Posselt U, (2005). Molecular characterization of genetic diversity in European germplasm of perennial ryegrass. Euphytica, 146, 39.
- Bradshaw, A. (1971). Plant evolution in extreme environments. In: Ecological Genetics and Evolution, R. Creed (ed.). Blackwell, Oxford, pp 20-50.
- Bradshaw, A. (1984). Ecological significance of genetic variation between populations. In: Perspectives on plant population ecology, Dirzo, R y Saukhán J.(eds). Sinauer Associates Inc. Sunderland, U.S.A.. pp, 213-228.

- Bramardi, J.S., (2000). Estrategias para el análisis de datos en la caracterización de recursos fitogenéticos. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia
- Bramardi, S., Bernet, P., Asins, M y Carbonell, E., (2005). Simultaneous agronomic and molecular characterization of genotypes via the generalized procrustes analysis: an application to cucumber. *Crop Science* 45:1603-1609.
- Breese, E. y Tyler, B. (1986). Patterns of variation and the underlying genetic and cytological architecture in grasses with particular referente to *Lolium spp.* In: Styles, B.T. ed Intraespecific classification of wild and cultivated plants, pp. 53-69. Clarendon Press., Oxford U.K.
- Breese, E., y Charles, A., (1962). Populations studies in ryegrass. *Rep. Welsh Plant Breed. Stat.* 1961: 31 3-34.
- Briggs, D. y Walters, S., (1984). Plant variation and evolution. Second Eddition Cambridge University Press, Cambridge, pp. 412.
- Brizuela, M., Cahuepe, M., Cid, M., Viviani Rossi, E., Fernandez Greco, R.C. y Yagueddu, C., (1983). Estimación de la composición botánica de la dieta de vacunos en un pastizal natural. II Efecto del animal y periodo de muestreo. *Rev. Animal* 10, pp. 395-403.
- Brown, C., y Jain, S., (1979). Reproductive system and pattern of genetic variation in two *Limnanthes* species. *Theory. Appl. Genetic* 54, pp. 181-190.
- Bugge, G. (1984). Heritability estimates for forage yield, ear emergence and quality characteristics of the dry matter in *Lolium multiflorum* Lam. *Z. Pflanzenzucht.* 92: 321-327.
- Burton, G. y De Vane, E. (1953). Estimating heredability in tall fescue (*Festuca arundinacea*) from seed. 2. Floret site utilization. *J. Agric. Sci. Cambridge.* 90:269-274.
- Burton, G.W, (1952): Quantitative inheritance in grasses. *Proc 6th Int. Grassland Cong* (1). 227-283
- Cahuepé, M., Hidalgo, G., y Galatoire, A. (1985). Aplicación de un índice de valoración zootécnico en pastizales de la Depresión del Salado. *Rev. Producción Animal* 5, pp. 681-690.

- Callow, M.N., Michel, P. Baker, J.E., Cocks, P.S. y Houg, G.M. (2005). Response of herbage and water soluble carbohydrate concentration of ryegrass species to defoliation practices when grown in a Mediterranean environment. *Grass and Forage Science*, 60, 59-67.
- Calsyn, E., Ghesquiere, A., Baert, J. y De Riek, J., (2003). Study of genetic diversity between and within ryegrass populations of the ECP/GR collection by means of AFLP markers. Report of the 8th meeting of ECP/GR. Working Group on Forages, Linz Oostenrijk, April 10-12, 2003, 122-131.
- Carbonell, E.A., Pérez-Panadés, J., Bramardi, S.J., Asíns, M.J., (2003). Statistical issues in the characterization of genetic resources using multiallelic molecular markers. II Meeting Caribbean and Central American Region of International Biometry Society. Mayagüez, Puerto Rico.
- Carbonell, E.A., Pérez-Panadés, J., Bramardi, S.J., Asíns, M.J., (2002). Estudio comparativo de técnicas estadísticas para la caracterización de recursos fitogenéticos mediante marcadores moleculares codominantes multialélicos. II. Distancias genéticas. V Congreso Latinoamericano de Sociedades de Estadística, Buenos Aires, Resúmenes Pág. 47
- Casler, M., (1995). Patterns of variation in a collection of perennial ryegrass accessions. *Crop Science*. 35: 1169-1177.
- Castaño, J. (2005). Producción de semillas de gramíneas forrajeras en el sudeste bonaerense. Material didáctico N° 10, segunda edición. INTA Balcarce, 77pp.
- Castaño, J., Bertín, O., De Battista, J., Costa, M y Andrés, A., (2004). Interacción genético ambiental en la productividad de cultivares de raigrás anual. 27° Congreso Argentino de Producción Animal, 2004. <http://www.aapa.org.ar/congresos/2004/PpPdf/PP84.pdf>

