



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**ESTUDIOS GENÉTICOS DE FESTUCA ALTA (*FESTUCA ARUNDINACEA*
SCHREB. VAR. *ARUNDINACEA*) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR
SALINIDAD Y SEQUÍA**

LIC. NATALIA SOLEDAD PALACIOS

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Ing. Agr. PhD. ADRIANA NOEMÍ ANDRÉS

CO- DIRECTOR: Ing. Agr. ANTONIO HORACIO DÍAZ PALEO

AÑO 2023

**ESTUDIOS GENÉTICOS DE FESTUCA ALTA (*FESTUCA ARUNDINACEA*
SCHREB. VAR *ARUNDINACEA*) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS POR
SALINIDAD Y SEQUÍA**

Natalia Soledad Palacios
Licenciada en Genética
Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA)

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Unidad Integrada UNNOBA-INTA, durante el período comprendido entre Julio de 2015 y febrero de 2020, bajo la dirección de la Ing. Agr. PhD. Adriana Andrés y la Co-dirección del Ing. Agr. Antonio Horacio Díaz Paleo.



Lic. Natalia Soledad Palacios
(Doctorando)



Ing. Agr. PhD. Adriana Noemí Andrés
(Director)



Ing. Agr. Antonio Horacio Díaz Paleo
(Co-director)

Defendida 4 de abril de 2023

AGRADECIMIENTOS

A mi directora la Ing. Agr. PhD. Adriana Andrés, por su confianza, ayuda y buena predisposición. Por guiarme profesionalmente y creer en mí desde mi graduación.

A mi co-director de tesis, el Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo, por su buena predisposición y por abrirme las puertas del laboratorio de biotecnología.

A todos los integrantes del sector de mejoramiento genético de especies forrajeras del INTA Pergamino, con especial mención a Javi, Nelson, Parra, Ivana, Cata y Emilce, que sin su ayuda no podría haber realizado todo este trabajo. Con el paso del tiempo, pasaron de ser compañeros a ser amigos.

A todos los integrantes del laboratorio de biotecnología del INTA Pergamino, por su compañía y ayuda. Especialmente a Dani, Vivi y Silvi que me alegraron los días, y a Agos, compañera incondicional y siempre dispuesta a ayudar.

A la ECANA (Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales de UNNOBA) que permitió que Eliano y Marcelino siempre estuvieran dispuestos a colaborar en tareas de campo, invernáculo y gabinete.

A la EEA INTA Pergamino por brindarme el espacio para desarrollar mis tareas diarias.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, por haberme formado como Licenciada en genética y por el financiamiento y beca otorgados para la realización del Doctorado.

A la CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires) por la beca otorgada que me permitió llevar adelante este Doctorado.

A Lujan, compañera de lucha.

A mis compañeros de ACA, por darme el tiempo necesario para terminar la redacción de esta tesis.

A mis padres y hermana por su apoyo incondicional, por transmitirme los verdaderos valores de la vida y por creer en mí.

A maxi por su amor, compañía y paciencia.

A Amparo, por ser mi luz todos los días.

A mi familia

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **Palacios, N.S.**, Díaz Paleo, A. y Andrés, A.N. **2016**. Caracterización molecular de germoplasma de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub). 39 Congreso Argentino de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal, vol 36, supl 1: pag 331.
- **Palacios, N.S.** y Andrés, A. **2016**. Colecta y caracterización molecular de poblaciones de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub) de la Provincia de Buenos Aires. Jornadas de becarios de posgrado. UNNOBA. Pergamino 19 y 20 de mayo.
- **Palacios, N.S.** y Andrés, A. **2016**. Caracterización molecular de poblaciones de *Festuca arundinacea* Schreb. Tercer Congreso Internacional Científico y Tecnológico. CIC, 1 de septiembre de 2016, La Plata, Buenos Aires.
- **Palacios, N.S.** y Andrés, A. **2016**. Caracterización molecular de poblaciones de *Festuca arundinacea* Schreb. V Jornada de Jóvenes Investigadores. UNNOBA. Pergamino. 3 de noviembre.
- **Palacios, N.S.** & Andrés, A.N. **2017**. Genetic diversity in seed yield of Argentinian collection of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). 9th International Herbage Seed Group (IHSG) Conference. Pergamino.
- **Palacios N.S.** y Andrés, A.N. **2017**. Caracterización morfológica de nueve poblaciones de festuca alta colectadas en el noroeste de la provincia de Buenos Aires. Journal of Basic & Applied Genetics, volumen 28, issue 1, pp: 149.
- Saccoccia, M; **Palacios, N.**; Franco Elisei, D.; Affinito, A.; Díaz Paleo, A.; Andrés, A. **2018**. Estudio genético de familias de medio hermanos de *Festuca arundinacea* en condiciones de salinidad. I Congreso Multidisciplinario de la UNNOBA. Junín, 19 al 21 de abril 2018.
- Franco Elisei, D., Affinito, A., Saccoccia, M., **Palacios, N.**, Diaz Paleo, A. y Andres, A. **2018**. Estudio de la tolerancia a salinidad en etapas vegetativas tempranas de familias de *Lotus tenuis*. I Congreso Multidisciplinario de la UNNOBA. Junín, 19 al 21 de abril 2018.
- **Palacios N. S.**; Lavandera, J.; Fioravanti N.; Andrés A. N. **2018**. Heredabilidad de la producción de forraje en poblaciones de festuca alta. 41 Congreso Argentino de Producción Animal (AAPA). Mar del Plata, 16 al 19 de octubre, 2018. ISBN-ISSN 2314-324x -Volumen: Vol 38(1)

- Saccoccia, M., **Palacios, N.** y Andres. A. **2019**. Selección de familias de medio hermanos de festuca alta (*Schedonorus Phoenix* (Scop.) Holub) por tolerancia a salinidad. VI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la UNNOBA.
- **Palacios, N.S.** y Andres, A.N. **2019**. Crecimiento inicial de familias de medio hermanos de festuca alta en condición de sequía. VI Congreso de la Red Argentina de Salinidad.
- **Palacios, N.S.** y Andres, A.N. **2020**. Selección de familias de medio hermanos de festuca alta (*Festuca arundinácea*) por tolerancia a sequía. XLVIII Congreso Argentino de Genética.
- **Palacios, N.S.**, Andres, A.N., Diaz Paleo, A. **2020**. Marcadores moleculares en la tolerancia a salinidad y sequía de familias de medios hermanos de festuca alta (*Festuca arundinácea*). XLVIII Congreso Argentino de Genética.

Otras publicaciones

- Acuña, M., Varea, I., Maciel, M., Affinito, A., **Palacios, N.** y Andrés, A. **2016**. Mejoramiento genético de agropiro alargado, festuca alta, *Lotus tenuis* y *Melilotus Albus*. Sexta Jornada Temática del INBA: "Como mejorar la producción forrajera en suelos afectados por sales". Facultad de agronomía UBA. 7 de diciembre de 2016. CONICET-FAUBA-RAS. **ISBN: 978-987-46433-0-8**
- Andrés, A., Acuña, M., Re, A., Mattera, J., Lavandera, J., **Palacios, N.** **2017**. Logros y avances en mejoramiento genético y evaluación de raigrás anual y festuca alta. XVII Reunión Anual de Forrajeras, ¿Cómo aumentar la producción forrajera en los sistemas mixtos? **ISBN:978-987-521-936-6**
- **Palacios, Natalia** y Martínez, Emilce. **2018**. festuca alta: distribución, utilización y mejoramiento. "Mejoramiento en festuca alta: estrategias de selección para ambientes marginales". XVIII Reunión Anual de Forrajeras. EEA-INTA Pergamino. **ISBN: 978-987-521-959-5**
- **Palacios, N.S.**; Díaz Paleo, A., Lavandera, J. y Andrés, A. **2019**. Colecta y caracterización molecular de poblaciones de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub) de la Provincia de Buenos Aires. Revista de Tecnología Agropecuaria (RTA), vol. 10, nº 39. EEA-INTA Pergamino. **ISSN digital: 2469-164X**

ÍNDICE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO.....	1
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Problemática actual	2
2. Los estreses abióticos: salinidad y sequía	4
2.1. Salinidad.....	4
2.2. Sequía	5
3. Efectos de la salinidad y la sequía en las plantas	6
4. El mejoramiento genético de la tolerancia a salinidad y sequía.....	7
4.1. Caracterización morfológica y molecular.....	8
5. Festuca alta: la especie en estudio	9
6. Hipótesis y objetivos	16
CAPÍTULO 1: COLECTA Y CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE POBLACIONES DE FESTUCA ALTA	17
INTRODUCCIÓN.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. El germoplasma estudiado	22
2. Acondicionamiento en invernáculo y trasplante a campo.....	22
3. Caracteres evaluados.....	25
4. Análisis de la información	29
4.1. Análisis de variancia entre poblaciones.....	29
4.2. Análisis de variancia dentro de poblaciones.....	29
4.3. Estimación del grado de determinación genética (GDG).....	29
4.4. Análisis Multivariado	30
RESULTADOS	31
1. Estadística descriptiva y análisis univariado.....	31
2. Análisis multivariado	43
3. Estimación de parámetros genéticos	45
DISCUSIÓN.....	47
1. Variabilidad genética entre las poblaciones	47

2. Variabilidad dentro de las poblaciones.....	50
3. Heredabilidad en sentido amplio.....	52
CONCLUSIONES.....	53
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE FESTUCA ALTA.....	54
INTRODUCCIÓN.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
1. El germoplasma estudiado.....	58
2. Extracción de ADN genómico	58
3. Cuantificación y dilución de ADN genómico.....	59
4. SSR utilizados	59
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	60
6. Resolución de los productos de amplificación.....	60
7. Análisis estadístico	63
7.1. Matriz básica de datos (MBD)	63
7.2. Software.....	63
7.3. Estructura poblacional.....	63
7.4. Descripción de marcadores moleculares.....	64
7.5. Estimación de la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones	64
7.6. Análisis multivariados.....	66
8. Análisis conjunto de la Caracterización morfológica y molecular.....	67
RESULTADOS	69
1. Extracción y cuantificación de ADN genómico	69
2. Amplificación del ADN genómico y selección de SSR informativos.....	70
3. Análisis y cuantificación de la variabilidad genética	70
4. Estructura poblacional.....	72
5. Análisis multivariados.....	73
6. Análisis espacial de la variabilidad genética (Mantel).....	77
7. Análisis conjunto de la Caracterización morfológica y molecular.....	77
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES	83

CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO INICIAL DE FMH DE FESTUCA ALTA BAJO CONDICIONES DE SALINIDAD EN HIDROPONIA	84
INTRODUCCIÓN.....	85
MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
1. El germoplasma estudiado.....	90
2. Estudio del crecimiento inicial de las FMH en condiciones de salinidad.....	90
3. Análisis de la información	94
4. Estimación de parámetros genéticos	95
5. Índice de tolerancia.....	96
RESULTADOS	97
1. Análisis univariados	97
2. Análisis multivariados.....	117
3. Estimación de parámetros genéticos	123
4. Índice de tolerancia.....	125
CONCLUSIONES	132
CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO INICIAL DE FMH DE FESTUCA ALTA BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA	133
INTRODUCCIÓN.....	134
MATERIALES Y MÉTODOS.....	138
1. El germoplasma estudiado	138
2. Estudio del crecimiento inicial de las FMH en condiciones de sequía.....	138
3. Análisis de la información	141
4. Análisis Multivariados.....	142
5. Estimación de parámetros genéticos	142
RESULTADOS	144
1. Análisis univariados	144
2. Análisis multivariados.....	160
3. Estimación de parámetros genéticos	164
4. Índice de tolerancia.....	165
DISCUSIÓN.....	168
CONCLUSIONES	172

CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FMH DE FESTUCA ALTA TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES A SALINIDAD Y SEQUÍA	173
INTRODUCCIÓN.....	174
MATERIALES Y MÉTODOS.....	176
1. El germoplasma estudiado.....	176
2. Extracción, cuantificación y dilución de ADN genómico	176
3. SSR utilizados	176
4. Análisis estadístico	178
4.1. Análisis de regresión lineal	178
4.2. Análisis de componentes principales	178
RESULTADOS	179
1. Extracción y cuantificación de ADN genómico	179
2. Amplificación del ADN genómico y selección de SSR informativos.....	179
3. Análisis y cuantificación de la variabilidad genética	180
4. Análisis de regresión lineal	184
5. Análisis de componentes principales	186
DISCUSIÓN.....	188
CONCLUSIONES.....	191
CONSIDERACIONES GENERALES.....	192
BIBLIOGRAFÍA.....	194
ANEXOS	221

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

µg: microgramo

µl : microlitro

ACoorP: Análisis de Coordenadas Principales

ACP: Análisis de Componentes Principales

ADN: Acido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismo de longitud de fragmento amplificado

Alt: altura

AMOVA: análisis de la varianza molecular

ANAVA: análisis de la varianza

APG: análisis de procrustes generalizado

ASNM: altura sobre el nivel del mar

C: control

Ca: calcio

CaCl₂: cloruro de calcio

CE: conductividad eléctrica

Cl⁻: anión cloruro

cm: centímetro

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

CV: coeficiente de variación

D.E: desvío estándar

DBCA: diseño en bloque completamente aleatorizado

DFDN: digestibilidad de la fibra detergente neutro

Diam: diámetro

dNTPs: desoxirribonucleótidos

dS: decisiemens

DVIVMS: Digestibilidad verdadera in vitro de la materia seca en base seca

ECANA: Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales (UNNOBA)

EDTA: acido etilendiaminotetraacético

EST-SSR : Expressed Sequence Tags

F: final

FDA: fibra detergente ácido

FDN: Fibra detergente neutro

FMH: familia de medio hermanos

g: gramo

GDG: grado de determinación genético

h²: heredabilidad en sentido estricto

INASE: instituto nacional de semillas
ITAlt: índice de tolerancia de la altura de planta
ITNmac: índice de tolerancia del número de macollos
ITPFA: índice de tolerancia del peso fresco aéreo
ITPSA: índice de tolerancia del peso seco aéreo
ITPSR: índice de tolerancia del peso seco de la raíz
ITPST: índice de tolerancia del peso seco total
Kb: kilo base
km: kilometro
km² : kilometro cuadrado
L: litro
Lpan: largo de panoja
LR: largo de raíz
M: molar
m: metro
MAS: Selección Asistida por Marcadores
Máx: valor máximo
MBD: matriz básica de datos
MCMC: Monte Carlo Markov Chain
MgCl₂: cloruro de magnesio
Mín: valor mínimo
ml: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
mmhos: milimhos
Na⁺: catión sodio
NaCl: cloruro de sodio
NaOH: hidróxido de sodio
ng: nano gramo
Nmac: número de macollos
Npan: número de panojas
Nram: número de ramificaciones por panoja
°C: grados centígrados
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PF: peso fresco
pH: potencial de hidrógeno
PIC: contenido de información polimórfica
PM: peso molecular
Pmil: peso de mil semillas

PS: peso seco
Psem: peso total de semillas
PSI: porcentaje de sodio intercambiable
PSR: peso seco de raíz
PST: peso seco total
RAPD: amplificación aleatoria de ADN polimórfico
RFLP: polimorfismo de longitud de fragmento de restricción
ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
S: sequía
S1: salino 1 (250 mM)
S2: salino 2 (500 mM)
SDS: dodecilsulfato sódico
SNP: polimorfismo de un solo nucleótido
SSR: repeticiones de secuencia simple
T1: tiempo 1
T2: tiempo 2
TBE: tris, ácido bórico, EDTA
Va: variancia aditiva
Ve: variancia ambiental
Vf: variancia fenotípica
Vg: variancia genética
VWC: contenido volumétrico de agua
W: watt o vatio

RESUMEN

Las pasturas cultivadas constituyen uno de los componentes principales en la alimentación de la ganadería argentina, la que en los últimos años fue reordenada en ambientes de menor potencial productivo por efecto de la expansión agrícola. Particularmente, la superficie sembrada con pasturas en la Región Pampeana fue desplazada hacia ambientes afectados por anegamiento temporario, salinidad, alcalinidad y sequías transitorias. La salinidad y la sequía constituyen la principal causa de pérdidas en los cultivos ya que impiden el desarrollo del potencial genético debido a que afectan negativamente el crecimiento, la producción de biomasa y el rendimiento de semillas. Las pasturas compuestas por gramíneas perennes como la festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb. Var *arundinacea*) son una herramienta valiosa para mejorar la capacidad productiva en los ambientes marginales. Los objetivos generales de la presente tesis fueron determinar la magnitud de la variabilidad genética entre y dentro de nueve poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico determinado en la región pampeana y analizar fenotípica y genéticamente el crecimiento inicial de familias de medio-hermanos (FMH), derivadas de dichas poblaciones, en condiciones de salinidad y sequía. Para esto se condujeron cinco experimentos; el primero y segundo experimento consistieron en la colecta y determinación de la variabilidad genética a nivel agronómico y molecular de las poblaciones; el tercer experimento estudió la respuesta a la salinidad en el crecimiento inicial de FMH en hidroponía (0mM, 250mM y 500mM de NaCl); el cuarto experimento estudió la respuesta a la sequía en el crecimiento inicial de las mismas familias y el quinto experimento consistió en la caracterización molecular de las FMH seleccionadas por su tolerancia o susceptibilidad a la salinidad y/o sequía. Los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 detectaron una importante variabilidad fenotípica y molecular entre y dentro de las poblaciones colectadas, las cuales podrían estar sujetas a procesos micro-evolutivos de expansión de la especie hacia ambientes restrictivos. A través del análisis de Procrustes Generalizado se observó un alto consenso en el ordenamiento de las FMH confirmando la utilidad de la evaluación morfológica y molecular en la caracterización de las poblaciones. El experimento realizado en condición de salinidad detectó una respuesta diferencial de las familias a los tratamientos impuestos y las estimaciones de heredabilidad en sentido estricto expresaron un importante componente heredable, principalmente en la condición salina intermedia (250mM de NaCl). Se seleccionaron FMH tolerantes y susceptibles al estrés a través del Índice de Tolerancia. El estudio de las familias en condición de sequía detectó diferencias en caracteres de crecimiento inicial, aunque las estimaciones de las varianzas y la heredabilidad de las variables de producción de forraje

fueron moderadas a bajas; probablemente porque la inducción de sequía fue moderada. A través del Índice de Tolerancia se seleccionaron FMH tolerantes y susceptibles. El último experimento permitió detectar 12 alelos con efectos significativos, lo que indicaría la relación con la tolerancia o susceptibilidad a salinidad y/o sequía. En términos generales la presente tesis doctoral generó conocimientos y aportó germoplasma utilizable en futuros programas de selección y obtención de cultivares de festuca alta tolerantes a salinidad y sequía, que resulten productivamente útiles en diferentes sistemas ganaderos de la Argentina.

ABSTRACT

In Argentina over the past years there was a strong increase of agricultural production displacing livestock into marginal areas, affected by temporary flooding, salinity, alkalinity and temporary droughts. Salinity and droughts negatively affect the growth, biomass production and seed yield of crops. Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. var *arundinacea*) is a valuable perennial grass that grows spontaneously on the roadsides of the humid Pampas region. The aim of this study was to determine phenotypic and genetic parameters of nine populations collected on the ecological niche boundaries, and 30 half sib families (HS) growing under salinity and drought conditions. Five experiments were conducted on field, greenhouse and laboratory conditions. An important phenotypic and molecular variability between and within collected populations were detected in experiments 1 and 2, and could be associated to the species evolutive expansion to restricted environments. The salinity experiment showed HS initial growth reduction under hydroponics conditions, with different responses depending on each family and treatment; at 250 mM NaCl an important heritability was expressed by the families. The drought experiment affected the families' initial growth, and narrow sense heritability was low probably because of moderate drought stress. The Relative Tolerance Index (ITPSA) was an important variable to select tolerant and susceptible half-sib families. The molecular characterization of tolerant and susceptible HS allowed the detection of 12 alleles with significant effects, which would indicate association between both stresses. The present thesis provides information and germplasm to be used in future breeding programs in order to obtained salt and drought-tolerant tall fescue cultivars.

INTRODUCCIÓN

1. Problemática actual

Las pasturas cultivadas constituyen uno de los componentes principales en la alimentación de la ganadería argentina, la que en los últimos años fue reordenada en ambientes de menor potencial productivo por efecto de la expansión agrícola. Las mayores concentraciones de hacienda se registran en las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos y Santa Fé (Figura 1), en ambientes donde la producción y calidad de los recursos forrajeros disponibles deben sostener una alta carga animal para alcanzar niveles de rentabilidad competitivos con la producción agrícola (Antuña, 2011; Ferreras *et al.*, 2015). En particular, la superficie sembrada con pasturas en la Región Pampeana fue desplazada hacia ambientes restrictivos, caracterizados por suelos con problemas de anegamiento temporario, salinidad y alcalinidad, los que constituyen un mosaico de condiciones ambientales, que condicionan la oferta forrajera (Agnusdei y Castaño, 2012).

Las pasturas compuestas por gramíneas perennes son una herramienta valiosa para mejorar la capacidad productiva en los ambientes marginales (Agnusdei y Di Marco, 2010), sin embargo el potencial de producción de algunas de ellas es poco conocido (Bertram y Chiacchiera, 2011). La recolección de germoplasma adaptado a ambientes restrictivos y su caracterización genética, ha permitido detectar poblaciones y genotipos valiosos incorporados a programas de mejoramiento para la obtención de nuevos cultivares que mantengan una elevada productividad y calidad de forraje aún en condiciones adversas (Castaño, 2005; Andrés y Rosso, 2007; Bazzigalupi *et al.*, 2008; Rosso y Andrés, 2009; Pittaro, 2014; Martínez, 2020).

Entre las especies de mayor valor forrajero adaptada a la región templada húmeda y sub-húmeda de la Argentina, se destaca la festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb. var *arundinacea*), considerada la gramínea forrajera perenne más importante dentro las pasturas cultivadas (Rimieri *et al.*, 2006; Agnusdei y Di Marco, 2010; Sevilla y Spada, 2014). Puede ser utilizada como pastura base o consociada con leguminosas como alfalfa, tréboles y lotus. Es altamente productiva y al presentar rusticidad, es adaptable a diversos ambientes (Agnusdei *et al.*, 2014) aunque la mayor producción de forraje se obtiene en suelos fértiles y sin limitantes (Rimieri *et al.*, 2002; Scheneiter, 2002). Otra característica de la festuca alta es su capacidad de mejorar la estructura de los suelos debido a que posee un sistema radicular extenso y profundo, que disminuye la erosión y aumenta la capacidad de retención de agua (Pagano y Rimieri, 2001; Di Santo *et al.*, 2014).

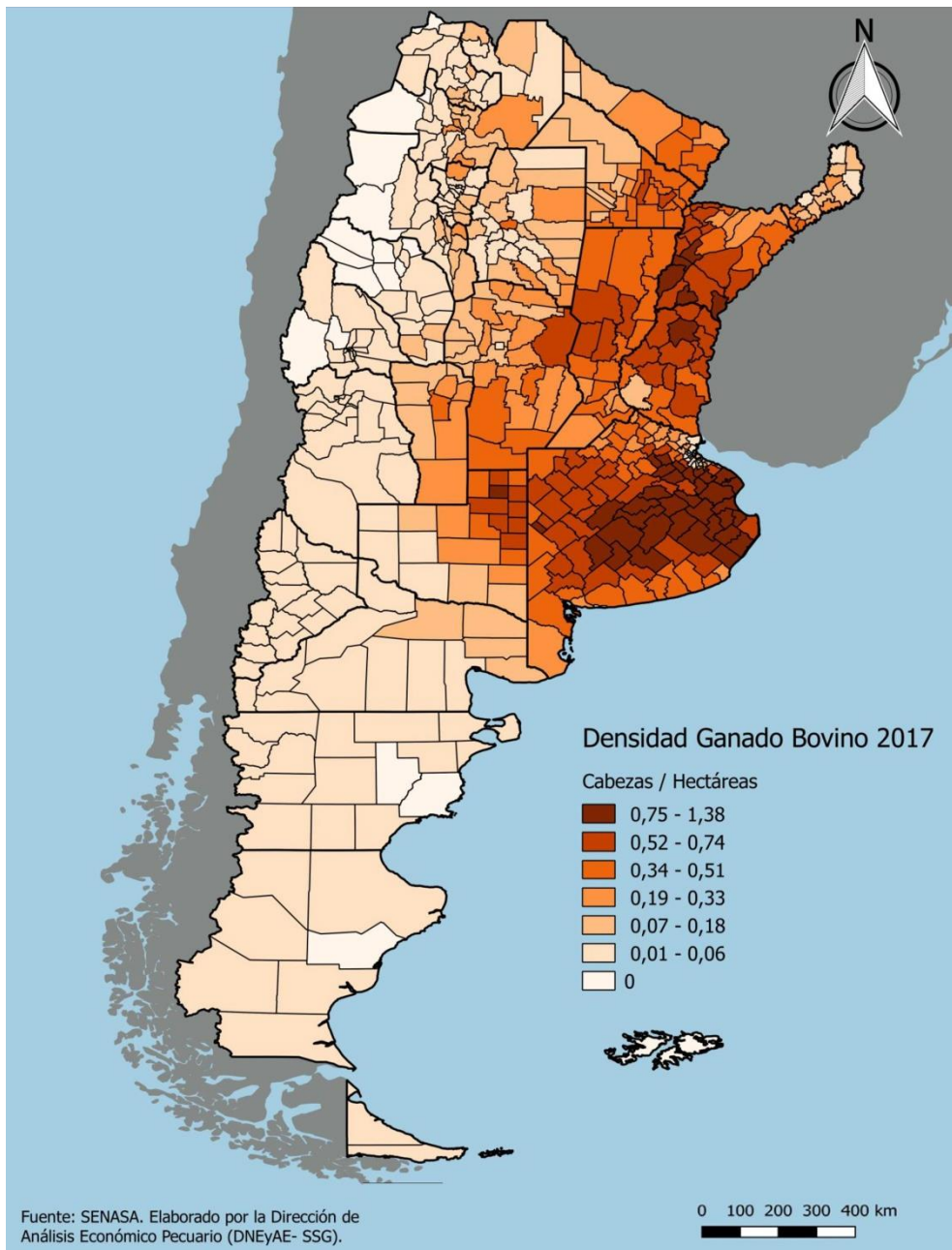


Figura 1. Densidad de ganado bovino calculado en cabezas por hectáreas en 2017. Fuente: Dirección de Análisis económico pecuario, SENASA, Argentina.

2. Los estreses abióticos: salinidad y sequía

Los estreses abióticos constituyen la principal causa de pérdidas en los cultivos (Bray *et al.*, 2000). En particular la salinidad y la sequía impiden que los cultivos desarrollen su potencial genético debido a que afectan negativamente el crecimiento, la producción de biomasa y el rendimiento de semillas (Xiong y Zhu, 2002; Borsani *et al.*, 2003; Ashraf, 2004; Yamaguchi y Blumwald, 2005; Agarwal *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2007; Munns y Tester, 2008; Witcombe *et al.*, 2008; Salekdeh *et al.*, 2009). Debido a que el 22% de los suelos cultivados es salino (FAO, 2004) y las aéreas con déficit hídrico van en constante aumento (Burke *et al.*, 2006), la comprensión de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en las respuestas que exhiben las plantas en condiciones de estrés salino y sequía, plantea un desafío de gran importancia. Al estudiar la respuesta de las plantas frente a un estrés, se reconocen diferentes procesos por los cuales las mismas logran adaptarse y soportar los cambios que ocurren en su entorno.

2.1. Salinidad

La salinidad en los suelos afecta aproximadamente el 10% de la superficie terrestre total (Leidi y Pardo, 2002). Asimismo, el continuo aumento que sufre el área de tierras afectadas por salinización secundaria causada por actividades antrópicas, es aún más preocupante (Lavado, 2008). Estimaciones recientes afirman que más de 70 millones de hectáreas agrícolas se encuentran afectadas por este problema (FAO, 2005). Idealmente, el uso de agua dulce durante el riego minimizaría la acumulación de sal en el suelo, pero debido a los limitados recursos de agua dulce, la mayoría de los agricultores han optado por el agua salina como alternativa (Yadav *et al.*, 2007).

Las tierras afectadas por salinidad abarcan un rango que va desde suelos no-salinos hasta fuertemente salinos, teniendo en cuenta la cantidad total de sales, con independencia de la profundidad a la que ocurren. Los suelos no salinos no contienen sales o poseen conductividad eléctrica menor a 4 mmhos/cm, los suelos débilmente salinos poseen conductividad eléctrica entre 4 y 8 mmhos/cm en algún horizonte y las sales solubles están entre 0,15% y 0,35%. Los suelos moderadamente salinos poseen conductividad eléctrica entre 8 y 15 mmhos/cm en algún horizonte y las sales solubles están entre 0,35% y 0,65%. Los suelos fuertemente salinos poseen conductividad eléctrica mayor a 15 mmhos/cm y las sales solubles son superiores al 0,65% (Gorgas y Bustos, 2008; Munns y Tester, 2008).

Los cloruros (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2) son las sales solubles con mayor frecuencia en el

perfil del suelo, seguidos por los sulfatos y carbonatos. La sal más soluble y abundante es el cloruro de sodio (Munns y Tester, 2008) por lo que la clasificación de los suelos puede realizarse según su contenido. Los suelos salinos propiamente dichos presentan una conductividad eléctrica mayor a 4 mmhos/cm, un porcentaje de sodio intercambiable (PSI) menor a 15 y un pH menor a 8,5. Los suelos sódicos presentan una conductividad eléctrica menor a 4 mmhos/cm, un PSI mayor a 15 y un pH mayor a 8,5. Los suelos salino-sódicos presentan una conductividad eléctrica mayor a 4 mmhos/cm, un PSI mayor a 15 y un pH mayor a 8,5 (Vargas Rojas, 2005). Estas clasificaciones generan un gran abanico de posibilidades, sumado a esto, los suelos pueden presentar una napa freática cercana a la superficie y subsuelos salinos. Esto provoca una baja productividad y una gran heterogeneidad espacio-temporal (Mieres *et al.*, 2012; Setter *et al.*, 2016).

Según el comportamiento frente a la condición salina se pueden detectar dos grandes grupos de plantas, las halófitas que se caracterizan por poder cumplir todo su ciclo ontogénico bajo condiciones salinas, y hasta presentan un mejor desempeño comparado con un control sin contenido de sales; por lo general son plantas nativas de suelos salinos. En el otro grupo se encuentran las plantas glicófitas que se caracterizan por ser afectadas por la salinidad (Taiz y Zeiger, 1998).

2.2. Sequía

Alrededor de un tercio de las tierras cultivadas del mundo están en regiones áridas y semiáridas (Atlin y Frey 1990; Blum, 2011), afectadas por sequías temporarias o permanentes. La sequía es considerada uno de los estreses abióticos más importantes que restringe la supervivencia y el crecimiento de las plantas en el mundo. Puede definirse como un período de precipitación por debajo de lo normal que limita la productividad de la planta en un sistema natural o agrícola (Boyer, 1982; Kramer y Boyer, 1995). El estrés por sequía que afecta a las plantas, es una disminución en la disponibilidad de agua del suelo que puede cuantificarse como una disminución en el potencial hídrico (Kramer y Boyer, 1995).

Las plantas necesitan una cantidad relativa de agua en el suelo para crecer y reproducirse, y esta cantidad depende de la genética de las plantas, de su etapa de crecimiento y desarrollo, así como de las condiciones climáticas y del tipo de suelo (Igras y Jankowiak, 1998). En el proceso de sequía, el contenido de agua en el suelo disminuye gradualmente, y por procesos de transpiración y/o evaporación las plantas modifican su fisiología para acceder al agua remanente. Con el paso del tiempo la escasa humedad del

suelo no es suficiente para sostener el crecimiento y se produce el punto de marchitez (Pecio *et al.*, 2014). Durante este proceso, las plantas pueden responder y adaptarse a la sequía mediante una variedad de mecanismos fisiológicos y morfológicos de escape, evasión y tolerancia para mejorar la eficiencia de captación, uso o pérdida de agua (Wang y Huang, 2004).

3. Efectos de la salinidad y la sequía en las plantas

Los efectos perjudiciales de la salinidad del suelo en las plantas se centran en la reducción de la capacidad de absorción de agua (Epstein, 1979; Dodd y Donovan, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000) y la producción de toxicidad a través de los iones (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2005; Bowman *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2012). La reducción de capacidad de captación de agua provoca un estrés hídrico y cierre estomático por el efecto osmótico de las sales en las raíces (Munns y Tester, 2008). Esto conlleva a una reducción del proceso fotosintético (Tester y Davenport, 2003) y al aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los diferentes compartimentos celulares. Por otro lado se observan efectos de toxicidad debido al exceso de Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} y HCO_3^- , este exceso conduce al desequilibrio y la deficiencia de nutrientes (Bowman *et al.*, 2006). La salinidad inhibe la homeostasis iónica por la interrupción de la absorción de nutrientes esenciales como K, Ca y N a la vez que se acumula Na y Cl (Marschner, 1995; Zhu, 2001; Lacerda *et al.*, 2003). Consecuentemente, la división celular y el alargamiento disminuyen o se detienen por completo (Hasegawa *et al.*, 2000), se produce clorosis marginal de la hoja disminuyendo el área fotosintética. Se observa también una disminución en la síntesis de proteínas causando una baja en el metabolismo de producción de energía y de lípidos, modificando sustancialmente el transporte y disponibilidad de otros nutrientes (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Parida y Das, 2005).

En general durante el proceso de sequía, las plantas evitan la transpiración y por consiguiente la pérdida de agua, mediante el cierre estomático. Cuando se minimiza la transpiración el potencial de la planta se equilibra con el potencial del suelo, realizando ajustes que evitan la deshidratación. Estos ajustes constan principalmente en la acumulación de solutos (prolina o glicina betaína) y el endurecimiento de la pared celular (Yancey *et al.*, 1982; Verslues *et al.*, 2006). Adicionalmente las plantas pueden modificar su morfología, ya sea enrollando sus hojas y cambiando el color verde hacia un verde-azulado (Carrow, 1996), producto de ceras que se depositan en la cutícula de la hoja. También

modifican el crecimiento de las raíces para maximizar la absorción de agua, en períodos prolongados de sequía (Ekanayake *et al.*, 1985; Chloupek *et al.*, 1999; Verslues *et al.*, 2006). Cuando el estrés por sequía continúa más allá de la etapa de marchitamiento, se retrasa el crecimiento y se produce clorosis en las hojas, lo que disminuye el proceso de fotosíntesis (Naylor, 1972; Fu y Huang, 2001), la respiración, la translocación y absorción de iones y carbohidratos, el metabolismo de los nutrientes y los promotores del crecimiento (Jaleel *et al.*, 2008; Farooq *et al.*, 2008). En el caso en que el agua siga sin estar disponible, se produce la muerte de la planta (Beard, 1973; Jaleel *et al.*, 2008).

4. El mejoramiento genético de la tolerancia a salinidad y sequía

En los últimos años se han dedicado esfuerzos en el estudio de los estreses abióticos en especies forrajeras, desde el punto de vista fisiológico y genético, con el objetivo de obtener cultivares tolerantes y productivos en ambientes con limitantes edafo-climáticas (Flowers, 2004; Agarwal *et al.*, 2006; Cardamone *et al.*, 2018). Los estudios de la variabilidad genética y la selección de genotipos adaptados a ambientes naturalmente estresantes, con escasa precipitación y elevada salinidad, han resultado de gran importancia (Zare *et al.*, 2011). Algunos de ellos demostraron la posibilidad de desarrollar genotipos con mayor nivel de tolerancia al estrés (Smith *et al.*, 1981; Láuchi, 1984; Francois, 1988), aplicando selección en caracteres asociados a la producción de biomasa aérea, en condiciones controladas y bajo condiciones estresantes (Ixtaína y Mujica, 2004; Pesqueira, 2008).

Existen opiniones controvertidas en relación al ambiente de selección; algunos investigadores recomiendan la selección de genotipos en condiciones sin estrés, basándose en que plantas con alto potencial de rendimiento tienen más probabilidades de mantener altos rendimientos en ambientes estresantes (Richards, 1996; Van Ginkel *et al.*, 1998; Betrán *et al.*, 2003). Otros investigadores abogan por la selección en los ambientes estresantes y de uso posterior de dichos genotipos, bajo el concepto que estos ambientes promueven la expresión y segregación de genes de interés para la selección. En particular algunos de ellos (Byrne *et al.*, 1995; Gavuzzi *et al.*, 1997; Blum, 2011) sostienen que la variación genética y la heredabilidad para el rendimiento en un entorno óptimo son diferentes respecto a las obtenidas en condición de estrés, y demuestran que las tasas de avance en la selección son mayores en condiciones de estrés. Esto es apoyado por varios autores (Fischer y Maurer, 1978; Clarke *et al.*, 1992; Fernández, 1992; Mitra, 2001) ya que

la variación genética y la eficiencia de selección dependerían de la intensidad del estrés.

En general, la tolerancia al estrés es un carácter complejo y poligénico que se expresa a través de numerosos caracteres e interacciones genéticas y ambientales (Shannon, 1985; Leidi y Pardo, 2008; Borsani *et al.*, 2003; Ashraf, 2004; Flowers, 2004; Yamaguchi y Blumwald, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2007; Munns y Tester, 2008; Fleury *et al.*, 2010). Varios autores han demostrado la existencia de variabilidad genética para la tolerancia a diversos estreses (White *et al.*, 1992; White *et al.*, 1993; Carrow, 1996; Huang y Fry, 1998; Huang *et al.*, 1998; Huang y Gao, 2000 a-b; Khedim *et al.*, 2008; Lopes da Silva Santos Simões, 2015) y un componente genético aditivo altamente heredable (Hunt, 1965).

En el caso del mejoramiento de la tolerancia a la salinidad, se expresa como la capacidad de las plantas para crecer satisfactoriamente en suelos salinos y completar su ciclo de vida, ya sea a través de cambios morfológicos, fisiológicos o bioquímicos, que les permiten disminuir el efecto negativo de las sales solubles (Ramírez-Suárez y Hernández-Olivera, 2016). Existe una amplia variación de la tolerancia a la salinidad en relación a los sucesivos estados de crecimiento (Bernstein y Hayward, 1958; Pasternak *et al.*, 1995); en particular se considera particularmente sensible al estadio de implantación, incluso en cultivos “tolerantes” (Maas y Hoffman, 1977). En el caso del mejoramiento de la tolerancia a la sequía, el principal objetivo es el desarrollo de genotipos con alto rendimiento en condiciones normales y menor reducción del rendimiento en condiciones de estrés por sequía (Fernandez, 1992; Blum, 2011; Ebrahimiyan *et al.*, 2013). La tolerancia a la sequía es un rasgo cuantitativo caracterizado por una baja heredabilidad y elevada influencia ambiental (Fernández, 1991; Farooq *et al.*, 2009; Blum, 2011).

4.1. Caracterización morfológica y molecular

Los programas de mejoramiento genético tienen como principal requisito la existencia de variabilidad genética heredable en el germoplasma disponible. Las diferentes etapas del programa de mejoramiento y los criterios a seguir en el proceso de mejora de una especie dependen de las estimaciones de variancia fenotípica, variancia genotípica, variancia ambiental y heredabilidad (Gardner, 1963; Dudley y Moll, 1969). La caracterización morfológica es la metodología más utilizada para el estudio de la variabilidad genética debido a su fácil aplicación, bajo costo y uso directo (Ferreira y Grattapaglia, 1998). En especies forrajeras, la evaluación se basa en el estudio de caracteres asociados a la producción de forraje, como el peso fresco, peso seco, altura, número de macollos, número

de hojas y caracteres asociados a la producción de semillas como número de panojas, peso total de semillas y peso de mil semillas.