- Castro, C., Oliveira, A., Carvalho, F., Maia, M., Mattos, L., y Freitas, F., (2003). Morphological and molecular characterization of italian ryegrass populations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 3(4) pp 245-254.
- Cerono, J. (1993). Variabilidad genética e identificación varietal en *Festuca arundinaceae* Schreb. cultivar El Palenque MAG. Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR, pp. 78.
- Charmet, G. y Belfourier, F., (1994). Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, Graminaceae). *Theor. Appl. Genet.* 87: 641-649.
- Clausen, J., Keck, D y Hielsel, W., (1940). Experimental studies on the nature species. The effect of varied environments on Western North American plants. *Cornegie Inst. Washington, Pub. 1. 520*, Washington, D.C. USA.
- Clausen, J., Keck, D y Hielsel, W., (1948). Experimental studies on the nature species. III Enviromental responses of climatic races of *Achillea*. *Cornegie Inst. Washington, Pub. 1. 581*.
- Cooper, JP y Edwards, KJR, (1961). The genetic control of leaf development in *Lolium*: I. Assessment of genetic variation. *Heredity* 16: 63-82.
- Cooper, JP y McColl, D. (1966). Energy conversion in the grass plant. *Rep. Welsh PI. Breed Stn* pp. 12-13.
- Cooper, JP. (1960). Selection and population structure in *Lolium*: IV Correlated response to selection. *Heredity* 14: 229-246.
- Cornish, M. A. Hayward, M. D. y Lawrence, M., (1979). Self-incompatibility in ryegrass. I. Genetic control in diploid *Lolium perenne* L. *Heredity* 43:95-106.
- Crisci, J., y López Armengol, M., (1983). Serie Biología. Monografía: Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. OEA, 1983. 1-132. 26 i-vi:
- Davies, W. (1960) *The Grass Crop*. Spon, London.

- De Battista, J., Andrés, A. y Costa, M., (2000). Evaluación de la variabilidad genética en cultivares tetraploides y diploides de raigrás anual (*Lolium multiflorum* L.). Revista Argentina de Producción Animal Vol. 20 Sup. I. 133.
- De Battista, J., Andrés, A., Giammaria, S., y Costa, M., (2001). Genetic variation and genotype by environment interaction of crown rust resistance in annual rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.). Proceedings of the XIX International Grassland Congress. Brazil, pp. 489-490.
- Defacio, R.A.; Paz, N.M.; Scropanich, F.M.; Bramardi, S.J.; Schlatter, A.R.; Ferrer, M.E. Análisis de 40 poblaciones locales de maíz (*Zea mays*) de la raza cristalino colorado en base a marcadores agro-morfológicos y moleculares. XXXVI Congreso Argentino de Genética. Pergamino, Argentina. 23 – 26 de septiembre de 2007.
- Diaz, M, Echenique, V, Schrauf, G., Cardone, S., Polci, P., Lutz, E. y Spangenberg, G., (2004). Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras. RIA, 33 (3), pp 77-104, INTA.
- Diaz-Zorita, M. y Gonella, C., (1995). Fertilización nitrogenada de verdeos de invierno en la región noroeste bonaerense. I. Producción primaria neta. Revista Productiva Animal 15 (1), pp. 216-218.
- Donaghy, D.J, Scott, J. M. y Fulkerson, W. J. (1997) Effect of defoliation frequency and summer irrigation on survival of perennial (*Lolium perenne*) and biennial (*Lolium multiflorum*) ryegrass in the subtropics. Australian Journal of Experimental Agriculture 37(5) 537 – 545
- Donaghy, D.J. y Fulkerson, W. J., (1996). Persistence of temperature pasture in a subtropical environment. Proceedings of the 8th Australian Agronomy Conference 1996
- Donaghy, D.J. y Fulkerson, W. J., (1997). The importance of water-soluble carbohydrate reserves on regrowth and root growth of *Lolium perenne* L. Grass and Forage Science Volume 52, Issue 4, 401-407.