Actualmente la caracterización morfológica se complementa con la caracterización molecular (Kölliker *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2004; Bolaric *et al.*, 2005; Fjellheim y Rognli, 2005; King *et al.*, 2005; Lübberrstedt, 2005). Los marcadores moleculares poseen grandes ventajas, como elevada precisión en la detección de la variabilidad a nivel de ADN, amplia distribución en el genoma y no son influenciados por el ambiente (Forster *et al.*, 2001; Schlatter *et al.*, 2002). Los microsatelites (SSR) son una clase de marcadores moleculares ampliamente utilizados para la caracterización. Sus principales ventajas radican en la capacidad de identificar genotipos homocigotas y heterocigotas (Ferreira y Grattapaglia, 1998), sus altos índices de heterocigosidad y su carácter multialélico (Schlatter *et al.*, 2002).

El uso conjunto de marcadores morfológicos y moleculares es una alternativa promisoría para los programas de mejoramiento genético (Loss, 1994; Forster *et al.*, 2001).

5. *Festuca alta*: la especie en estudio

Festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb. var *arundinacea*, syn. *Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort, syn. *Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh) es una gramínea forrajera perenne, alohexaploide ($2n= 42$; $x=7$), con tres genomas (P, G1 y G2), su tamaño genómico aproximado es de $5,27 - 5,83 \times 10^6$ Kb (Seal, 1983), perteneciente a la familia de las Poáceas (Parodi, 1958). Desde el punto de vista reproductivo, es una especie alógama y altamente autoincompatible. Es nativa de Europa, Asia y Norte de África, y se ha distribuido en América del Norte, América del Sur, sur de Australia, Nueva Zelanda y este de Asia. Existen dos biotipos con marcadas diferencias de crecimiento (Bertín, 2010). El mediterráneo, proveniente de áreas lindantes al mar Mediterráneo con veranos secos y calientes, e inviernos no tan fríos como en el norte de Europa; y el continental, proveniente del norte de Europa, con inviernos más fríos. También existen materiales intermedios (Bertín, 1988; Maddaloni y Ferrari, 2001) y el tipo rizomatoso, localizado en Portugal y parte de España, que se caracteriza por tener rizomas más largos que el biotipo continental (Borril *et al.*, 1971; Jernstedt y Bouton, 1985). En Argentina es una de las gramíneas templadas más ampliamente cultivada (Maddaloni y Ferrari, 2001) por su rusticidad, amplio rango de adaptación a variadas condiciones edafoclimáticas, importante producción de forraje y semilla y su capacidad para estabilizar y proteger suelos de la erosión hídrica y eólica (Fairey y Lefkovitch, 1993).

Las plantas de festuca presentan un hábito de crecimiento cespitoso, formando matas densas con rizomas cortos, con un amplio sistema radicular homorrizo que alcanza hasta 1,80 m de profundidad. El follaje es verde intenso y glabro, las láminas son planas, con nervaduras bien marcadas en el haz y envés brillante. La inflorescencia es una panoja laxa ramificada de unos 50 cm de largo (Hannaway *et al.*, 1999) con una elevada producción de semillas (Figura 2). La altura a floración es de 1,5 m dependiendo de la fertilidad del suelo (Maddaloni y Ferrari, 2001; Ruíz, 2011). Tiene un crecimiento otoño-invierno-primaveral, aunque presenta una marcada estacionalidad, observándose las mayores tasas de crecimiento en primavera-verano, y las menores en otoño-invierno (Miñón, 2013). Su productividad forrajera es elevada en un amplio rango de condiciones (Agnusdei *et al.*, 2014) motivo por el cual es muy utilizada en sistemas de producción de carne, generalmente formando parte de pasturas cultivadas consociadas con leguminosas, como alfalfa, tréboles y lotus (Rimieri *et al.*, 2002; Scheneiter, 2002). De acuerdo al manejo, en cuanto a cortes y descansos, la especie puede tener una persistencia de hasta 3 - 4 años (Hannaway *et al.*, 1999), y producir forraje de buen valor nutritivo durante el periodo vegetativo, aunque la calidad disminuye durante el estado reproductivo, al final de la primavera y en el verano (Bertín *et al.*, 1990).

5.1. La festuca alta y la adaptación al ambiente

De acuerdo a diversos autores (Richardson *et al.*, 2000; Torres Fernandez, 2003) la adaptación de una especie ocurre cuando se superan las barreras bióticas y abióticas de su supervivencia. Algunos autores han reportado que la festuca alta puede crecer bajo condiciones de sequías prolongadas o con exceso de humedad (Ruíz, 2011) y en diferentes tipos de suelos (Maddaloni y Ferrari, 2001). Algunos estudios han demostrado que la elevada plasticidad fenotípica de la especie le permite crecer en ambientes ganaderos de elevada productividad (Scheneiter y Agnusdei, 2011). Más recientemente, un estudio detallado de la frecuencia de individuos de festuca alta en la región pampeana, determinó el nicho ecológico realizado de la especie (Scheneiter *et al.*, 2015) (Figura 3).

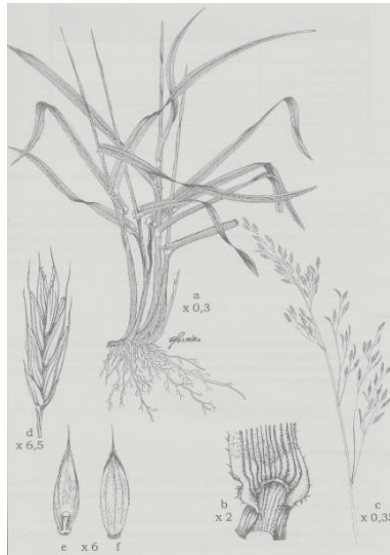


Figura 2. Descripción botánica de festuca alta. a) planta al estado vegetativo; b) lígulas y aurículas; c) inflorescencia; d) espiguilla; e) cariopse vestido cara ventral con raquilla, f) cariopse vestido cara dorsal (Maddaloni y Ferrari, 2001).

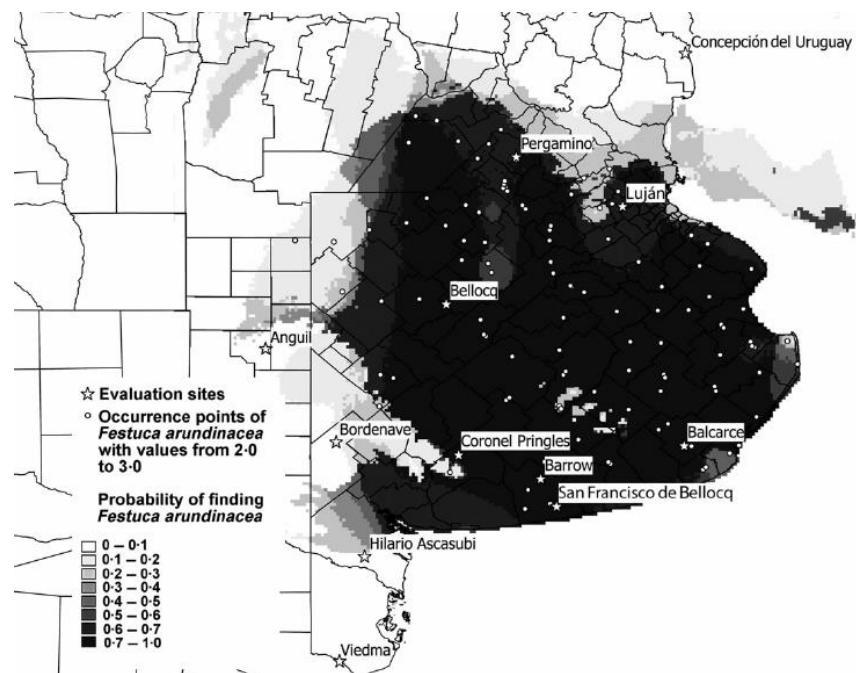


Figura 3. Nicho ecológico de festuca alta en la región pampeana y sitios de la red de evaluación de la productividad de forraje (Scheneiter *et al.*, 2015).

Este nicho ecológico realizado cubre un área de 235.000 km² en Buenos Aires y sur de Santa Fe, y las dos variables con mayor importancia en la disminución de la frecuencia de

los individuos, son la temperatura mínima del mes más frío y la temperatura promedio del trimestre más seco. En esta área y bajo condiciones favorables de agua y suelo, produce forraje durante todo el año, aunque elevadas temperaturas y sequías prolongadas producen la disminución del crecimiento en los meses de enero y febrero (Bertín *et al.*, 1990).

5.2. La festuca alta y el hongo endófito

La festuca alta puede estar colonizada con el hongo endófito *Epichloë coenophiala* (ex *Neotyphodium coenophialum*). Los endófitos son hongos que viven en el interior de los tejidos o células de las estructuras aéreas de las plantas y no ocasionan síntomas aparentes de infección. Conforman una relación generalmente mutualista donde la planta provee al hongo nutrientes (Moy *et al.*, 2002; Kuldau y Bacon, 2008; White y Torres, 2010), protección y mecanismo de dispersión y reproducción (Clay, 1990; Schardl *et al.*, 2004) y el hongo le confiere resistencia a la herbivoría mediante la producción de alcaloides (Luo *et al.*, 2015; Saikkonen *et al.*, 2015).

Varios estudios han demostrado que los endófitos aumentan la producción de biomasa y semillas, y la capacidad de rebrote (Clay, 1988; Iannone *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Además, confieren resistencia al estrés por inundación (Song *et al.*, 2015), sequía (Malinowski y Belesky, 2000; Oberhofer *et al.*, 2013) y metales pesados (Zaurov *et al.*, 2001; Soleimani *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Por otro lado, la infección puede causar toxicidad en animales debido a la producción de ergoalcaloides, ocasionando importantes pérdidas en la producción ganadera (Bertín, 2019) debido a la afección en la salud animal (Paterson *et al.*, 1995; Maddaloni y Ferrari, 2005). Estos alcaloides pueden producir efectos neurotóxicos (Panaccione, 2005; Young *et al.*, 2006) o alterar la alimentación de insectos fitófagos y posiblemente otros invertebrados como los nematodos (Schardl *et al.*, 2007; Bacetty *et al.*, 2009; Popay *et al.*, 2009; Matsukura *et al.*, 2014).

El ciclo de vida del endófito es relativamente simple, se disemina solo por semillas infectadas y al momento de la germinación se mueve por la plántula colonizando principalmente vainas de las hojas, meristemas y entrenudos de tallos alargados, pero no raíces (Welty *et al.*, 1986; Bacon y Siegel, 1988). Una vez que la planta llega a estadio reproductivo, el endófito coloniza las semillas en desarrollo, donde permanece hasta que las semillas se plantan y germinan, o muere en el almacenamiento. No todas las semillas están infectadas con el endófito y la legislación Argentina admite la comercialización si presenta un máximo del 5 % de semillas infectadas (INASE, 1995). Por último, la existencia

de endófitos benéficos que no producen alcaloides, ha demostrado potencial para reducir o eliminar el impacto de la toxicosis, aumentando la producción de carne (Parish *et al.*, 2003; Watson *et al.*, 2004).

5.3. La festuca alta y la calidad del forraje

La calidad nutritiva del forraje hace referencia al potencial del ganado para producir carne y leche, entre otros, a través de la utilización del forraje (Barnes y Marten, 1979; Burns, 2005; Collins y Fritz, 2007). El término a veces se considera sinónimo de valor nutritivo (CSSA, 1992), sin embargo, la calidad se relaciona con las características del forraje y la respuesta diaria de los animales, mientras que el valor nutritivo describe la relación de la composición química de la planta con la digestibilidad y absorción de nutrientes, sin tener en cuenta los factores relacionados con la ingesta. La calidad del forraje se determina principalmente por la digestibilidad, debido a que puede variar entre 35 y 80%, mientras que la conversión de energía digestible a metabolizable varía poco (Poppi *et al.*, 1987). A medida que la planta envejece, la digestibilidad disminuye ya que se producen cambios en las concentraciones de carbohidratos y lignina de la pared celular (Sinclair *et al.*, 2006). La proporción de pared celular y la resistencia del material fibroso a la ruptura por masticación y digestión influyen sobre el consumo y la digestibilidad del forraje (Wilson y Mertens, 1995). Una de las variables más utilizadas para el análisis de calidad de forraje es FDN (fibra detergente neutro) que estima el contenido de pared celular y se relaciona principalmente con el consumo (Van Soest, 1965; Van Soest, 1994). El contenido de FDN disminuye a causa de una disminución relativa de la pared celular, una menor demanda de fotoasimilados y la consecuente acumulación de contenido soluble (Lemaire y Agnusdei, 2000; Burns *et al.*, 2002; Insua *et al.*, 2013). El incremento del largo foliar produce una pérdida de digestibilidad de la fibra detergente neutro (DFDN) entre hojas sucesivas del rebrote, por lo que la calidad nutritiva disminuye (Groot y Neuteboom, 1997; Agnusdei *et al.*, 2011; Insua *et al.*, 2012; Di Marco *et al.*, 2013). Un manejo adecuado de defoliación reduciría la longitud foliar, provocando un aumento en la calidad del forraje (Duru y Ducroq, 2002; Di Marco y Agnusdei, 2010). La festuca alta posee una calidad nutritiva intermedia a baja en comparación con especies como el ryegrass perenne (Callow *et al.*, 2003; Sinclair *et al.*, 2006) debido a la menor proporción de contenido celular y digestibilidad de la pared celular (Wilman *et al.*, 1996). Según varios autores la digestibilidad es una de las características más relevantes a mejorar en la especie (Ghesquiere *et al.*, 1996; Wang y

Ge, 2006; Hopkins *et al.*, 2007).

5.4. La festuca alta y el mejoramiento genético

En Argentina, el mejoramiento genético de festuca alta se inició en el INTA Pergamino, a mediados del siglo pasado. Las primeras colecciones de germoplasma provenientes de Inglaterra fueron descritas por el Ingeniero Serrano (Serrano, 1953), y posteriormente se seleccionó y desarrolló el cultivar público 'El Palenque M.A.G.', destacándose por su amplia adaptación en la región pampeana argentina. A partir de 1990 se realizaron numerosos estudios genéticos en la especie (Ceroni, 1993; Ibáñez, 1997; López Gay, 1998; Cuyeu, 2008; Rimieri y Wolff, 2010), los que aumentaron el conocimiento y aportaron al desarrollo de germoplasma nacional. Al día de hoy, el Registro Nacional de Cultivares del Instituto nacional de Semillas (INASE) registra 102 variedades de festuca alta inscriptas (INASE, 2020).

Numerosos estudios indican que la especie es una de las forrajeras más importantes para la ganadería, con gran potencial para ser utilizada en condiciones de suelo salino (Buckner *et al.*, 1979; Watkins *et al.*, 2011; Gao y Li, 2014;). Aun así, existe escasa información sobre los mecanismos de los efectos de la salinidad en el crecimiento y la absorción de nutrientes en dichas condiciones (Gao y Li, 2014). En Argentina, La evaluación de poblaciones de festuca alta para la selección y reproducción de genotipos con tolerancia a la sal aún no se ha explorado completamente (Amombo *et al.*, 2018) respecto a otras especies como agropiro alargado, *Lotus tenuis*, raigras anual (Andrés y Cordero, 1995; Bazzigalupi y Pistorale, 2009; Acuña *et al.*, 2009; Pistorale *et al.*, 2009; Palacios *et al.*, 2013; Acuña *et al.*, 2015; Palacios *et al.*, 2015). Sin embargo, se han detectado marcadores moleculares del tipo SSR asociados a distintos rasgos agronómicos (Lou *et al.*, 2015). Recientemente, los mejoradores moleculares se han centrado en la transformación génica para crear cultivares con tolerancia a la sal. Algunos han intentado transformar genes de festuca alta mediante electroporación (Ha *et al.*, 1992) y polietilenglicol (Kuai *et al.*, 1999).

La especie es muy utilizada en regiones áridas y semiáridas, debido a que posee gran capacidad de tolerar sequías prolongadas (Sheffer *et al.*, 1987; Carrow, 1996; Huang y Gao, 2000 b; Gazanchian *et al.*, 2007) y de permanecer latente durante los veranos largos y secos (Norton *et al.*, 2006). Algunas investigaciones han demostrado que el rendimiento superior de la especie bajo condición de estrés por sequía, no se debe a que tenga una

tasa de consumo de agua baja (Brar y Palazzo, 1995), sino que posee un sistema radicular profundo y expansivo que le permite hacer uso eficiente del agua en el perfil. Si bien el sistema radicular es importante (Carrow, 1996), existen otros componentes de la estructura de la planta involucrados en las relaciones hídricas, como la estructura foliar (Redmann, 1985; Pallardy y Rhoads, 1993; Maricle *et al.*, 2007; Sinclair *et al.*, 2007). En particular la tasa de expansión y elongación foliar son parámetros sensibles y de importancia para realizar selección por tolerancia (Fu y Huang, 2003; Wang y Bughrara, 2008). Varios autores han evaluado la variación fenotípica de la tolerancia a la sequía de accesiones de festuca alta (Huang y Gao, 2000b; Ebrahimiyan *et al.*, 2012; Ebrahimiyan *et al.*, 2013). Sin embargo existen escasos reportes de estudios genéticos que aporten a la selección en la especie.

6. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

1. Existe elevada variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico determinado en la región pampeana.
2. El crecimiento inicial de familias de medios hermanos de festuca alta (FMH) en condiciones de salinidad y sequía expresa un componente genético heredable.
3. Las familias tolerantes a cada estrés abiótico se diferencian molecularmente entre ellas.

Objetivos generales

1. Determinar la magnitud de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico determinado en la región pampeana.
2. Analizar la variabilidad fenotípica y genética durante el crecimiento inicial de FMH de festuca alta en condiciones de salinidad y sequía.
3. Determinar si las FMH tolerantes y susceptibles a cada estrés expresan diferencias a nivel molecular entre ellas.

Objetivos específicos

- Colectar poblaciones de festuca alta en la provincia de Buenos Aires en sitios periféricos al nicho ecológico realizado.
- Detectar la variabilidad genética existente entre y dentro de las poblaciones colectadas a nivel morfológico y molecular.
- Estimar la variabilidad morfológica y genética de las poblaciones.
- Obtener FMH a través del policruzamiento de genotipos genéticamente distantes.
- Fenotipar el crecimiento inicial de FMH en condiciones de salinidad y sequía.
- Estimar la heredabilidad de los caracteres de crecimiento inicial en las FMH sometidas a condiciones de salinidad y sequía.
- Detectar FMH tolerantes y susceptibles a salinidad y sequía.
- Caracterizar molecularmente las FMH tolerantes y susceptibles a ambos estreses abióticos.

CAPÍTULO 1

COLECTA Y CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE POBLACIONES DE FESTUCA ALTA

INTRODUCCIÓN

La colecta y caracterización de los recursos genéticos de especies forrajeras de importancia agronómica, ya sea nativas y/o naturalizadas, constituyen las etapas iniciales en los programas de mejoramiento genético, debido a que proveen de variabilidad genética actual y potencial, relacionada con el ambiente de adaptación. En particular, el germoplasma naturalizado es de gran importancia debido a que contiene suficiente variabilidad genética, como consecuencia de procesos de selección y adaptación a condiciones específicas del ambiente (Bradshaw, 1965; Briggs y Walters, 1984; Tanksley y Mc Couch, 1997; Andrés 2014). La adaptación a condiciones ambientales extremas, junto al sistema reproductivo de las especies en consideración, su nivel de ploidía, y los mecanismos de recombinación génica, determinan la magnitud de variabilidad fenotípica y genotípica presente en las colecciones y este es el sustento para la construcción de nuevos programas de mejoramiento (Andrés, 2014; Bennett, 1970; Bradshaw, 1965). 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.

En programas de mejoramiento genético con objetivos de selección específicos, la colecta de poblaciones se puede realizar en microambientes caracterizados por situaciones ecológicas particulares, como suelos salinos, o con escasez de agua y temperaturas extremas, donde se asume que existen ecotipos adaptados, los que pueden ser la fuente que provea la variabilidad genética necesaria para iniciar selección. Este último aspecto también conduce a efectuar la prospección y consideración de nuevas fuentes de germoplasma presentes en la naturaleza.