- Edwards, K. J.R. y Cooper, J.P., (1963). The genetic control of Leaf development in *Lolium*: II. Response to selection. *Heredity* 18: 307-317.
- Edwards, K., y Emara, Y., (1970). Variation in plant development within a population of *Lolium multiflorum*. *Heredity* 25: 179-194.
- Elgesma, A., Den Nijs, A., y Van Eeuwijk., (1989). Genetic variation for seed yield components of Westerwold ryegrass (*Lolium multiflorum* var *westerwoldicum*). *Netherlands Journal Agricultural Science* 37: 119-127.
- Ernst, W.H.O., (1987). Population differentiation in grassland vegetation. En: J. Van Andel y col. (eds). *Disturbance in grasslands*. pp 214-228. Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht.
- Falconer, D. S. (1989). *Introducción a la genética cuantitativa*. Compañía Editorial Continental. México 383 pp.
- Fernández, E., Arzadún, M., Jobbagi, E., e Ibarra, C., (2003) Producción de raigrás anual según fecha de siembra y genotipo. En 26° Congreso Argentino de Producción Animal, 2003. <http://www.aapa.org.ar/congresos/2003/PpPdf/Pp77.PDF>
- Fernández, O., Pereira, M., Agnusdei, M., Colabelli, M. Vignolio, O., (2008) Degradación de pastizales asociada a la promoción de raigrás en la pampa deprimida. *Revista de producción animal* 28 (supl. 1): 395-396.
- Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D., (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. EMBRAPA, 220pp
- Fjellheim, S., Blomlie, A., Marum, P. y Rognili, O., (2007) Phenotypic variation in local populations and cultivars by utilizing wild germplasm. *Plant Breeding*. 126: 279-286.
- Fjellheim, S. y Rognili, O., (2005). Molecular diversity of local Norwegian meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) populations and Nordic cultivars-consequences for management and utilization. *Theor. Appl. Genet.* 111:640-650.

- Ford-Lloyd, B.V. y Jackson, M., (1986). Plant genetic resources: an introduction to their conservation and use. Edward Arnold, London, U.K. 152 p.
- Forster, J.W., Jones, E.S., Kolliker, R., Drayton, M.C., Dumsday, J., Dupal, M.P., Guthridge, K.M., Mahoney, N.L., van Zijll de Jong, E., y Smith K.F. (2001). Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. *In* Molecular breeding of forage crops. *Edited by* G. Spangenberg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 101–133.
- García, M. V. (2001). Análisis de la variabilidad intra e interpoblacional en *Paspalum dilatatum* Poir. Tesis Doctoral, UNLP.
- Giammaria, S.L. (2003). Interacción genotipo por ambiente en caracteres morfofisiológicos y patométricos de familias de medios hermanos de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.). Tesis de Master, UNR-INTA.
- Gower, J.C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods in multivariate analysis. *Biometrika* 53:315-328.
- Gower, J.C. (1975). Generalised Procrustes Analysis. *Psychometrika* 40:33-51.
- Gregorious, H.R. (1974). Genetischer abstand zwischen populationen. 1. Zur konzeption der genestichen abstandsmessung. *Silvae Genet.* 23:22-27.
- Gregorious, H.R. (1984). A unique genetic distance. *Biom. J.* 26:13-18.
- Guillén, R. (2002). Variabilidad genética en caracteres de interés agronómico en agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth et Dewey) cultivar “El Vizcachero INTA”. Tesis de Master. UNR-INTA.
- Guthridge K.M., Dupal, M.P., Kölliker, R., Jones, E.S. Smith, K.F. y Forster, J.W., (2001). AFLP analysis of genetic diversity within and between population of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), *Euphytica*. 122: 191-201.

- Gutiérrez, L.M., y Viviani Rossi, E.M., (1997). Fertilización con nitrógeno y parámetros cualitativos en silajes de raigrás anual. *Revista Argentina de Producción Animal*. Vol. 17 Sup. I. 182-183.
- Hamrick, J. (1979). Genetic variation and longevity. In: Solbrig, O., Jain, S, Jonson, G and Raven, P (Eds), *Topics in Plant Population Biology*. Columbia Univ. Press., New York, pp. 67-85.
- Hamrick, J.L. y Allard, R.W., (1972). Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2100–2104.
- Hannaway, D., Fransen, S., Cropper, J., Teel, M., Chaney, M., Griggs, T., Halse, R., Hart, J., Cheeke, P., Hansen, D., Klinger, R. y Lane, W. (1999). Annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) <http://eesc.orst.edu/agcomwebfile/edmat/html/pnw/pnw501.pdf>
- Hayward, M. D. y McAdam, N., (1977). Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne* L. *Z. PflZücht.*, 79:68-79.
- Hedrick, P., Ginevan, M. y Ewing, E., (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 7: 1-32.
- Hirata, M., Cai, H., Inoue, M., Yuyama, N., Miura, Y., Komtsu, T., Takamizo, T. y Fujimori, M., (2006). Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theor Appl Genet*. 113: 270-279.
- Huff, D. R. (1997). RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Science*. 37:557-564.
- Hume, D. E. (1991). Primary growth and quality characteristics of *Bromus willdenowii* and *Lolium multiflorum*. *Grass and Forage Science*. 46: 313-324.
- Humphreys, M. O. y Hides, D. H., (1997). Extension of Annual Production. En: *Seeds of progress*. Ed. J.R. Weddell. BGS Occasional Symposium 31:94-104.

- InfoStat/Profesional. Versión 1.1. Universidad Nacional de Córdoba. Estadística y Diseño. Facultad de Agronomía.
- Innis, M.A. y Gelfand, D.H., 1990. Optimization of PCRs. pp. 3-12 in: PCR Protocols (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Academic Press, New York. <http://www.mcb.uct.ac.za>
- Inoue, M. y Cai, H. (2004) Sequences analysis and conversion of genomic RFLP markers to STS and SSR markers in Italian ryegrass. *Breeding Science*, 54: 245-251.
- Inoue, M., Gao, Z., Hirata, M., Fujimori, M. y Cai, H., (2004). Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers. *Genome*, 47. 57-64.
- Jahuar, P.P. (1993) Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* Complex: Relevance to Breeding. SpringerVerlag, Berlin, Germany, p 254.
- Jain, S. (1975). Population structure and the effects of breeding system. In: Frankel, O. and Hawkes, J. Crop genetic resources for today and tomorrow. London, pp. 15-36.
- Jewis, O. (1972). Tillering in grass: its significance and control. *Journal British Grassland Society*. 27: 65-82.
- Jones, E.S., Dupal, M.P., Kölliker, R., Drayton, M.C., Forster, J.W., (2001). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet*, 102:405-415.
- King, I., King, J., Armestead, I., Harper, J., Roberts, L., Thomas, H., Ougham, H., Jones, R., Thomas, A., Moore, B., Huang, L. y Donnison, I., (2005). Introgression mapping in the grasses. In: Molecular breeding for the genetic improvement of forage crops and turf. Proceedings of the 4th international symposium on the molecular breeding of forage and turf, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress, July 2005, Aberystwyth, Wales. pp.275
- In: XX International Grassland Congress.