La estimación de la diversidad genética en el germoplasma colectado es crucial para la conservación y posterior utilización de las especies, ya sea con fines de preservación (Gowda *et al.*, 2012), o con fines de uso inmediato para la mejora productiva (Harlan, 1983; Sleper, 1987; Hallauer, 1988). En este sentido, Smith y Smith (1989) informaron que la caracterización agromorfológica es un primer paso en la descripción y clasificación del germoplasma.

Los niveles de análisis intra-específicos (Bradshaw, 1984; Briggs y Walters, 1984) pueden discriminar entre poblaciones y entre individuos dentro de la misma población, representando respuestas a procesos de selección determinados por varios factores tales como el rango ecológico de la especie, la localización geográfica, la heterogeneidad ambiental, el sistema reproductivo, la longevidad de la planta, entre otros. La heterogeneidad ambiental y el rango ecológico y geográfico toman gran importancia para determinar la magnitud de la variación interpoblacional, mientras que las variaciones ambientales presentes en pequeña escala y el sistema reproductivo ejercen mayor influencia en el polimorfismo intrapoblacional (Jain, 1975; Loveless y Hamrick, 1984). En particular, en los sistemas ganaderos ocurren presiones de

selección a pequeña escala, producto de la interacción clima-planta, suelo-planta, planta-planta y planta-animal.

En Argentina numerosos trabajos en gramíneas y leguminosas forrajeras han demostrado variabilidad (Traverso y von der Pahlen, 1982; Andrés, 1987; Alonso y Suárez, 1993; Andrés y Cordero, 1995; Pagano, 1995; Barufaldi, 1999; Acuña, 2008; Varea, 2013; Palacios, 2015; Lanzillota, 2017; Vega *et al.*, 2018) expresada en el grado de determinación genética o heredabilidad en sentido amplio (Falconer y Mackay, 1996). En estas especies los objetivos primarios de la selección han sido caracteres asociados al rendimiento y calidad del forraje y al rendimiento de semillas. Sin embargo en los últimos años, debido a los efectos del cambio climático, y al desplazamiento de la ganadería hacia ambientes con restricciones, han tomado gran relevancia los caracteres asociados a la tolerancia a estreses abióticos y bióticos.

Entre los métodos de caracterización de la variación, se ha utilizado ampliamente el fenotipado a través de la descripción de caracteres morfofisiológicos de plantas individuales. Estos marcadores fenotípicos no requieren de medios o tecnologías complicadas, son de bajo costo y están sustentados en la observación directa de la planta (Trujillo y Barranco, 1999), tanto a campo como en condiciones controladas de invernáculo o cámara de cría (Walter *et al.*, 2012). Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado un efecto ambiental no controlado, cuando el número de repeticiones en el tiempo y espacio han sido restringidas (Tanksley y Mc Couch, 1997; Rallo *et al.*, 2005). Aun así, los marcadores morfológicos siguen siendo de gran utilidad.

A nivel internacional, la festuca alta ha sido ampliamente estudiada en aspectos productivos y genéticos. Burton y De Vane (1953) evaluaron 47 clones de festuca alta y detectaron variación genética significativa para la producción de semilla, rendimiento de forraje y la resistencia a roya. De Araujo *et al.* (1983) evaluaron 67 introducciones de festuca alta de orígenes diversos, y detectaron variabilidad genética significativa para rendimiento anual de forraje y altura de la planta. Cowan (1956) evaluó clones dentro del programa de mejoramiento genético en la especie y detectó gran potencial para mejorar la producción de semilla sin perjudicar la producción de forraje. Similarmente, Thomas y Frakes (1967) evaluaron clones de festuca y su descendencia a través de varios años y determinaron que los caracteres altura de la planta, largo de panoja y peso total de las semillas, estaban regulados por genes de efecto aditivo. Similarmente Bean (1972) determinó que los caracteres involucrados en el rendimiento de semilla estaban regidos principalmente por genes de efectos aditivos.

Varios estudios realizados en poblaciones y familias de medio hermanos en festuca (Sleper *et al.* 1977; Nguyen y Sleper, 1983 b; 1985) estimaron heredabilidades altas para el número de

macollos por planta, peso de los macollos, producción de forraje, fecha de floración, número de panojas, longitud de panojas y peso de semilla por panoja, indicando que existe acción génica de tipo aditiva para estos caracteres. Reeder *et al.* (1986) evidenciaron que el rendimiento de forraje y la persistencia son rasgos cuantitativos con heredabilidades intermedias a elevadas.

La calidad del forraje de festuca ha sido estudiada por diferentes autores. Wheeler y Corbett (1989) determinaron que las principales características que confieren calidad al forraje son una elevada digestibilidad de la materia seca, una rápida desintegración en el proceso de masticación, un alto contenido de carbohidratos no estructurales y proteínas y alta concentración de aminoácidos azufrados. Estudios realizados (Matches, 1979; Soh *et al.*, 1984) tanto a nivel de cultivares comerciales, como de clones y familias, reportaron escasa diferencia entre genotipos para la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y el contenido de proteína; sin embargo la cantidad de fibra detergente ácido (FDA) evidenció mayor heredabilidad que la fibra detergente neutra (FDN). También determinaron que FDA y FDN están correlacionados negativamente con la digestibilidad. Buxton (1990) estudió cuatro especies forrajeras, incluyendo festuca alta, y encontró que la variación en FDN fue mayor entre fechas de muestreo que entre introducciones de la misma especie.

En Argentina, se han realizado diversos estudios de variabilidad en la especie, en poblaciones creciendo en condición de planta aislada, bajo pastoreo y en competencia con trébol blanco (Cerono, 1993; Ibañez, 1997; Lopez Gay, 1998; Cattoni, 2010; Cuyeu, 2008) demostrando una elevada variabilidad genética y plasticidad fenotípica en la especie. Lanzillota (2017) evaluó 13 poblaciones de diferentes morfotipos por producción de forraje y semillas, detectando una importante variabilidad genética. Vega *et al.* (2018) evaluaron fenotípicamente 11 poblaciones naturalizadas en la región subhúmeda-semiárida de la Argentina, detectando una elevada variabilidad genotípica entre y dentro de las poblaciones.

En el presente capítulo se presentan los resultados de la colecta de germoplasma de festuca alta, realizada en el borde del nicho ecológico (Scheneiter *et al.*, 2015), donde los efectos de la sequía y las altas temperaturas limitan el crecimiento de la especie, como también los resultados de la evaluación de la variabilidad genética en caracteres morfológicos entre y dentro de las 9 poblaciones.

Hipótesis

- Existe elevada variabilidad genética entre y dentro de las nueve poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico determinado en la región pampeana.

Objetivos

- Caracterizar morfológicamente las nueve poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico en la región pampeana.
- Estimar la variabilidad genética existente entre y dentro de las poblaciones colectadas a nivel morfológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. El germoplasma estudiado

A partir de la definición del nicho ecológico de la festuca alta (Scheneiter *et al.*, 2015) se realizó la colecta de nueve poblaciones (Tabla 1.1, Figura 1.1) durante los meses de noviembre y diciembre del año 2015. Los sitios de colecta fueron seleccionados a partir de dos variables bio-climáticas: temperaturas medias mínimas del mes más frío (2,6 °C - 3,2 °C) y lluvia en el trimestre más seco (100 mm) y a partir de la frecuencia de aparición de genotipos por población (intermedia) (Figura 1.2). En cada sitio se recolectaron 40 plantas (1 planta = 1 genotipo; 40 genotipos = 1 población), siguiendo una transecta imaginaria que permitió recolectar genotipos distanciados a 3 metros uno de otro, para evitar repetir el mismo genotipo. La extracción de cada genotipo individual (mata) con raíces y tierra se realizó utilizando palas manuales. El aislamiento mínimo entre las nueve poblaciones fue de 30 km. Los 360 genotipos fueron dispuestos en bolsas de nylon, con identificación del sitio de colecta y características propias de cada ambiente, y posteriormente trasladados a la EEA Pergamino, para su acondicionamiento en macetas plásticas de 3L, conteniendo una mezcla de tierra y arena, en un patio al aire libre.

2. Acondicionamiento en invernáculo y trasplante a campo

El 1 de marzo de 2016 se procedió a la separación manual de cada planta recolectada en cuatro propágulos, obteniéndose así, cuatro clones de cada genotipo. Los propágulos (clones) se dispusieron en macetas individuales de 3 litros (conteniendo una proporción de 3:1 suelo y arena) en invernáculo sin calefacción hasta el momento del trasplante a campo.

El 30 de agosto de 2016, se realizó el trasplante al campo experimental, en un suelo argiudol típico, utilizando la técnica de planta aislada (Turesson, 1922), que permite despejar los efectos del ambiente sobre cada planta individual, y estimar con exactitud la expresión genética de cada carácter. Las nueve poblaciones estuvieron representadas por 90 genotipos cada una, dispuestos a 0,60 m de distancia bajo un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con tres repeticiones. Los caracteres Diam1, Alt1, Pf1, Ps1 y Nmac fueron evaluados en la totalidad de los genotipos, para el resto de los caracteres, 45 genotipos se destinaron a la medición de caracteres vegetativos y los otros 45 a la medición de caracteres reproductivos. El ensayo fue mantenido libre de malezas, fertilizado y regados para asegurar la implantación.

Tabla 1.1. Sitios de colecta de las nueve poblaciones, coordenadas geográficas, altura sobre el nivel del mar (ASNM), tipo de suelo y especies acompañantes.

Población	Sitio	Coordenadas	ASNM (m)	Tipo de suelo	Especies acompañantes
1	Juncal	S 33° 43; O 60° 56	89	Argiudol, bajo ganadero con curso de agua	<i>Lolium multiflorum</i> , <i>Melilotus albus</i> , <i>Lotus corniculatus</i>
2	Firmat	S 33° 24; O 61° 37	107	Argiudol, agrícola	<i>Lolium multiflorum</i> , <i>Bromus catharticus</i> , <i>Sorghum halepense</i>
3	Melincué	S 33° 41; O 61° 21	57	Argiudol, ganadero	<i>Bromus catharticus</i> , <i>Melilotus officinalis</i> , <i>Trifolium repens</i>
4	Pehuajó	S 35° 51; O 62° 14	86	Argiudol, agrícola	<i>Phalaris aquatica</i> , <i>Cirsium vulgare</i>
5	General Villegas	S 35° 03; O 63° 01	113	Argiudol, ganadero	<i>Lolium multiflorum</i> , <i>Conyza bonariensis</i> , <i>Sorghum halepense</i>
6	Lima	S 34° 03; O 59° 17	5	Argiudol, bajo ganadero con curso de agua	<i>Sorghum halepense</i> , <i>Thinopyrum ponticum</i>
7	Pigüé	S 37° 34; O 62° 30	284	Loma agrícola con tosca y curso de agua	<i>Phalaris aquatica</i> , <i>Thinopyrum ponticum</i> , <i>Sorghum halepense</i>
8	Coronel Pringles	S 38° 17; O 61° 32	267	Agrícola con tosca, en la sierra	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Cirsium vulgare</i> , <i>Medicago sativa</i>
9	Pergamino	S 33° 56; O 60° 33	66	Argiudol, agrícola	<i>Lolium multiflorum</i> , <i>Cirsium vulgare</i> , <i>Trifolium repens</i>



Figura 1.1. Imágenes de los sitios de colecta de Coronel Pringles, Pehuajó, Juncal y Melincué.

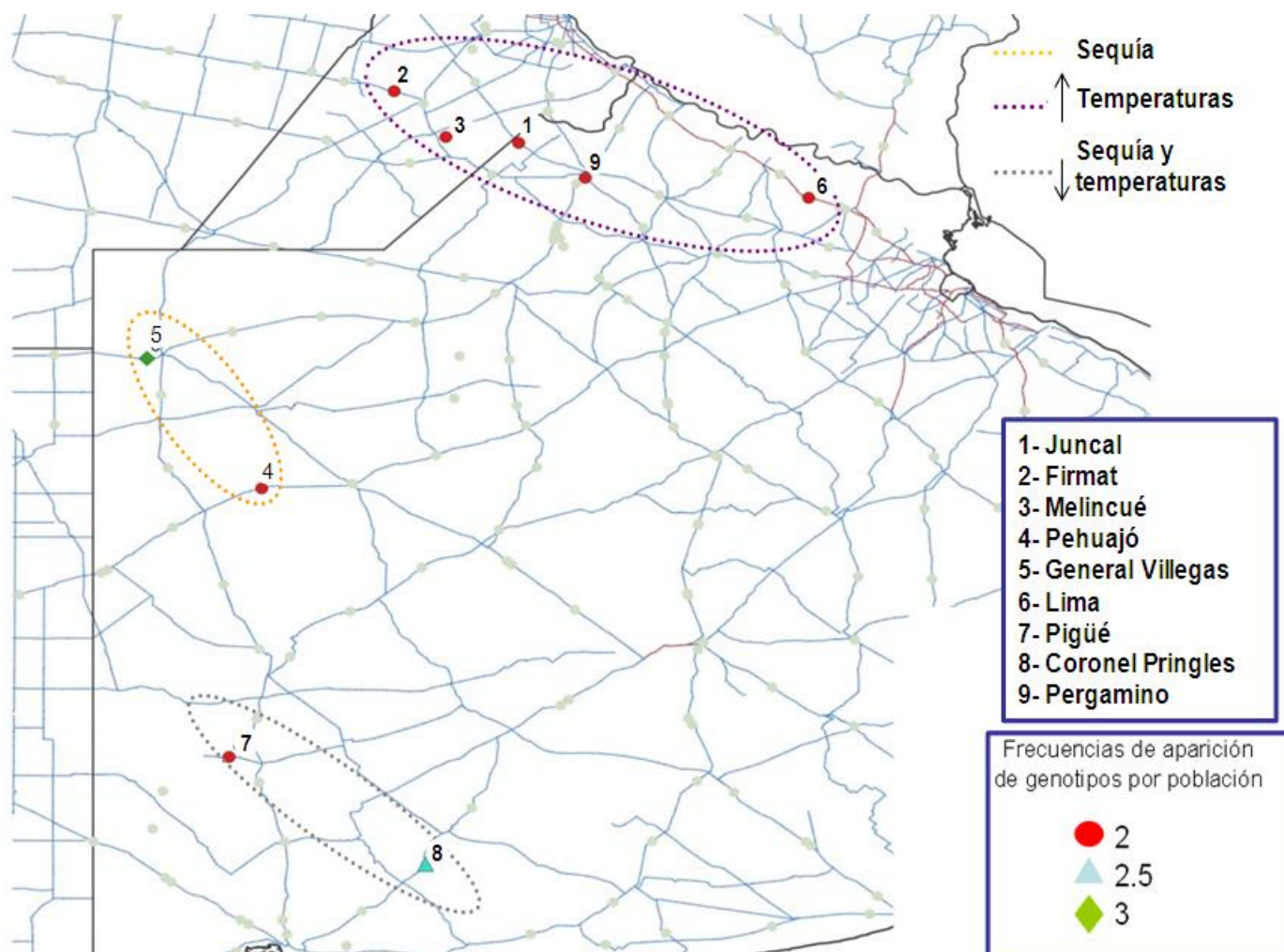


Figura 1.2. Sitios de colecta de las nueve poblaciones de festuca alta y frecuencia de aparición de genotipos por población.

3. Caracteres evaluados

Durante el año 2017 se registraron y evaluaron seis caracteres vegetativos asociados a la producción de forraje en distintos momentos del año (Figura 1.3), y cinco caracteres relacionados a la producción de semilla (Figura 1.4) (Tabla 1.2). Además se realizó en el Laboratorio de calidad de la EEA Pergamino análisis de calidad nutricional del forraje cosechado en julio del año 2017. Ese mismo año se realizó en el Laboratorio de semillas de la EEA Pergamino la determinación de infección endofítica (*Epichloë coenophiala*) en cada población.



Figura 1.3. Ensayo a campo de las nueve poblaciones de festuca alta en etapa vegetativa.



Figura 1.4. Ensayo a campo de las nueve poblaciones de festuca alta en etapa reproductiva.

3.1. Caracteres vegetativos

Número de macollos por planta: el conteo del número de macollos producido por cada planta se realizó el día 30/06.

Diámetro de planta: el diámetro máximo sobre cada planta individual se midió en centímetros (cm) con regla graduada, entre los extremos de las hojas más largas de dos macollos opuestos. Esta medición se realizó los días 03/05 y 17/08.

Altura de planta: se midió la altura máxima de planta en cm con una regla graduada apoyada sobre la base de la planta, los días 03/05 y 17/08.

Peso de materia fresca por planta: se realizó la cosecha de cada planta individual realizando el corte con hoz a una altura de 6 cm (altura de puño) desde el nivel del suelo. Cada planta se colocó en bolsas de nylon para evitar la deshidratación y se pesaron en balanza Veltrox Modelo 1502 (Máx: 3000g, d= 0,5g). Esta medición se realizó los días 15/06, 05/09 y 24/10.

Peso de materia seca por planta: posteriormente a realizar peso de materia fresca por planta se procedió al pasaje a bolsas de papel tipo kraft para realizar el secado a 60°C en estufa de aire forzado, durante al menos 48 horas hasta obtener peso constante y se pesó en balanza de precisión Radwag WTB 2000 (Max: 2000g, d= 0,01g).

Peso de materia seca total por planta: surge de la sumatoria de los pesos secos registrados en las tres fechas.

3.2. Caracteres reproductivos

La cosecha manual de cada planta individual se efectuó durante el mes de diciembre (2017) realizando el corte con hoz a una altura de 6 cm (altura de puño) desde el nivel del suelo. Luego, en gabinete se procedió a realizar las siguientes mediciones:

Número de panojas: luego de la cosecha individual de cada planta las panojas se secaron a temperatura ambiente en un invernáculo sin control de temperatura y se procedió a realizar el conteo del número total de panojas por planta. De cada planta se tomaron 3 panojas al azar, sobre las que se registraron las variables que se mencionan a continuación:

Largo de panojas: se midió el largo en cm y se promediaron los tres valores obtenidos.

Número de ramificaciones por panoja: se contó el número de ramificaciones y se promediaron los 3 valores obtenidos.

Peso total de semillas: se realizó la trilla de las panojas por planta en forma manual y se procedió a la limpieza mediante zarandas con el fin de eliminar las semillas vanas (vacías) y material inerte que contamine la muestra. Las semillas obtenidas de cada planta se pesaron en

balanza de precisión Radwag WTB 2000 (Max: 2000g, d= 0,01g) obteniendo así el rendimiento de semilla de cada planta en gramos (g).

Peso de mil semillas: del total de semillas producidas por cada planta se tomó una muestra de 100 semillas llenas las cuales fueron pesadas en balanza de precisión Radwag WTB 2000 (Max: 2000g, d= 0,01g) y el valor obtenido se multiplicó por 10 para obtener el peso de 1000 semillas en gramos.

3.3. Determinación de infección endofítica

A partir de una muestra de 200 semillas llenas de cada población se realizaron las determinaciones de infección endofítica, en dos repeticiones. Las semillas se sumergieron en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5% y se las dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Luego se realizaron enjuagues sucesivos con abundante agua de canilla y se colocaron en una caja de Petri. Para realizar el preparado se tomó una semilla por vez, se removieron las glumelas con ayuda de pinzas y/o pinches, se colocó el cariopse sobre un portaobjetos, se aplastó y dispersó con espátula y se colocó sobre ellas una gota de colorante azul de anilina al 0,4%. Rápidamente se colocó una gotita de ácido láctico al 50%. Luego de 30 minutos se colocó el cubreobjetos, se retiró el exceso de colorante con un papel secante y se procedió al análisis mediante microscopio óptico. En el análisis microscópico se rastreó la presencia de *Epichloë coenophiala* (ex *Neotyphodium coenophialum*) mediante la presencia de sus hifas contorneadas, no ramificadas y ubicadas entre las células.

Tabla 1.2. Caracteres morfológicos evaluados en las nueve poblaciones de festuca alta durante el año 2017, y sus respectivas abreviaturas.