- Kirigwi, F., Zwonitzer, J., Mian, M., Saha, M., (2008). Microsatellite markers and genetic diversity assessment in *Lolium tumulentum*. Genet Resour Crop Evol. 55:105-114.
- Kleinhofs, A., Kilian, A., Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Hayes, P., Chen, F. Q., Lapitan, N., Fenwick, A., Blake, T. K., Kanazin, V., Ananiev, E., Dahleen, L., Kudrna, D., Bollinger, J., Knapp, S. J., Liu, B., Sorrells, M., Heun, M., Franckowiak, J. D., Hoffman, D., Skadsen, R. & Steffenson, B. J. (1993) A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. Theoretical Applied Genetics 86, 705-712
- Kölliker, R., Stadelmann, F., Reidy, B. y Nösberger, J., (1999). Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L. and *Dactylis glomerata* L.. Euphytica 106: 261-270.
- Kubik, C., Sawkins, M., Meyer, W. y Gaut, B., (2001). Genetic Diversity in Seven Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). Cultivars Based on SSR Markers. Crops Science. 41: 1565-1572.
- Labate, J., Lamkey, K., Mitchell, S., Kresovich, S., Sullivan, H. y Smith, J., (2003) Molecular and Historical Aspects of Corn Belt Dent Diversity. Crop Science 43:80-91.
- Lamote, V., Baert, J., Roldán-Ruiz, I., De Loose, M. y Van Bockstaele, E., (2002). Traicing of 2n egg occurrence in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) using interploidy crosses. Euphytica, 123: 159-164.
- Lancashire, J.A. y Latch, G.C.M., (1966). Some effects of crown rust (*Puccinia coronata* Corda) on the growth of two ryegrass varieties in New Zealand. New Zealand Journal of Agricultural Research. 9: 628-640.
- Lentz, E., y Buxton, D., (1991). Morphological traits and maturity Group relations with digestibility of orchardgrass. Crop. Science. 31 (6): 1555-1560.
- Loss, B.P., (1994) Morphological variation in Dutch perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations, in relation to environmental factors. Euphytica. 74: 97-107.

- Loveless, M. y Hamrick, J., (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. (15), pp. 65-95.
- Lübberrstedt, T. (2005). Objectives and benefits of molecular breeding in forage species. In: XX International Grassland Congress.
- Maddaloni J y Ferrari, L.. (2001). Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. INTA – Universidad Nacional de Lomas de Zamora, 520 pp.
- Malik, C. P., y Thomas, P. T., (1966). Karyotypic studies in some *Lolium* and *Festuca* species. *Caryologia* 19:167-196.
- Mantel, N. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* 27, 209-220
- Marino, M.A., Mazzanti, A. y Echeverría, H.E., (1995). Fertilización nitrogenada en cultivos forrajeros anuales de invierno en el sudeste bonaerense. I. Crecimiento y acumulación de forraje. *Revista Argentina de Producción Animal*. 15, 1:179-182.
- Mariotti, J. (1986). Fundamentos de genética biométrica. Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal. O.E.A. Serie Biológica. Monografía N°32. 153pp.
- Marshall, D.R. y Brown, A.H.D., (1983). Theory of forage plant collection. In: McIvor, J.G. and R.A. Brays (eds) *Genetic Resources of Forage Plants*. Pp. 135-148. CSIRO, Melbourne
- Mazzanti, A., Castaño, J., Sevilla, G. y Orbea, J. (1992). Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la Pcia. de Buenos aires. CERBAS. INTA Balcarce.
- McLean, S. y Watson, D., (1992) Divergent selection for anthesis date in annual ryegrass. *Crop Science*. 32:847-851.
- Monteverde, M. y De Battista, J., (2008). Variabilidad genética en poblaciones naturalizadas y cultivares de raigrás anual diploide (*Lolium multiflorum* Lam.). XXXVII Congreso Argentino de Genética. Pergamino, Argentina. 21 – 24 de septiembre de 2008.

- Morgante, M. y Olivieri, M., (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Muyllé, H., Baert, J. Van Bockstaele, E., Moerkerke, B., Goetghebeur, E. y Roldán-Ruíz, I., (2005). Identification of molecular markers linked whit crown rust (*Puccinia coronata* F sp *lolii*) resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers and a bulked segregant approach. *Euphytica*, 143: 135-144.
- Nei, M. (1977). F statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum. Genet.* 41: 225-233.
- NIAB. (1988). Diseases of grasses and herbage legumes. National Institute of Agricultural Botany. Cambridge.
- Oliveira, J. y López, J., (1999). Caracterización de poblaciones españolas de *Lolium rigidum* Gaud., para caracteres agro-morfológicos e isoenzimáticos. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* Vol 14(3) 454-463.
- Oliveira, J.A., Balfourier, F., Charmet, G., Arbonese, E., (1997). Isozyme polymorphism in a collection of Spanish and French perennial ryegrass populations. *agronomie* 17: 335-342.
- Pagano, E. (1993). Variabilidad genética de la población de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) “El Lucero MAG”. Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR, pp. 90.
- Parodi, L. (1964). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Ganadería. Ed ACME S.A.C.I. Bs As. pp 149-151
- Peakall, R. y Smouse, P.E., (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Pearson, C. e Ison, R., (1994). Agronomía de los sistemas pastoriles. Ed. Hemisferio Sur: 27-46.

- Peter-Schmid, M., Boller, B. y Kölliker, R., (2008). Habitat and management affect genetic structure of *Festuca pratensis* but not *Lolium multiflorum* ecotype populations. Plant Breeding. Journal Compilation: 1-8.
- Picca, A., Helguera, M., Salomón, N. y Carrera, A., (2004). IV. Marcadores Moleculares. En Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Argenbio-INTA. 61-68.
- Potter, R.L. (1987). Effects of crown rust on regrowth, competitive ability and nutritional quality of perennial and Italian ryegrasses. Plant Pathology. 36, 455-461.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. y Rafalsky, A., (1996). The comparison of RFLP, RPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers. Conservation Biology 12(4):844-855.
- Prevosti, A. (1974). La distancia genética entre poblaciones. Miscellanea Alcobé. Universidad de Barcelona. España.
- Price, T., (1987). Ryegrass rust in Victoria. Plant Protection Quarterly. 2:189.
- Raja, H. y Bean, E.W. (1979). Seed development and seed shedding in North Italian ecotypes of *Lolium multiflorum*. Grass and Forage Science. 34: 221-227
- Rashal, I. y Kholms, I., (1983) Variability and correlation of quantitative characters of Westerwolds ryegrass (*Loilum multiflorum* var. westerwoldicum Mans.) [Genotypes, phenotypes, heritability coefficients]. Soviet Genetics. 19: 1574-1579.
- Reed, D. (2005). Relationship between population size and fitness. Conserv. Biol. 19:563-568.
- Rhebergenm, H. (1985). Microevolutionary processes in *Festuca rubra*. Thesis Vrije Universiteit Amsterdam.
- Rhodes, I. (1971). The relationships between productivity and some components of canopy structure in ryegrass (*Lolium* spp.): II. Yield, canopy structure and light interception. Journal of Agricultural Science. (Cambridge) 77: 283-292.

- Rhodes, I. (1973). The relationships between productivity and some components of canopy structure in ryegrass (*Lolium* spp.): III. Spaced plants characters, their heritabilities and relationship to yield. *Journal of Agricultural Science. (Cambridge)* 80: 171-176.
- Rohlf, F.J. (2002). NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd. Setauket. NY.
- Rosso, B. (2002). Evaluación preliminar de germoplasma introducido y naturalizado de raigrás anual. *Revista de Tecnología Agropecuaria*. Vol 2 N° 20.
- Rosso, B. y Andrés, A., (2001). Preliminary evaluation of naturalized Italian ryegrass population in Buenos Aires province, Argentina. *Plant Genetic Resources Newsletter*. N° 128: 51-54.
- Rosso, B., Cuyeu, A., Pagano, E., Rimieri, P., Ríos, R. (2007). Caracterización de ecotipos argentinos de *Festuca arundinacea* schreb.
- Ruiz Díaz, M. (2000). Caracterización morfofisiológica y fitopatológica de una colección de pasto ovinillo (*Dactylis glomerata* L.) del Banco de Germoplasma de la EEA Pergamino (INTA). Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR.
- Ruiz Díaz, M. y Andrés, A., (1998a). Variabilidad de caracteres relacionados a la producción de semilla de pasto ovinillo (*Dactylis glomerata* L.). *Revista de Tecnología Agropecuaria*.. 3(9), pp 25-29.
- Rybicki, E. (2005). PCR primer design and reaction optimization. *Molecular Biology Techniques Manual*. Third Edition. Edited by: Coyne, V., James, M., Reid, S., and Rybicki, E. <http://www.mcb.uct.ac.za>
- Sacido, M. y Latorre, E., (2006) Acumulación de materia seca de ocho cultivares de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.) <http://www.aapa.org.ar/congresos/2006/PpPdf/PP68.pdf> ;
- SAGPyA, 2000 www.sagpya.mecon.gov.ar/