Tipo de Caracter	Caracter	Momento de evaluación	Abreviatura
Vegetativas	Número de macollos		Nmac
	Altura (cm)		Alt1
	Diámetro (cm)	Otoño	Diam1
	Peso fresco (g)	Junio	PF1
	Peso seco (g)		PS1
	Altura (cm)		Alt2
	Diámetro (cm)	Invierno	Diam2
	Peso fresco (g)	Agosto	PF2
	Peso seco (g)		PS2
	Peso fresco (g)	Primavera	PF3
Peso seco (g)	Septiembre	PS3	
	Peso seco total (g)		PST
Reproductivas	Número de panojas		Npan
	Largo de panoja (cm)		Lpan
	Número de ramificaciones	Después de la cosecha	Nram
	Peso total de semillas (g)		Psem
	Peso de mil semillas (g)		Pmil

3.4. Calidad nutricional

La calidad nutricional del forraje de cada población se determinó en bulks de 15 genotipos en el corte realizado en el mes de septiembre del año 2017. Las muestras fueron secadas a 60 °C en estufa de aire forzado. Luego se procedió a molerlas con molino willey con malla de 1 mm con el fin de acondicionar las muestras para su posterior análisis de calidad en laboratorio. Las determinaciones fueron las siguientes:

Fibra detergente neutro en base seca (FDN): se utilizó el método propuesto por Goering y Van Soest (1970) mediante el uso de analizador de fibra ANKOM200/220

Digestibilidad de la fibra detergente neutro en base seca (DFDN): se utilizó el método propuesto por Goering y Van Soest (1970) mediante el uso del incubador DaisyII ANKOM.

Digestibilidad verdadera in vitro de la materia seca en base seca (DVIVMS): se utilizó el método propuesto por Goering y Van Soest (1970) mediante el uso del incubador DaisyII ANKOM.

Proteína bruta (PB): se utilizó el método Kjeldahl propuesto por Jones, 1991.

4. Análisis de la información

Los datos obtenidos durante la caracterización morfológica fueron analizados mediante el software Infostat/P y su interfaz con R para la estimación de modelos lineales generales y mixtos. Se realizó estadística descriptiva, análisis de varianza (ANAVA), test de comparación de medias DGC y análisis exploratorios multivariados de componentes principales y de conglomerados.

4.1. Análisis de variancia entre poblaciones

Para analizar la variabilidad entre poblaciones se consideró un modelo de bloques completamente aleatorizado donde: Y_{ijk} es la respuesta de los i -ésimos genotipos, de las k -ésimas poblaciones crecidas en los j -ésimos bloques. El modelo para Y_{ijk} y los parámetros involucrados fue:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: y_{ijk} = ijk -ésima observación de la variable y ; μ = media general; α_i = efecto aleatorio del i -ésimo bloque; β_j = efecto aleatorio de la j -ésima población; δ_k = efecto aleatorio del k -ésimo genotipo; ε_{ijk} = error asociado con la ijk -ésima observación.

4.2. Análisis de variancia dentro de poblaciones

Para analizar la variabilidad dentro de cada población se consideró un modelo aleatorio donde: Y_{ij} es la respuesta de los i -ésimos genotipos, crecidas en los j -ésimos bloques. El modelo aleatorio para Y_{ij} y los parámetros involucrados fue:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde: y_{ij} = ij -ésima observación de la variable y ; μ = media general; α_i = efecto aleatorio del i -ésimo bloque; β_j = efecto aleatorio del j -ésimo genotipo; ε_{ij} = error asociado con la ij -ésima observación.

4.3. Estimación del grado de determinación genética (GDG)

Se estimaron las heredabilidades en sentido amplio (H^2) en cada población basado en individuos según la fórmula:

$$H^2 = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_E)$$

Siendo: σ^2_G : varianza genética, σ^2_E : varianza del error (Mariotti y Collavino, 2014).

Los errores de estimación de la H^2 se realizaron de acuerdo a la fórmula:

$$E.E. (H^2) = \sqrt{\{2 (N-1) (1-[H^2]^2) + [1+ (K_2-1) H^2]^2\} / [K_2^2 (N-K_1) (N-1)]}$$

Donde $N = K_1 \cdot K_2$, $K_1 =$ genotipos experimentales y $K_2 =$ número de repeticiones (Mariotti y Collavino, 2014).

4.4. Análisis Multivariado

Con los datos obtenidos de las variables morfológicas, se aplicó 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.

4.4.1. 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 conserven la mayor variabilidad posible. El mismo se realizó mediante Análisis de Componentes Principales del paquete estadístico InfoStat/P.

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. El mismo se realizó mediante análisis de conglomerados del paquete estadístico InfoStat/P.

RESULTADOS

1. Estadística descriptiva y análisis univariado

En la Tabla 1.3 se presenta la estadística descriptiva promedio de las nueve poblaciones de festuca alta para los caracteres morfológicos evaluados y en la Tabla 1.4 se observa el comportamiento promedio por población.

Tabla 1.3. Media, desvío estándar (D.E), valor mínimo, valor máximo y significación de las diferencias (valor p) de las nueve poblaciones de festuca alta para los caracteres evaluados.

	Caracter	Media	D.E.	Mínimo	Máximo	Valor p
Vegetativos	Nmac (n°)	188,23	76,8	25	740	<0,0001
	Diam1 (cm)	71,77	12,59	30	110	<0,0001
	Diam2 (cm)	18,54	4,35	7	31	0,0051
	Alt1 (cm)	36,39	8,61	5	64	<0,0001
	Alt2 (cm)	22,54	6,44	7	51	<0,0001
	PF1 (g)	73,43	36,1	4	242	<0,0001
	PF2 (g)	186,69	88,52	48	781	<0,0001
	PF3 (g)	225,36	96,72	54	769	0,0044
	PS1 (g)	20,15	9,27	0,7	56	<0,0001
	PS2 (g)	32,24	18,34	3	137	0,0001
	PS3 (g)	83,23	24,88	30,5	221,5	0,0003
	PST (g)	136,03	41,42	44	311	<0,0001
Reproductivos	Npan (n°)	92,81	39,59	5	268	<0,0001
	Lpan (cm)	22,08	4,35	12,77	41,03	0,0013
	Nram (n°)	8,86	2,49	3,33	25	NS
	Psem (g)	13,46	10,04	0,2	76,4	<0,0001
	Pmil (g)	2,05	0,44	0,96	3,4	<0,0001

NS: no significativo.

Tabla 1.4. Media y desvío estándar de los caracteres evaluados para cada población de festuca alta.

	Población								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nmac	179,4±66,1	183,4±76	189,4±71,9	155±62,9	190,3±74,8	209±82,3	157,1±89,7	220,7±76	207,9±67,1
Diam1	70,9±12	69,7±12,1	63,1±10,8	69,1±12,9	71,3±11,1	74,4±12	74,8±13,1	76,4±11,7	76,2±11,7
Diam2	19,5±4,4	18,5±4,5	16,9±3,7	20,1±4,5	17,5±5	18,2±5,3	18,4±4,1	19,2±3,1	18,1±3
Alt1	36,5±7,9	34,8±8,2	32,2±7,9	33±8,4	35±7,6	39,3±8,7	37,7±8,5	38,5±8,2	40,4±8,3
Alt2	23,7±6,7	24,8±7,5	22,1±6,4	19,3±6	21±4,3	23,9±7,6	19,2±3,8	23,9±5,4	24,2±6,2
PF1	70,5±33	66,2±30,4	55,8±26,5	66,4±39,5	72,1±30,9	87,5±45,5	69,6±31,5	82,1±33,7	89,7±36,8
PF2	168,9±58,9	219,2±126,8	154±57,1	185,1±90,9	175,2±68	231±106,7	151,3±64,4	185,3±70,6	205,2±94,8
PF3	234,0±87,1	246,5±108,3	214,1±91,9	202,4±89	190,8±62,3	250,4±95,2	192,1±77,9	249,8±112,4	242±113
PS1	18,8±8,8	18,3±7,6	16±7,6	18,6±10	20,6±7,9	23,2±10,8	19,1±8,2	21,8±8,8	24,4±9,8
PS2	27,3±11,4	37,7±24,7	24,7±11,1	32,5±19,4	30,2±14,5	43±24,9	26±14	32,2±15,1	35,5±16,9
PS3	85,1±21,9	91,6±31	79,7±23,5	77,4±22,4	73±14,5	88,9±20,3	72,9±19,6	89,9±28,2	88,6±29,4
PST	132,4±34,1	149,5±48,3	123±36,6	130,3±43,4	122,5±30,9	155,5±50,8	117±31,1	145±44,4	145,5±30,6
Npan	101,3±43,3	97,6±40,2	93,2±40	96,8±38,2	87,9±29,4	89,7±46,4	79±29,8	118±35,1	66,3±30,7
Lpan	23,3±5,1	21,2±5,2	20,3±4,8	21,2±3,5	22,3±2,9	22,9±4,2	21,5±4,5	22,9±3,8	22,6±3,5
Nram	8,6±2,1	8,5±2,2	9,1±3,2	8,8±1,9	8,4±1,7	8,5±1,8	8,7±3,3	10,2±3,1	8,5±2
Psem	17,3±15,4	18±8,9	9,8±8,5	8,2±5,3	15,4±8,5	11,4±7,9	11,3±8,5	16±11,1	12,5±7,6
Pmil	2,1±0,3	2,2±0,2	1,7±0,4	1,7±0,4	2±0,4	2,1±0,3	2,1±0,5	1,8±0,3	2,2±0,3

1.1. Variabilidad entre poblaciones

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre las nueve poblaciones para todos los caracteres evaluados, con excepción del número de ramificaciones por panoja (Tabla 1.3). A continuación se describen los caracteres analizados.

Número de macollos

Se detectaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) en el número de macollos entre las poblaciones siendo las poblaciones 9, 6 y 8 las de mayor número de macollos. Las poblaciones 7 y 4 fueron las que menor número de macollos presentaron (Figura 1.5).

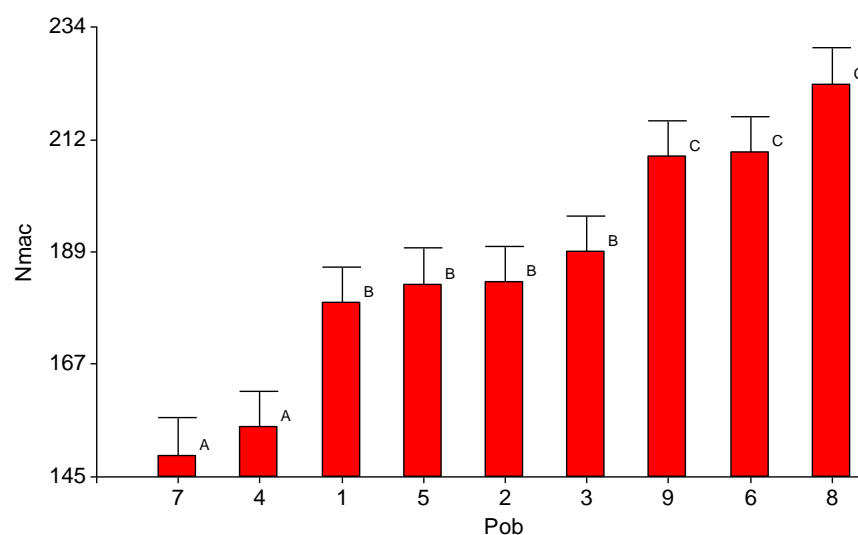


Figura 1.5. Número de macollos (Nmac) de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Diámetro de planta

Se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones en las dos fechas de medición ($p < 0,0001$; $p = 0,0051$). Las poblaciones 6, 7, 8 y 9 fueron las de mayor diámetro en la fecha 1 mientras que las poblaciones 1, 4 y 8 fueron las de mayor diámetro en la fecha 2. La población 3 fue la de menor diámetro en ambas fechas (Figura 1.6).

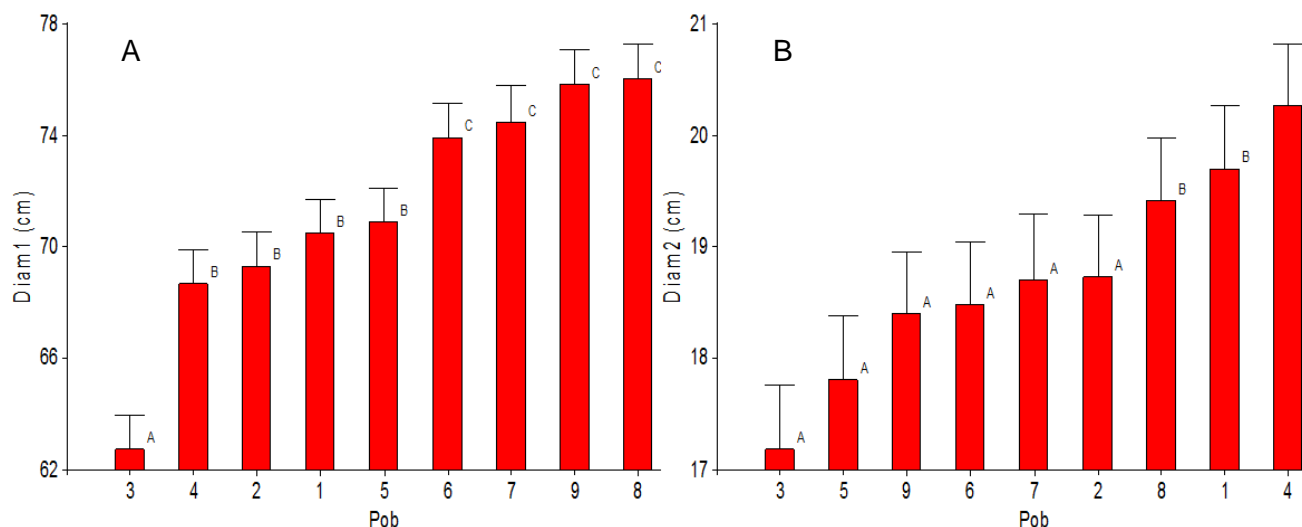


Figura 1.6. Diámetro 1 (A) y Diámetro 2 (B) de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Altura de planta

Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre las poblaciones en las dos fechas de medición. Las poblaciones 6 y 9 fueron las de mayor altura en la fecha 1 y las poblaciones 1, 9, 8, 6 y 2 las de mayor altura en la 2. Las poblaciones 3, 4, 2 y 5 fueron las que menor altura en la fecha 1 presentaron mientras que las poblaciones 7, 4, 5 y 3 fueron las que menor altura presentaron en la 2 (Figura 1.7).

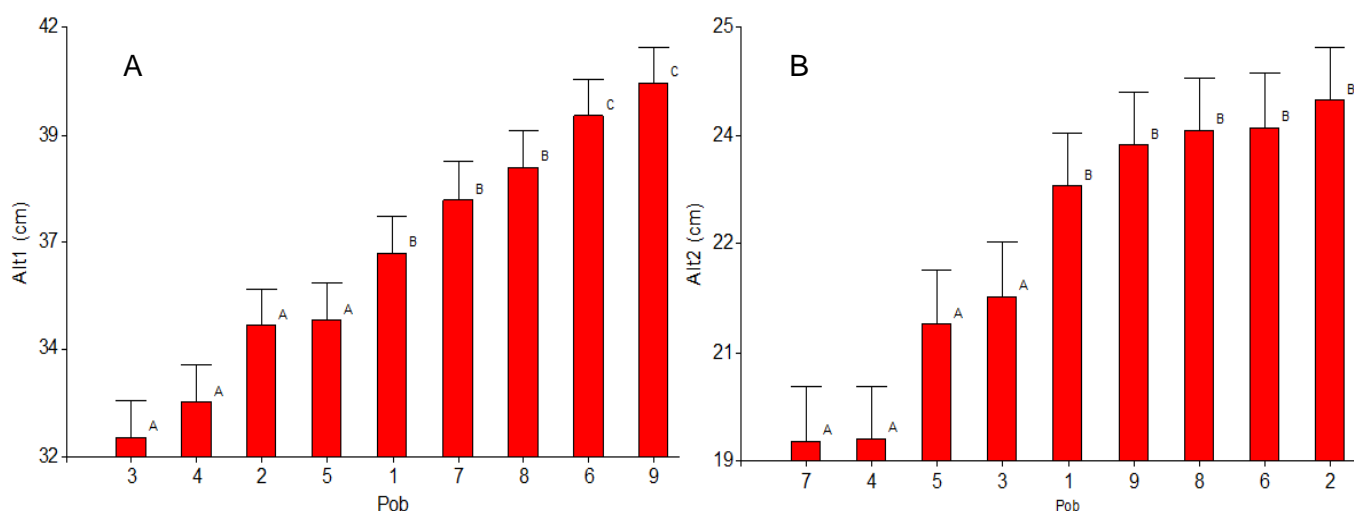


Figura 1.7. Altura 1 (A) y Altura 2 (B) de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Peso fresco y Peso seco por planta

Se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones en el peso fresco ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,044$) y peso seco ($p < 0,0001$; $p = 0,0001$; $p = 0,0003$) en las tres fechas de corte, y para el peso seco total ($p < 0,0001$). En términos generales el peso fresco y el peso seco de las poblaciones evidenció tendencias similares en los tres cortes de biomasa (forraje). El peso seco total, reflejó un comportamiento asociado a estas tendencias. Se destacaron las poblaciones 2, 6, 9 y 8 por alcanzar los valores de peso más elevados y las poblaciones 3, 5 y 7 por alcanzar los pesos más bajos. El resto de las poblaciones fueron intermedias, con alguna leve variación de su comportamiento según el corte considerado (Figuras 1.8 y 1.9).