- SAS Institute (2008). SAS/STAT procedures. SAS Technical report. SAS Institute Inc, Carry, NC. Singh y Chaudhary.
- Schaal, B y Smith, W., (1980). The apportionment of genetic variation within and among populations of *Desmosium nudiflorum*. *Evolution*, 34 (2), pp. 214-221.
- Schemeske, D. (1984). Population structure and local selection in *Impatiens pallida* (*Balsaminaceae*), a selging annual. *Evolution* 38 (4), pp. 817-832.
- Schlatter, A. R., Glovagnoli, N., Ornella, L., Alvarez, P., (2002). Utilización de marcadores moleculares en programas de investigación y servicios. *Revista de tecnología Agropecuaria – INTA-Pergamino*
- Schultze-Kraft, R. (1990). Caracterización y evaluación preliminar de germoplasma de plantas forrajeras. *Diálogo XVIII-Introducción, conservación y evaluación de germoplasma forrajero en el Cono Sur*. IICA-PROCISUR, Montevideo, Uruguay, Ed. J.P. Puignau. pp 319-326.
- Seaney, R. (1974). In *Forages. "The Sciences of Grassland Agriculture"* M.E. Heath, D.S. Metcalfe and R.F. Barnes, (Eds), Iowa State Univ. Press. Ames. pp 177-188.
- Shing, M., Ceccarelli, S. y Hamblim, J., (1993). Estimation of heritability from varietal trials data. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 437-441.
- Singh, R. y Chaudhary, B., (1979). *Biometrical methods in quantitative genetic analysis*. Kalvani Publishers. New Delhi. 304pp.
- Smeatham, M. (1972). In *"Pastures and Pastures Plants"* R.H. Langer, (Ed.). Reed, Wellington, New Zeland. pp 179—228.
- Smith, K., Lee, C., Borg, P. y Flinn, P., (1994). Yield, nutritive value, and phenotypic variability of tall wheatgrass grown in a nonsaline environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 34: 609-614.

- Snaydon, R. (1978) Genetic changes in pasture population. In: Plant relations in Pasture, Wilson, J. CSIRO. Melbourne, pp. 253-269.
- Snaydon, R. (1984). Intraespecific variation and its taxonomic implications. In: Systematics Association Special (25). In: Current concepts in plant taxonomy. Academic Press, London and Orlando, pp. 203-217.
- Sneath, P.H.A. y Soakal. R. R., (1973). Numerical Taxonomy. WH Freeman & Co. San Francisco (USA).
- Sokal, R. y Rohlf, F., (1981). Biometry. WH Freeman and Company. 859 pp.
- Soulé, M. (1973). The epistasis cycle: a theory of marginal populations. Ann. Rev. Ecol. Syst. (4), pp. 165-187.
- Stace C.A. y Cotton R. (1980) *Lolium* L. En Flora Europea, tomo V, pp. 153-154.
- Studer, B., Widmer, F., Enkerli, J. y Kölliker, R. (2006) Development of novel microsatellite markers for the grassland species *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. Molecular Ecology Notes. 2006 6, 1108-1110.
- Sugiyama, S., Yoneyama, M., Takahashi, N. y Gotoh, K., (1985). Canopy structure and productivity of *Festuca arundinacea* Schreb. sward during vegetative and reproductive growth. Grass and Forage Sci. 40: 40-55.
- Takahashi, W., Komatsu, T., Fujimori, M., Takamizo, T., (2004) Screening of regenerable genotypes of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Plant Prod Sci 7:55-61
- Terrel E.E. (1968). A Taxonomic Revision of the Genus *Lolium*. Technical Bulletin 1392, U.S. Dept. of Agriculture. Washington DC.
- Thom, E.R., Waugh, C.D., y McCabe, R.J. (1998). Growth and persistence of perennial and hybrid ryegrasses when grazed by dairy cows in the central Waikato region of New Zealand. New Zealand Journal of Agricultural Research. 41:477-486.

- Thomas, H., y Humphreys, M. O., (1991). Review: progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. J. Agric. Sci. 117: 1—8.
- Thomas, H.M., Morgan, W.G., Meredith, M.R., Humphreys, M.W., Thomas, H. y Leggett, J.M., (1994). Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* and *Festuca pratensis* by genomic in situ hybridization. Theor. Appl. Genet. 88:909–913.
- Thomas, J.E. (1997) The significance of disease as a limiting factor to variety performance potential. In: Seeds of progress. Ed. J.R. Weddell. *BGS Occasional Symposium* 31: 114-123
- Tilman, D. y Downing, J., (1994). Biodiversity and stability in grasslands. *Nature* 367, 363-365.
- Traverso, J. y von der Phalen, A., (1982). Variabilidad en *Bromus aleuticus* (Trin ex Ness). Publicación Técnica N° 41. EEA Pergamino, INTA, pp. 12.
- Turesson, (1922). The genotypical response of the plant soecies to the habitat. *Heredities* (3), pp. 211-350.
- Twanley, B. (1967). Seed size and seedling vigor in birdsfoot trefoil. *Crop Science*. 14:87-90
- Twanley, B. (1974). Recurrent selection for seedling vigor in birdsfoot trefoil. *Can. J. Pl. Sci*
- Tyler, B., Hayes, J. y Ellies Davies, W., (1985). Forage grass descriptors. CEC, IBPGR Rome. 30pp
- Tyler, B.F., Chorlton, K.H., Thomas, I.D., (1987). Chapter 1: Collection and field sampling techniques for forage. In *Collection, Characterization and Utilization of Genetic Resources of .Temperate Forage Grass and Clover*. IBPGR, Roma. pp 3-10.
- Van Valen, L. (1965). Morphological variation and the width of the ecological niche. *Amer. Naturalist* 94, pp., 377-390.
- Vandewalle, M. (2007). DNA markers assisted selection for yield and quality traits in italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor (Phd) in Applied Biological Sciences.

- Vásquez, M. y Barberis, L., (1982). Variación estacional de la concentración de nitratos en el suelo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias. INTA. Vol. .XVII N ° 1: 13-22.*
- Walters, R.J.K. (1984). D value: the significance of small differences on animal performance. In: *The Grass Ley today. Proceedings of the 18th NIAB crop Conference. 60-68.*
- Wang, Z., Hopkins, A. y Mian, R., (2001). Forage and turf grass biotechnology. *Critical Reviews in Plant Science*, 20(6): 573-619.
- Warnke, S.E., Barker, R.E., Jung, G., Sim, S.C., Mian, R., Saha, M.C., Brilman, L.A. Dupal, M.P. y Forster, J.W., (2004). Genetic linkage mapping of an annual x perennial ryegrass population. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 294-304.
- Warren, J., Raybould, A., Ball, T., Gray, A. y Hayward, M., (1998). Genetic structure in the perennial grasses *Lolium perenne* and *Agrostis curtisii*. *Heredity*. 81: 556-562.
- Weising, K., Beyermann, B., Ramser, J. y Kahl, C., (1991) Plant DNA-fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis*, 12: 159-169.
- Wightman, P., Franklin, M., y Younie, D., (1997). The effect of sward height on responses of mini-swards of perennial ryegrass/white clover to slurry application. *Grass and Forage Science*. 52: 42-51.
- Wilkins, P.W. y Humphreys M.O. (2003). Progress in breeding perennial forage grasses for temperate agriculture. *The Journal of Agricultural Science*. 140, 129-150.
- Wright, S. (1951). The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* (15), pp. 323-354.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations. Vol 4, Variability in and among natural populations.* University of Chicago Press, USA.
- Yamashita, M. y Sawada, H., (1999) Genetic diversity of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Collected from Japan, France and Germany. *Grass. Sci.* 45(3): 290-298.

- Young, A., Boyle, T. y Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol.* 11, 413-418.
- Zarroug, K., Nelson, C. y Coutts, J., (1983). Relationship between tillering and forage yield of tall fescue. *Yield Crop Science.* 23: 333-337.