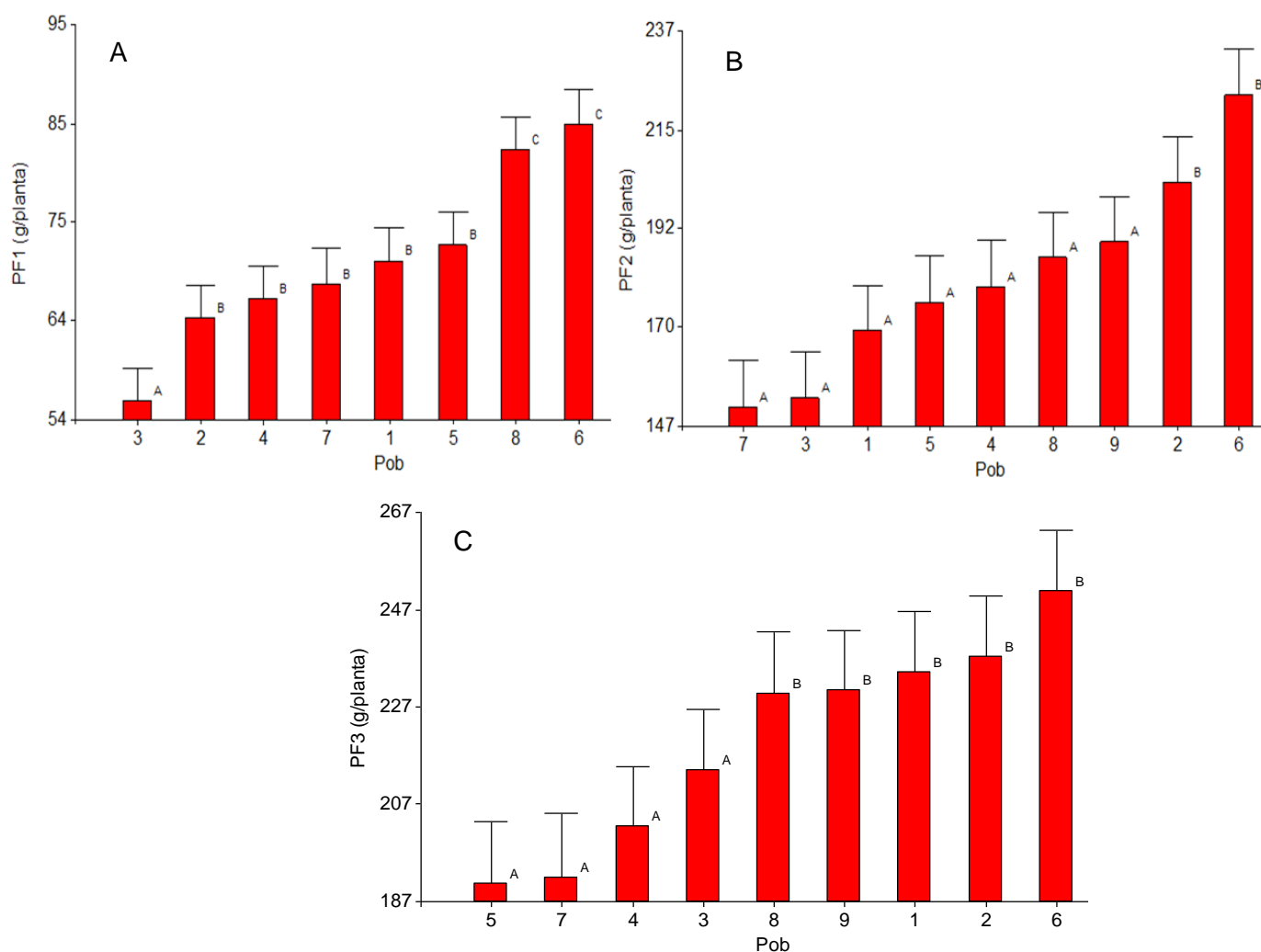


Figura 1.8. Peso fresco 1 (A), Peso fresco 2 (B) y Peso fresco 3 (C) de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

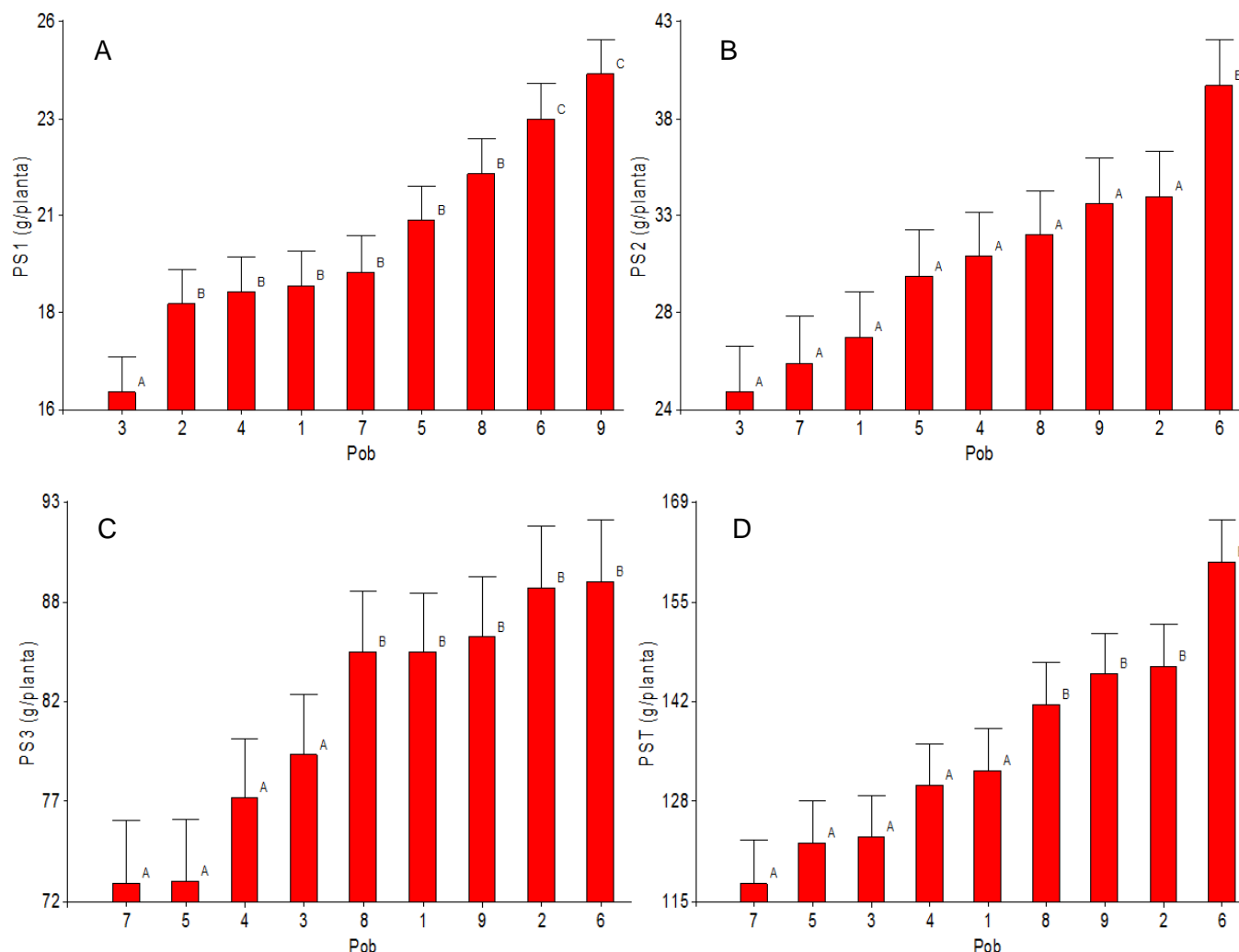


Figura 1.9. Peso seco 1 (A), Peso seco 2 (B), Peso seco 3 (C) y Peso seco total (D) de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Número y largo de panojas

Se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones en los caracteres número ($p < 0,0001$) y largo de panojas ($p = 0,0013$). La población 8 presentó el mayor número de panojas y la población 9 fue la de menor número de panojas. Las poblaciones 5, 6, 9, 8 y 1 las de mayor largo de panojas y las poblaciones 3, 2, 4 y 7 fueron las de menor largo de panojas (Figura 1.10).

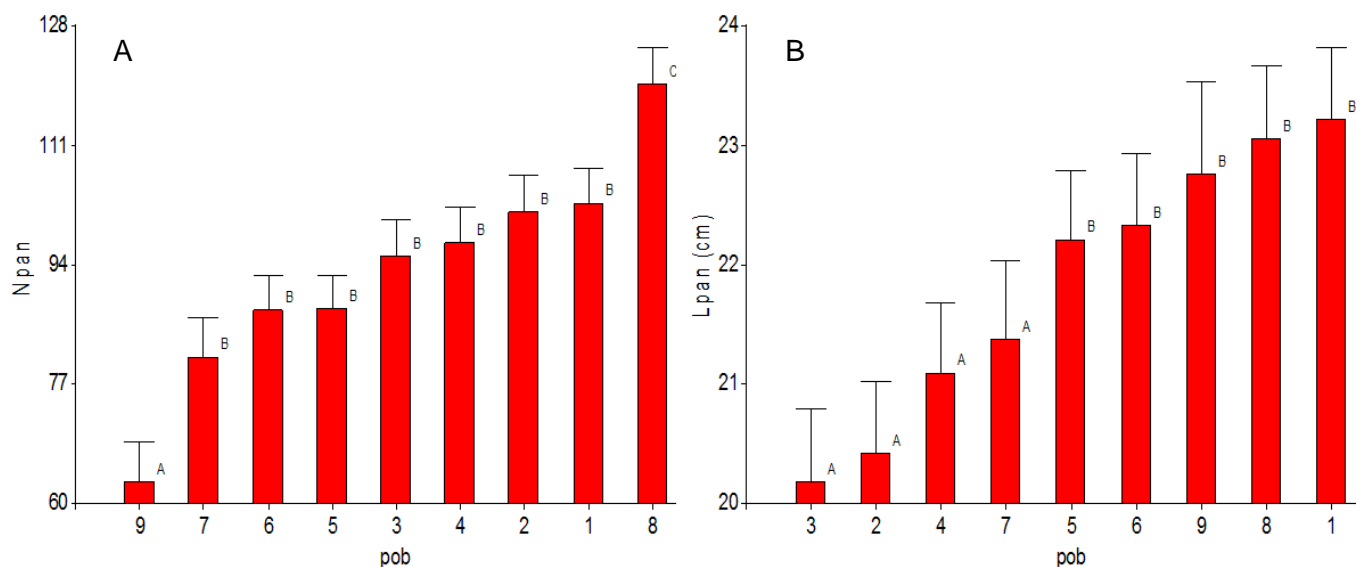


Figura 1.10. Número de panojas (A) y Largo de panojas (B) de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Número de ramificaciones por panoja

El promedio para todas las poblaciones del número de ramificaciones por panoja fue de 9. Con un mínimo de 3 y un máximo de 25. No se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones.

Peso total de semillas por planta

Se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones ($p < 0,0001$) siendo las poblaciones 1, 5, 8 y 2 las de mayor peso total de semillas. Las poblaciones 4, 3, 7, 6 y 9 fueron las que menor peso total de semillas presentaron (Figura 1.11).

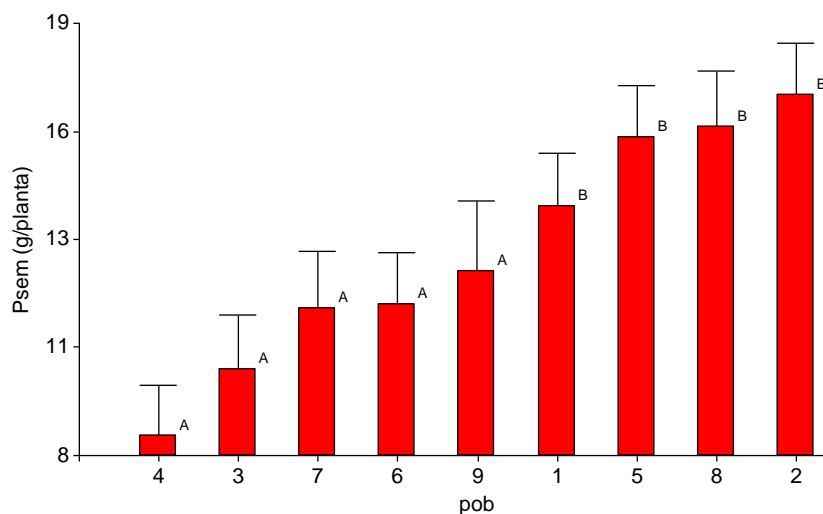


Figura 1.11. Peso total de semillas de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Peso de mil semillas por planta

Se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones ($p < 0,0001$) siendo las poblaciones 1, 6, 7, 9 y 2 las de mayor peso de mil semillas. Las poblaciones 4 y 3 fueron las que menor peso de mil semillas presentaron (Figura 1.12).

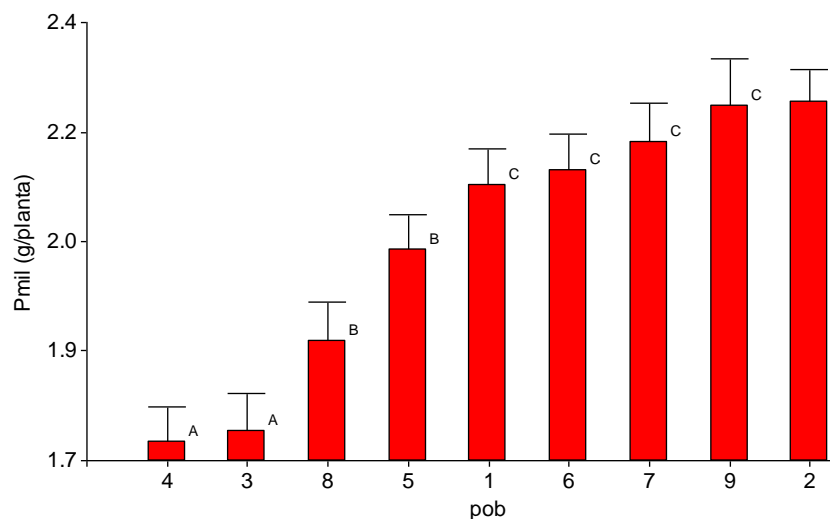


Figura 1.12. Peso de mil semillas de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

1.2. Variabilidad dentro de poblaciones

Se observó una importante variabilidad dentro de las poblaciones para los ocho caracteres considerados representativos de la producción de forraje y semillas (Anexo 1, Tablas 1.1 a 1.8).

Tabla 1.5. Significancia estadística de la variabilidad dentro de las nueve poblaciones para los caracteres Número de macollos, Peso seco 1, Peso seco 2, Peso seco 3, Peso seco total, Número de panojas, Peso de semillas y Peso de mil semillas.

Población	Nmac	PS1 (g)	PS2 (g)	PS3 (g)	PST (g)	Npan	Psem (g)	Pmil (g)
1	<0,0001	0,0044	0,0091	NS	NS	0,0235	<0,0001	<0,0001
2	0,0124	0,0066	NS	NS	NS	0,0007	0,0201	0,0047
3	<0,0001	<0,0001	0,0037	0,037	0,0212	NS	<0,0001	0,0114
4	NS	0,0008	0,0132	NS	NS	0,0008	NS	0,0002
5	0,01	0,0073	NS	NS	NS	NS	0,0018	<0,0001
6	0,0009	<0,0001	0,0057	NS	NS	0,0012	0,0135	<0,0001
7	NS	NS	NS	0,0157	0,0025	NS	0,0171	<0,0001
8	0,0089	NS	0,0018	NS	NS	NS	0,0109	0,0009
9	0,0069	0,0008	NS	NS	NS	0,0013	0,0997	0,0026

NS: no significativo.

Número de macollos por planta

Se observó diferencias significativas dentro de la mayoría de las poblaciones. En la población 1 se destacó el genotipo 10 por su gran producción de macollos. En la población 2 los genotipos más productivos fueron 12, 23, 9, 39, 34, 11, 37, 8, 4, 15, 16, 10, 2, 29, 27, 36, 32, 17, 25 y 14. En la población 3 se destacó el genotipo 1. En la población 5 se destacaron los genotipos 9, 17, 15, 12, 1, 16, 7, 5, 20, 23, 3, 13, 24, 25, 27, 19, 26 y 21. En la población 6 se destacaron los genotipos 28, 23, 14, 12, 7, 19, 18, 3, 17, 34, 25, 11, 26, 5, 2, 13, 22, 27, 15, 9, 24, 35, 33, 10, 8 y 16. En la población 8 el genotipo con mayor producción fue el 2, y en la población 9 el 19 (Anexo 1.1).

Peso seco por planta en fecha 1

Se observó diferencias significativas dentro de la mayoría de las poblaciones. En la población 1 se diferenció por baja producción de materia seca el genotipo 12, el resto tuvo producción mayor y similar. En la población 2 los genotipos más productivos fueron 25, 7, 37, 16, 32, 4 y 29. En la población 3 se destacó el genotipo 26. En la población 4 se diferenciaron por baja producción de materia seca los genotipos 7, 3, 26, 1, 29, 35, 19 y 11. En la población 5 se destacaron los genotipos 20, 33, 26 y 24. En la población 6 se destacaron los genotipos 22 y 23. Y en la población

9 se destacó el genotipo 21 (Anexo 1.2).

Peso seco por planta en fecha 2

Se observó diferencias significativas dentro de la mayoría de las poblaciones. En la población 1 se diferenciaron los genotipos 23, 26, 22, 3, 29 y 5 por elevada producción. En la población 3 se destacaron los genotipos 21, 11, 1, 29, 27 y 9. En la población 4 se diferenciaron los genotipos 38, 15, 6, 9, 4, 2, 40, 30, 31 y 23. En la población 6 se destacó el genotipo 22. Y en la población 8 se destacaron los genotipos 23 y 31 (Anexo 1.3).

Peso seco por planta en fecha 3

Se observó diferencias significativas dentro de dos poblaciones (3 y 7). En la población 3 se diferenciaron los genotipos 33, 11, 26 y 27 por elevada producción. En la población 7 se diferenciaron los genotipos 9 y 31 por baja producción (Anexo 1.4).

Peso seco por planta total

Se observó diferencias significativas dentro de dos poblaciones (3 y 7). En la población 3 se diferenciaron los genotipos 13, 35, 22, 25 y 14 por baja productividad y en la población 7 se diferenciaron los genotipos 19, 17 y 2 por elevada producción (Anexo 1.5).

Número de panojas

Se observó diferencias significativas dentro de las poblaciones 1, 2, 4, 6 y 9. En la población 1 los genotipos 1, 36, 4, 6, 35, 10, 21, 11, 16 y 13 fueron los más productivos. En la población 2 lo fueron los genotipos 2, 10, 39, 20, 35, 16, 17 y 18. En la población 4 se destacaron los genotipos 17, 34 y 25. En la población 6 se destacaron los genotipos 26, 13, 10, 9 y 33, y en la población 9 los genotipos 4, 17, 29, 19 y 30 (Anexo 1.6).

Peso de semillas

Se observó diferencias significativas dentro de la mayoría de las poblaciones, salvo en las poblaciones 4 y 9. En la población 1 se destacó el genotipo 16, en la población 2 se destacaron los genotipos 17, 39 y 2. En la población 3 se destacó el genotipo 17 y en la población 5 los genotipos 15, 26 y 20. En la población 6 se destacó el genotipo 33, en la población 7 se destacó el genotipo 30 y en la población 8 los genotipos 28, 33, 2 y 26 (Anexo 1.7).

Peso de mil semillas

Se observó diferencias significativas dentro del total de las poblaciones. En la población 1 el genotipo 10 fue el más productivo. En la población 2 lo fueron los genotipos 1, 26, 23 y 38. En la población 3 se destacó el genotipo 2. En la población 4 se destacaron los genotipos 21 y 20. En la población 5 se destacó en genotipo 26 y en la población 6 el genotipo 10. En la población 7 se destacaron los genotipos 26, 30 y 29 y en la población 8 los genotipos 28, 34, 2, 36, 29, 26, 17 y 16. Por último, en la población 9 se destacaron los genotipos 19, 29, 30 y 20 (Anexo 1.8).

1.3. Determinación de infección endofítica

Se determinó la presencia del hongo endófito *Epichloë coenophiala* (ex *Neotyphodium coenophialum*) en las nueve poblaciones de festuca alta (Tabla 1.6). El total de las poblaciones presentó infección mayor al 45%. Las poblaciones con mayor presencia de hongo endófito fueron 6, 1, 7, 5 y 3. Las poblaciones con menor presencia de hongo endófito fueron 4 y 2.

Tabla 1.6. Porcentaje de infección con *Epichloë coenophiala* en las nueve poblaciones de festuca alta.

Población	% de infección
1	92
2	58,5
3	81
4	45,5
5	85
6	96,5
7	85,5
8	79,5
9	78,5

1.4. Calidad nutricional

Los cuatro caracteres de calidad evaluados presentaron diferencias significativas entre poblaciones ($p < 0,05$) (Tabla 1.7). Según Di Marco (2011) se considera que un forraje tiene alta calidad cuando tiene aproximadamente 70% de digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS), menos del 50% de fibra detergente neutra (FDN) y más del 15% de proteína bruta (PB). Por el contrario en uno de baja calidad la DIVMS disminuye a menos del 50%, la FDN sube a más del 65% y la PB baja a menos del 8%. En el presente trabajo la media general de la DIVMS fue 78,99 %, la de la FDN fue de 48,86 %, la de la DFDN fue de 57,06 % y la de la PB fue 15,89 %,

indicando que todas las poblaciones tuvieron buena calidad de forraje. En particular se destacaron las poblaciones 4, 7, 2 y 5 por lograr los valores más elevados de DVIVMS y los menores porcentajes de FDN (Tabla 1.7, Figura 1.12).

Tabla 1.7. Valores de calidad nutricional promedio (Fibra detergente neutro en base seca, Digestibilidad de la fibra detergente neutro en base seca, Digestibilidad verdadera in vitro de la materia seca en base seca y Proteína bruta) en cada una de las poblaciones de festuca alta. Las filas inferiores muestran los valores de calidad promedios y la significación de las diferencias entre poblaciones.

Población	FDN	DFDN	DVIMS	Nitrógeno
1	49,51	55,54	77,98	16,34
2	49,45	58,03	79,27	16,29
3	48,39	56,72	79,06	16,57
4	46,84	58,51	80,54	15,21
5	48,91	57,52	79,22	15,35
6	51,66	56,43	77,49	15,03
7	46,83	57,13	79,97	14,98
8	48,88	57,35	79,05	16,38
9	49,3	56,29	78,36	16,85
Promedio	48,86	57,06	78,99	15,89
Valor p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

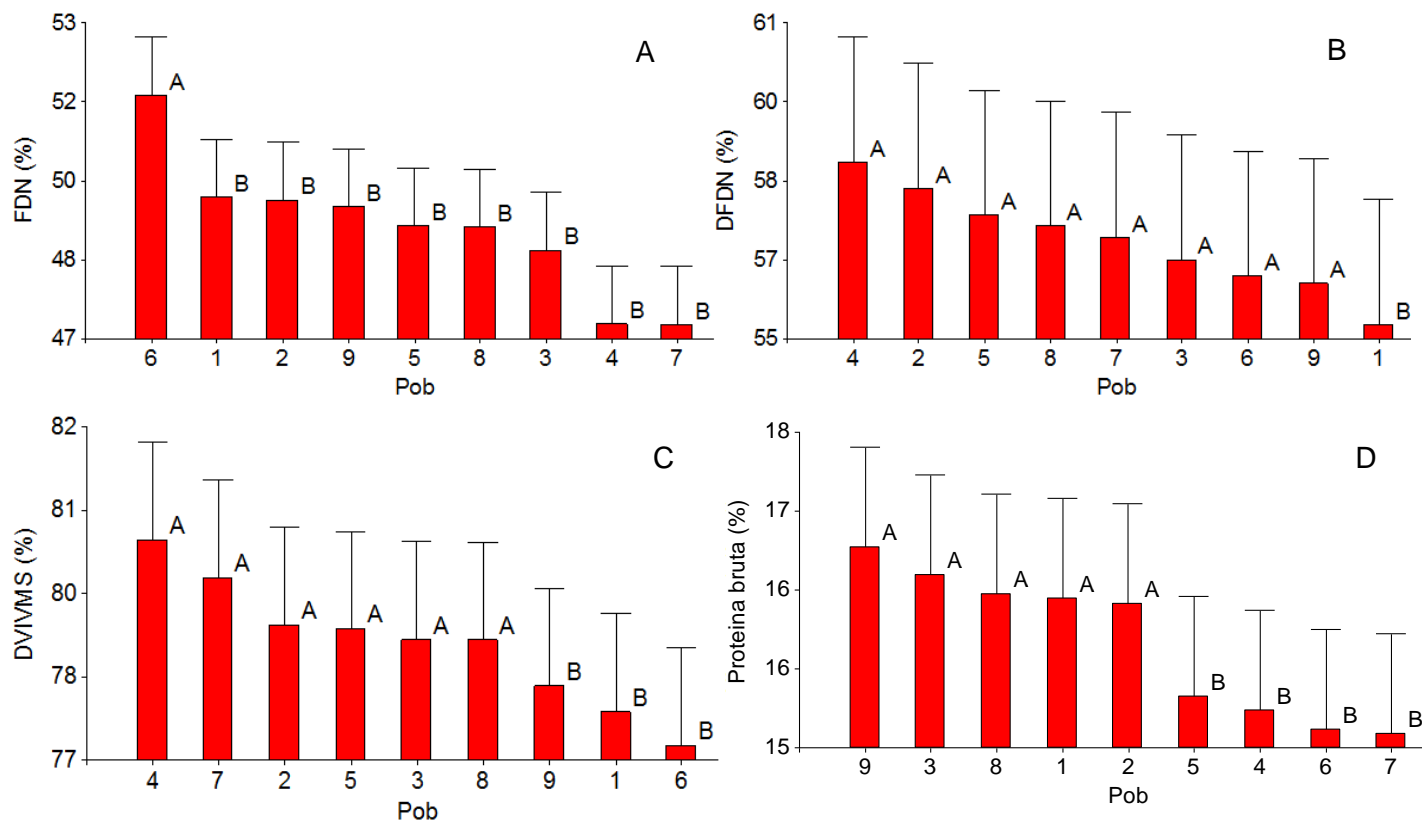


Figura 1.13. Fibra detergente neutro en base seca (FDN) (A), Digestibilidad de la fibra detergente neutro en base seca (DFDN) (B), Digestibilidad verdadera in vitro de la materia seca en base seca (DVIVMS) (C) y Proteína bruta (D) de las nueve poblaciones evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

2. Análisis multivariado

2.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)

Las dos primeras CP explicaron el 70,5% de la variabilidad total entre las nueve poblaciones (Figura 1.14). La CP1 explicó el 49,7% de la variabilidad total y los caracteres con mayor aporte a esta CP fueron PST, PS3 y PS2. Por otro lado, la CP2 explicó el 20,8% de la variabilidad total restante y los caracteres con mayor aporte a esta fueron Npan y Pmil. Se diferenciaron tres grupos de poblaciones, uno formado por las poblaciones 8, 2, 6 y 9 que se caracterizaron por presentar mayores valores de pesos secos (1, 2, 3 y total), Psem y Pmil. Otro grupo, formado por las poblaciones 3, 4, y 7 que presentaron valores menores para todos los caracteres. Y un tercer grupo formado por las poblaciones 5 y 1 que se situaron cerca del origen, por lo que serían poblaciones con comportamiento intermedio.

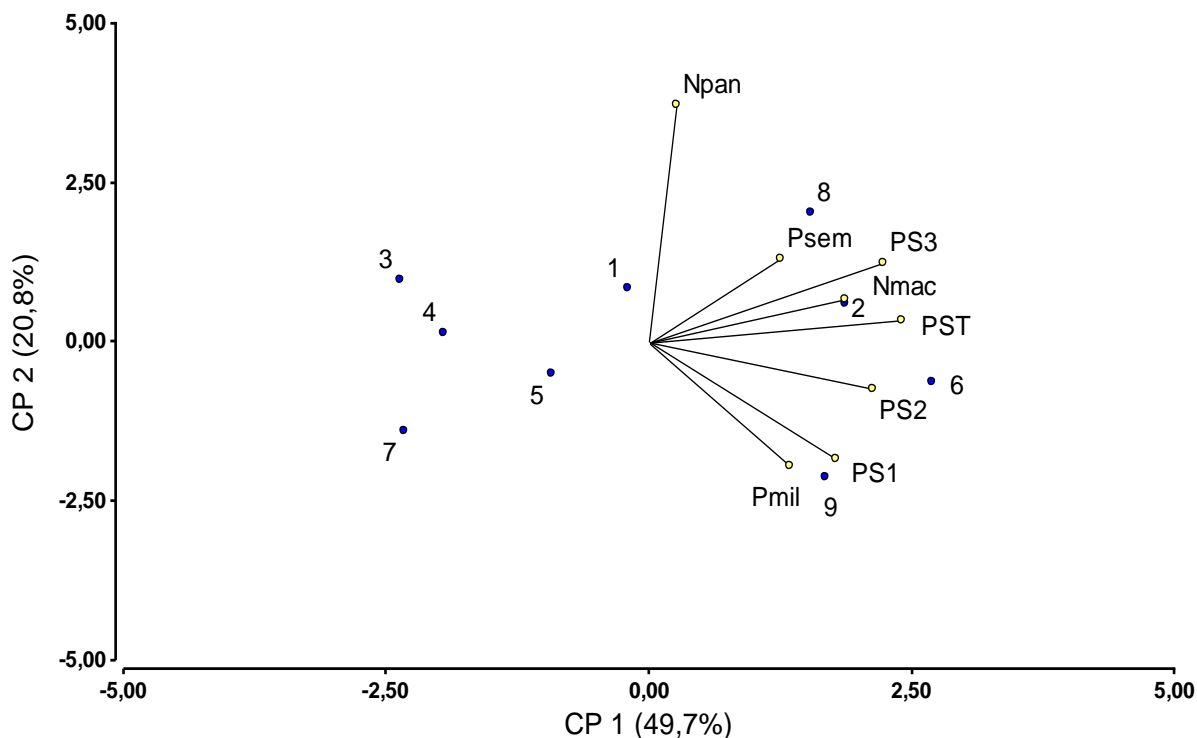


Figura 1.14. Análisis de Componentes Principales de las variables Número de macollos (Nmac), Peso seco 1 (PS1), Peso seco 2 (PS2), Peso seco 3 (PS3), Peso seco total (PST), Número de panojas (Npan), Peso total de semillas (Psem) y Peso de mil semillas (Pmil) en nueve poblaciones de festuca alta.

2.2. Análisis de Conglomerados

Si se realiza el corte al 75 % de la distancia total (3,40) se observa la formación de cuatro grupos de poblaciones (correlación cofenética 0,768) (Figura 1.15). Un grupo estuvo formado por las poblaciones 1, 3, 4, 5, y 7 que son las poblaciones que presentaron valores menores para todos los caracteres. Un segundo grupo formado por las poblaciones 6 y 9 que se caracterizaron por presentar elevados valores de Pmil, PS1, PS2 y PST. El tercer grupo se formó con la población 2 que presentó elevado PST, Nmac y PS3. El cuarto grupo se formó con la población 8 que presentó alto Psem.

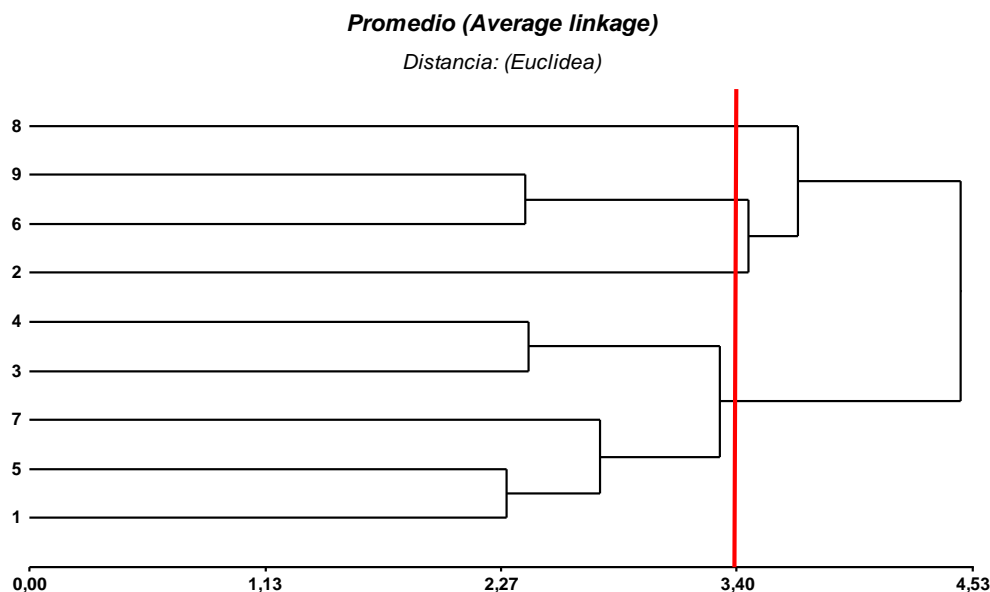


Figura 1.15. Dendrograma obtenido mediante Análisis de Conglomerados de las variables Número de macollos (Nmac), Peso seco 1 (PS1), Peso seco 2 (PS2), Peso seco 3 (PS3), Peso seco total (PST), Número de panojas (Npan), Peso total de semillas (Psem) y Peso de mil semillas (Pmil) en nueve poblaciones de festuca alta.

3. Estimación de parámetros genéticos

Las heredabilidades basadas en individuos obtenidas por población fueron mayoritariamente bajas. En particular, las variables relacionadas a la producción de forraje fueron menores a 0,40; salvo la población 3 en la variable Nmac, y la población 6 en la variable PS1. Las variables relacionadas a la producción de semilla obtuvieron valores de heredabilidad mayores. La variable Npan obtuvo heredabilidades medias en las poblaciones 6 y 9 y altas en la población 4. La variable Psem obtuvo heredabilidades intermedias en la mayoría de las poblaciones y heredabilidades altas en las poblaciones 1 y 3. La variable Pmil obtuvo heredabilidades intermedias en las poblaciones 1, 2 y 3 y heredabilidades altas en el resto de las poblaciones (Tabla 1.8).

Tabla 1.8. Grado de determinación genética (GDG) basado en individuos y errores de estimación del GDG (E.E.) para ocho caracteres considerados representativos de la producción de forraje y semillas evaluados en nueve poblaciones de festuca alta.

Población	Nmac	PS1	PS2	PS3	PST	Npan	Psem	Pmil
1	0,09±0,07	0,14±0,08	0,38±0,14	0,04±0,09	0,22±0,12	0,33±0,13	0,79±0,14	0,48±0,15
2	0,13±0,08	0,28±0,09	0 ±0,09	0 ±0,09	0 ±0,09	0,25±0,12	0,26±0,13	0,42±0,14
3	0,44±0,10	0,33±0,10	0,24±0,12	0,31±0,13	0,35±0,14	0,19±0,12	0,82±0,13	0,37±0,14
4	0,04±0,07	0,36±0,10	0,14±0,11	0,20±0,12	0,18±0,12	0,73±0,14	0,28±0,13	0,64±0,15
5	0,19±0,08	0,05±0,07	0,03±0,09	0,17±0,11	0 ±0,09	0 ±0,09	0,36±0,14	0,82±0,13
6	0,37±0,10	0,47±0,10	0,07±0,10	0,11±0,10	0,22±0,12	0,46±0,15	0,41±0,14	0,59±0,15
7	0,17±0,08	0,12±0,07	0,06±0,10	0,05±0,09	0,29±0,13	0 ±0,09	0,48±0,15	0,90±0,10
8	0 ±0,06	0,07±0,07	0,11±0,10	0 ±0,09	0 ±0,09	0,12±0,11	0,50±0,15	0,68±0,15
9	0,17±0,08	0,31±0,09	0 ±0,09	0 ±0,09	0 ±0,09	0,55±0,15	0,33±0,14	0,66±0,15

DISCUSIÓN

La colecta y caracterización fenotípica y genotípica de las nueve poblaciones de festuca alta, constituyó la etapa inicial de la presente tesis, con el objetivo de detectar la existencia de variabilidad genética.

1. Variabilidad genética entre las poblaciones

La recolección de plantas se realizó en ambientes periféricos al nicho propio de la especie, en la región pampeana, donde la frecuencia de genotipos dentro de cada población era intermedia a baja (Scheneiter *et al.*, 2015). Esto tuvo como propósito determinar si las mismas contenían variabilidad como producto de una posible adaptación a las condiciones de estrés provocadas por dos variables bioclimáticas, sequía y altas temperaturas, que limitan la expansión de la especie. Los resultados obtenidos en base a la caracterización agronómica realizada, permitieron confirmar la existencia de elevada variabilidad genética entre y dentro de las nueve poblaciones de festuca alta.

Se han detectado amplias variaciones genéticas en festuca, tanto dentro, como entre poblaciones; siendo la variación dentro de la población la más amplia ya que es un poliploide con un alto nivel de autoincompatibilidad (Huff, 1997; Ubi *et al.*, 2003; Mian *et al.*, 2005). El presente estudio determinó una importante variabilidad fenotípica y genotípica entre las nueve poblaciones sobre un total de 17 caracteres evaluados. Si bien las poblaciones fueron recolectadas a una distancia mínima de 30 km entre ellas, la confirmación de una marcada diferenciación podría implicar escaso intercambio genético entre las mismas, y asumir que efectivamente constituían poblaciones aisladas geográficamente. Estos resultados son coincidentes con otras investigaciones reportadas en la especie (Ceroni, 1993; Cuyeu, 2008; Rimieri, 2006). Estudios realizados en 90 poblaciones de festuca alta para evaluar la diversidad génica y su aporte a programas de mejoramiento en Irán, demostraron diferencias contrastantes entre grupos de poblaciones recolectadas en ambientes de pastoreo comparado con otras de ambientes para césped (Shahabzadeh *et al.*, 2020). Algunas respuestas pudieron ser consecuencia de procesos de selección y adaptación a condiciones específicas de cada lugar de colecta, junto al sistema reproductivo alogamo de la especie, su nivel de ploidía, y mecanismos de recombinación génica (Bradshaw, 1965; Briggs y Walters, 1984; Tanksley y Mc Couch, 1997; Andrés, 2014).

En la presente investigación, las variables morfológicas registradas se definieron en función de su importancia agronómica y posterior aporte a programas de mejoramiento genético de la especie, cuyo objetivo fuera obtener cultivares superiores y adaptados a nuevos ambientes. Por lo general la selección conjunta de caracteres vegetativos y reproductivos suele constituir un

“trade off”, debido a que por lo general estos grupos de caracteres suelen no estar correlacionados genéticamente (Acuña, 2008; Amorena, 2014). En el caso de los caracteres vegetativos investigados, como altura y diámetro de planta, peso fresco y peso seco, en otoño, invierno y primavera, y calidad del forraje, se evidenciaron diferencias significativas entre las poblaciones y permitieron observar agrupamientos consistentes en el tiempo. Por ejemplo la producción de biomasa fresca y seca (PF1, 2, 3; PS1, 2, 3; PST) fue significativamente superior en las poblaciones 9, 8, 6 y 2; fue intermedia en las poblaciones 1 y 4; y muy inferior en las poblaciones 3, 5 y 7. Estas tendencias se visualizaron parcialmente a través del análisis de conglomerados y pudieron reflejar la adaptación de las poblaciones a condiciones climáticas similares. Por ejemplo, las poblaciones 9, 8, 6 y 2 provienen de colectas realizadas en el límite ecológico condicionado por la variable bioclimática de altas temperaturas. Resultados similares fueron informados en 35 poblaciones naturalizadas de festuca en Túnez, donde la relación entre condiciones ambientales y caracteres agronómicos revelaron la influencia del tipo de suelo y de las temperaturas sobre la producción de forraje (Chtourou-Ghorbel *et al.*, 2011). Similarmente otros autores reportaron variabilidad considerando poblaciones naturalizadas (Vega *et al.*, 2018) y accesiones de diferente origen (Niazkhani *et al.*, 2014; Lanzillota, 2017). De Araujo *et al.* (1983) evaluaron 67 introducciones de festuca alta detectando variabilidad genética significativa para rendimiento anual de forraje y altura de la planta.

La calidad del forraje es un carácter de relevancia en la selección (Ghesquière *et al.*, 1996; Wang y Ge, 2006; Hopkins *et al.*, 2007) y muy dependiente del genotipo, del estado de madurez y de la estación del año (Gardner *et al.*, 1985; Rimieri, 2006). Según Di Marco (2011) se considera que un forraje tiene alta calidad cuando tiene aproximadamente 70% de digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS), menos del 50% de fibra detergente neutra (FDN) y más del 15% de proteína bruta (PB). Por el contrario en uno de baja calidad la DIVMS disminuye a menos del 50%, la FDN sube a más del 65% y la PB baja a menos del 8%. Se considera que la FDN es sinónimo de pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina). Por otro lado la DFDN es la proporción de la FDN que es digerida en un tiempo determinado (24 hs, 30 hs, 48 hs). Diversos autores han propuesto que el valor de la DFDN constituye un mejor estimador del consumo voluntario y un parámetro independiente del contenido de fibra (Oba y Allen, 1999; Hoffman *et al.*, 2003; Oba y Allen, 2005).

En el presente trabajo los parámetros evaluados del forraje cosechado en primavera, indicaron que todas las poblaciones de festuca tuvieron buena calidad de forraje. En particular se destacaron las poblaciones 4, 7, 2 y 5 por lograr los valores más elevados de DVIVMS, los menores porcentajes de FDN y los mayores de DFDN. Existen numerosas investigaciones que

reportan diferencias significativas entre genotipos para DVIVMS y FDN (Nguyen *et al.*, 1982; Soh *et al.*, 1984; Bughrara *et al.*, 1991; Pavetti *et al.*, 1994; Cattoni, 2010; Amini *et al.*, 2018); sin embargo, algunos autores (Insua *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 1982; Buxton y Marten, 1989) no detectaron diferencias para la variable DFDN, contrariamente a lo hallado en esta tesis. Por otro lado, Annicchiarico y Romani (2005) y Amini *et al.* (2018) comparando 25 ecotipos de festuca alta detectaron diferencias entre poblaciones en el contenido de nitrógeno similarmente a lo detectado en esta tesis. En el presente estudio las poblaciones con mayor calidad no fueron las que acumularon mayor producción de forraje, y estos resultados coinciden con los reportados por Schenetier *et al.* (2014), en el que indica que el valor nutritivo de la festuca alta a lo largo de los años no está relacionado con la acumulación de materia seca. Los resultados obtenidos indicarían que las poblaciones de festuca recolectadas en el borde del nicho ecológico, serían de gran valor para incorporar en programas de selección, que tengan como objetivo incrementar el consumo animal.

El rendimiento de semillas es uno de los aspectos más importantes en la selección de especies forrajeras, ya que es imprescindible para el éxito en la difusión de un nuevo cultivar. Diversos autores (Pagano y Rimieri, 2005; Andrés, 2014) indican que existe una considerable fluctuación en el rendimiento de semilla de especies forrajeras templadas, atribuible a condiciones climáticas variables durante período crítico de desarrollo reproductivo, y señalan que para aumentar los rendimientos se puede seleccionar por precocidad, adaptación al fotoperiodo, resistencia al frío, vigor de plántula, entre otros. Sleper (1985) determinó que las heredabilidades estimadas sobre plantas individuales de festuca fueron altas para madurez, número y largo de panojas y rendimiento de semilla. Las mismas estimaciones para peso de mil semillas y peso de semilla por panoja fueron moderadas, en tanto que para altura de planta, vuelco, rendimiento de forraje en etapa reproductiva y número de semillas por panoja fueron bajas.

En el presente estudio, el peso de total de semillas, el peso de mil semillas, el número de panojas y la longitud de la panoja, producido por planta presentaron diferencias significativas entre las poblaciones. Las poblaciones 1, 2, 5 y 8 se destacaron por alcanzar el mayor peso total de semillas y el mayor número de panojas. Similarmente las poblaciones 1 y 2 presentaron el mayor peso de mil semillas. Las poblaciones 9, 6 y 7 tuvieron un rendimiento intermedio. La gran variabilidad hallada en estos caracteres concuerda con lo reportado por la literatura por varios autores (Vega *et al.*, 2018, Lanzillota, 2017; Niazkhani *et al.*, 2014; Binek, 1996; Ramenda, 1996), y permitiría proponer a las poblaciones 1, 2, 5 y 8 como base de germoplasma para introducir en programas de mejoramiento por producción de semillas.

El análisis de componentes principales mostró tres grupos de poblaciones bien definidos. El

primer grupo conformado por las poblaciones 2, 6, 8 y 9, las que se caracterizaron por presentar mayores valores para la producción de forraje y semillas. El segundo grupo formado por las poblaciones 1 y 5 que se situaron cerca del origen, por lo que serían poblaciones con comportamiento intermedio. El tercer grupo se formó con las poblaciones 3, 4 y 7 que presentaron valores menores para todas las variables. El análisis de conglomerados definió un agrupamiento similar al mostrado por el ACP. Estos resultados, indicarían que si el objetivo de selección a nivel poblacional fuera obtener cultivares de mayor producción de forraje, de elevada calidad, y elevada producción de semillas las poblaciones 2, 6, 8 y 9 serían promisorias para incorporar en el germoplasma base del programa de mejoramiento; adicionalmente estas poblaciones podrían aportar genes para el desarrollo de cultivares tolerantes a elevadas temperaturas.

2. Variabilidad dentro de las poblaciones

Una población se define como un grupo de individuos, miembros de la misma especie, que están asociados geográficamente y constituye una unidad de evolución. Un fenómeno que afecta marcadamente la evolución de las poblaciones es la selección natural, lo que implica que los alelos que promueven mayor aptitud tienden a aumentar su frecuencia de una generación a la otra, y el resultado final es que la población está cada vez más adaptada al medio, porque se va enriqueciendo con los mejores genotipos (Fontdevila y Moya, 2000).

La detección de alta infección endofítica (mayor al 45%) en el total de las poblaciones recolectadas, podría indicar una ventaja adaptativa de las mismas a las condiciones ambientales adversas. Las poblaciones silvestres y naturalizadas de gramíneas son potenciales hospedadoras de hongos endófitos (Holder *et al.*, 1994), en particular, las poblaciones naturalizadas de festuca alta presentan generalmente infección endofítica, siendo el hongo causante de esta infección el *Epichloë coenophiala*, pudiendo constituir un factor de adaptación. Las poblaciones con mayor presencia del hongo fueron las 6, 1, 7, 5 y 3, todas ellas colectadas en ambientes de elevadas temperaturas en verano y sequía. Mientras que las poblaciones 4 y 2 presentaron menor porcentaje de infección endofítica. Si bien los mecanismos de interacción entre la especie y el hongo son complejos y probablemente involucren numerosos factores, la baja frecuencia de individuos en los sitios de colecta podría implicar un proceso de expansión de la especie hacia ambientes marginales, mediados por la presencia del endófito, donde algunos genotipos lograron mayor capacidad para perpetuarse que otros.

Estas posibles ventajas en la sobrevivencia de las poblaciones, pudieron manifestarse a través del aumento del rendimiento, en variables como el número de macollos (West *et al.*, 1993),

la producción de semillas (Rice *et al.*, 1990; De Battista *et al.*, 2006) y la persistencia (Cheplick y Clay, 1988; Malinowski *et al.*, 1998; Schmid y Christensen, 1999; Vila Aiub *et al.*, 2005; Assuero *et al.*, 2006). En el norte de España, Oliveira y Castro (1997) detectaron que el 90% de las poblaciones evaluadas resultaron infectadas y adaptadas a las condiciones de su hábitat.

La mayoría de las poblaciones estudiadas en el presente capítulo, mostraron variabilidad intra-poblacional, y este hecho podría ser consecuencia del sistema reproductivo alógamo de la especie, su nivel de poliploidía y de su elevada autoincompatibilidad, lo que produce que las plantas individuales sean por lo general heterocigotas y normalmente cada semilla o planta dentro de una misma población es genéticamente única (Fribourg *et al.*, 2009).

La variabilidad intra-poblacional calculada sobre caracteres asociados a la producción de forraje y de semillas, mostró la presencia de diferencias entre genotipos dentro de las nueve poblaciones, pero esta variabilidad fue diferente en cada población. Las poblaciones con mayor variabilidad fueron la 1, 3 y 6, con diferencias significativas entre genotipos para 6 de los 8 caracteres estudiados. Los caracteres que evidenciaron mayor variabilidad fueron peso de mil semillas, peso de semillas, peso seco del primer corte y número de macollos; mientras que el peso seco del tercer corte y el peso seco total no mostraron variabilidad en 7 de las 9 poblaciones. Si bien las poblaciones recolectadas en el borde del nicho ecológico se las considera naturalizadas, se presume que derivan de festucas procedentes de Europa continental, caracterizadas por tener una marcada estacionalidad en el crecimiento, logrando las mayores tasas en primavera-verano, y las menores en otoño-invierno (Miñón, 2013).

Si el objetivo de selección fuera obtener cultivares de mayor producción de forraje, el carácter a seleccionar sería el peso seco 1 (peso seco otoñal) utilizando las poblaciones 3, 4 y 6, porque podrían aportar mayor variabilidad entre genotipos con valores de GDG aceptables. Si el objetivo de selección fuera obtener cultivares de mayor producción de semillas, los caracteres de mayor interés serían el número de panojas (poblaciones 4, 6, 9), el peso total de semillas (poblaciones 1, 3, 6, 7, 8, 9) y el peso de mil semillas (todas las poblaciones), por presentar elevada variabilidad intrapoblacional, en la mayoría de las poblaciones y elevados GDG.

En términos generales, se detectaron grupos de genotipos dentro de cada población que fueron de mejor y peor comportamiento en las variables estudiadas. Estos resultados indicarían desde el punto de vista evolutivo que existe inestabilidad poblacional y segregación de genes que promueven la variabilidad interna; y desde el punto de vista del mejoramiento, que habría variabilidad para aplicar selección artificial.

3. Heredabilidad en sentido amplio

El grado de determinación genética (GDG), o heredabilidad en sentido amplio, es la proporción de variancia fenotípica del germoplasma causada por los factores genéticos (aditivos, dominancia e interacciones epistáticas) (Dudley y Moll, 1969). Se considera heredabilidad alta cuando es superior al 80%, moderadamente alta cuando varía entre 60-80%, heredabilidad media cuando se encuentra entre 40-60% y baja cuando es menor al 40% (Falconer y Mackay, 1996). En este trabajo se encontraron distintas heredabilidades según el carácter evaluado y las poblaciones. Los valores bajos de GDG para los pesos secos y el número de macollos demostrarían que para el germoplasma evaluado, la mayor proporción de variabilidad detectada hace referencia a variabilidad ambiental. Las variables relacionadas a la producción de semillas presentaron valores elevados de GDG demostrando que existe una alta posibilidad de realizar selección para dichos caracteres. Los caracteres cuantitativos pueden estar muy influenciados por el ambiente y consecuentemente tener bajas heredabilidades, en particular el rendimiento de forraje es un carácter cuantitativo complejo y de bajo control genético (Schiller y Lazenby, 1975, Fribourg *et al.*, 2009).

Estas estimaciones de heredabilidades permitirían definir cuáles serían las poblaciones que podrían aportar a la selección para diseñar un programa de mejoramiento eficaz que maximice la mejora genética (Kearsey y Pooni 1996; Hallauer *et al.*, 2010) acorde al carácter analizado.

CONCLUSIONES

- Se corroboró la existencia de una amplia variabilidad genética entre y dentro de las nueve poblaciones de festuca alta mediante caracterización morfológica.
- Las poblaciones 2, 6, 8 y 9 presentaron elevada producción de forraje y calidad, y buena producción de semillas, y serían promisorias para incorporar a un programa de mejoramiento para la obtención de cultivares superiores.
- Las poblaciones con mayor variabilidad intrapoblacional en caracteres de producción de forraje y semilla fueron la 1, 3 y 6, con diferencias significativas entre genotipos para la mayoría de los caracteres estudiados.
- La elevada variabilidad intrapoblacional indicaría que existe segregación de genes que promueven la variabilidad interna para aplicar selección.
- Los caracteres vegetativos relacionados con la producción de forraje presentaron valores del grado de determinación genética bajo en todas las poblaciones.
- Los caracteres reproductivos relacionados con la producción de semillas presentaron valores del grado de determinación genética medianos a elevados en las poblaciones estudiadas.
- Las poblaciones recolectadas en el borde del nicho ecológico podrían estar sujetas a procesos micro-evolutivos de expansión de la especie hacia ambientes restrictivos, a través de una ventaja adaptativa mediada por la elevada infección endofítica.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE FESTUCA ALTA

INTRODUCCIÓN

La utilización de marcadores moleculares para asistir al mejoramiento genético convencional en la detección de variabilidad, es una herramienta muy valiosa que complementa la evaluación de caracteres fenotípicos y puede mejorar la eficiencia y precisión de proceso de selección (Loss, 1994; Gupta *et al.*, 1996; Flowers *et al.*, 2000; Forster *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2004; Vinh y Paterson, 2005, Kaushik *et al.*, 2003; García *et al.*, 2007).

Los marcadores moleculares presentan ventajas con respecto a los marcadores morfológicos, como mayor precisión de detección de la variabilidad a nivel de ADN, una amplia cobertura del genoma, escasa influencia ambiental y se pueden analizar en cualquier estado del desarrollo de la planta (Forster *et al.*, 2001; Schlatter *et al.*, 2002; Munns y James, 2003). Permiten la evaluación directa de los genomas de los individuos porque representan segmentos específicos de ADN correspondientes a regiones codificantes o no codificantes, cuyas secuencias pueden o no ser conocidas. Actualmente, la utilización de dichos marcadores ha otorgado un mayor refinamiento, eficacia y velocidad al proceso de selección.

Los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*) son marcadores compuestos por repeticiones en tándem de dos a seis pares de bases flanqueadas por regiones conservadas no repetitivas. Sus ventajas radican en que son codominantes, abundantes en el genoma, altamente polimórficos y poseen especificidad de locus, buena reproducibilidad y distribución aleatoria en todo el genoma (Weising *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 2011). La base molecular del polimorfismo radica en la diferencia del número de unidades repetidas. Cada segmento de tamaño diferente representa un alelo diferente de un locus. Aunque la técnica requiere una puesta a punto laboriosa de la reacción PCR (según el cebador), se considera que la metodología del análisis por SSRs es relativamente sencilla y reproducible entre laboratorios (Hamada *et al.*, 1982; Rafalski *et al.*, 1993).

Una clase especial de SSR son los EST-SSR (*Expressed Sequence Tags*) que se ubican en regiones codificantes del genoma (Li *et al.*, 2002) y son funcionalmente más importantes que los SSR genómicos (Casu *et al.*, 2001; Carson y Botha, 2000) ya que pueden reflejar información de genes específicos. Se han detectado niveles más bajos de polimorfismos en este tipo de marcadores con respecto a los SSR genómicos por su mayor conservación (Song *et al.*, 2012; Parthiban *et al.*, 2018). Los marcadores EST-SSR se obtienen rápidamente mediante búsqueda electrónica y reflejan la diversidad genética dentro o adyacente a los genes (Varshney *et al.*, 2005). En cultivos con genomas complejos se logra una caracterización significativa de genes utilizando marcadores EST (Oliveira *et al.*, 2009).

Los microsatélites son ideales para 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) incluidas las especies de fecundación cruzada (Forster *et al.*, 2001). Permiten realizar mapeos genéticos y físicos, identificación y discriminación de genotipos. Son ampliamente utilizados para estudios de genética de poblaciones (Roca y Ramirez, 2000), estudios evolutivos, selección asistida por marcadores y caracterización de cultivares (Cipriani *et al.*, 2010).

La utilización de marcadores moleculares para el mejoramiento genético de festuca alta comenzó a principios de la década de 1990. Las técnicas utilizadas fueron amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) y marcadores de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) para el análisis de la diversidad genética (Xu *et al.*, 1994; Mian *et al.*, 2002), filogenia (Xu y Sleper 1994; Charmet *et al.*, 1997), caracterización de híbridos *Festuca* × *Lolium* (Chen *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2003) e identificación de cultivares (Eizenga *et al.*, 1998). También se utilizaron para generar mapas genéticos (Xu *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 2005) y mapeo comparativo (Chen *et al.*, 1998).

Los marcadores microsatélites (SSR) desarrollados para festuca alta (Saha *et al.*, 2004, 2006) fueron ampliamente utilizados para la evaluación de diversidad de germoplasma, construcción de mapas de asociación y genómico, identificación de variedades y análisis genéticos de poblaciones (Lauvergeat *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2005; Tehrani *et al.*, 2009; Hand *et al.*, 2012 a-b; Cuyeu *et al.*, 2013). Además, se estudio la aplicación de dichos marcadores en otras especies (Saha *et al.*, 2004; Zeid *et al.*, 2010).

Recientemente se han desarrollado y utilizado marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) para la clasificación de morfotipos y el análisis filogenético de festuca (Hand *et al.*, 2010, 2012). Aun así, el progreso del desarrollo y utilización de marcadores moleculares en festuca alta es muy lento en comparación con especies más importantes.

Estudios anteriores detectaron una elevada variación genética a nivel morfológico en el germoplasma naturalizado de festuca alta (Borrill *et al.*, 1971; Majidi *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). Aun así, la diversidad fenotípica existente en el germoplasma no siempre refleja la magnitud de la diversidad, debido a la naturaleza genética compleja de las variables estudiadas y las influencias ambientales (Smith y Smith, 1992). Por otro lado, los marcadores moleculares cubren todo el genoma, es decir regiones codificantes y no codificantes (Franco *et al.*, 2006). Por lo tanto, la caracterización morfológica tendría que estar acompañada por la caracterización molecular para clasificar los genotipos de plantas en la evaluación y utilización de los recursos genéticos, la diversidad genética en los programas de mejora (Franco *et al.*, 2001).

En este capítulo se propuso estudiar la variabilidad molecular entre y dentro de las nueve poblaciones de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb. var *arundinacea*) recolectadas en el borde del nicho ecológico en la región pampeana.

Hipótesis

- Existe elevada variabilidad genética a nivel molecular entre y dentro de las poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico determinado en la región pampeana.

Objetivos

- Determinar la magnitud de la variabilidad genética molecular entre y dentro de las poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico determinado en la región pampeana.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. El germoplasma estudiado

Se caracterizaron 40 genotipos de cada una de las nueve poblaciones colectadas en el borde del nicho ecológico de festuca alta (Capítulo 1).

2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de tejido liofilizado perteneciente a 40 genotipos por población. Los genotipos colectados fueron acondicionados en invernáculo e identificados individualmente. El ADN se obtuvo siguiendo el protocolo de extracción Kleinhofs *et al.* (1993).

1. Colocar el material liofilizado en microtubos de 2 ml y moler manualmente con un vástago de punta cónica
2. Agregar 800 μ l de buffer de extracción (sin CTAB ni SDS) (Tabla 2.1) a 65 °C en cada tubo
3. Incubar en baño de agua a 65°C durante 10 minutos
4. Agregar 75 μ l de SDS y 75 μ l de CTAB a 65°C
5. Incubar en baño de agua a 65° C, durante 30 minutos
6. Agregar 750 μ l de cloroformo
7. Mezclar suavemente mediante inversiones durante 10 minutos
8. Centrifugar a 12.000 rpm, durante 30 minutos
9. Extraer la fase acuosa (700 μ l) y proceder al primer cambio de microtubo de 1,5 ml
10. Agregar 800 μ l de cloroformo
11. Mezclar suavemente mediante inversiones, durante 10 minutos
12. Centrifugar a 12.000 rpm, durante 30 minutos
13. Extraer la fase acuosa (800 μ l) y proceder al segundo cambio de microtubo de 1,5 ml
14. Agregar isopropanol frío (450 μ l) para precipitar el ADN
15. Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm
16. Descartar la fase acuosa y lavar el pellet
17. Agregar 1 ml de etanol 70%
18. Centrifugar 30 minutos a 12000 rpm
19. Descartar la fase acuosa y realizar el segundo lavado con etanol al 70%
20. Centrifugar 30 minutos a 12000 rpm
21. Descartar la fase acuosa
22. Dejar secar el pellet hasta evaporación total del etanol al 70%
23. Resuspender el ADN con 40 μ l de TE 1X

Tabla 2.1. Composición del buffer de extracción

Componentes	Concentración final	1X
1M TrisClH (pH 8)	100mM	75 µl
5M NaCl	700mM	105 µl
0.5M EDTA (pH 8)	50mM	75 µl
SDS 20% *	2%	75 µl
CTBA 10% *	1%	75 µl
H2O		345 µl
Volumen total		750 µl

3. Cuantificación y dilución de ADN genómico

Para la cuantificación y control de la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0,1µg/ml). Por pocillo se sembró un volumen de 2µl de muestra con 5µl de azul de bromo fenol (BPB) 1X. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 Volts durante 30 minutos. El ADN extraído se cuantificó en forma visual mediante transiluminador de luz ultravioleta UVP Modelo M-20. Se realizó una comparación con muestras de ADN conocidas (fago lambda digerido con la enzima HindIII). Una vez cuantificadas las muestras del ADN se procedió a realizar las diluciones de trabajo con TE 1/10 (1:Tris 10:EDTA) , llegándose a una concentración final aproximada de 10 ng/µl.

4. SSR utilizados

Para la caracterización molecular de las nueve poblaciones de festuca alta se utilizaron 12 SSR propios de festuca diseñados por la Samuel Roberts Noble Foundation (Saha *et al.*, 2006) y 3 SSR diseñados para raigrás (Jones *et al.*, 2001) (Tabla 2.2). Para cada primer SSR se calculó la temperatura de amplificación según la fórmula:

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

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

(Rybicki, 2005. <http://www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBiolManual>) y al promedio del par se le bajó 4°C para asegurar la amplificación (T_m ajustada).

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Veriti® 96-well Thermal Cycler de Applied Biosystems, utilizando las temperaturas de annealing ajustadas para cada par de primers. El programa de amplificación utilizado fue:

- 1 ciclo de 1 minuto a 95°C (desnaturalización)
- 35 ciclos de:
 - 15 segundos a 95°C para desnaturalización del ADN
 - 30 segundos a la temperatura de annealing calculada para cada par de primers
 - 30 segundos a 72°C (extensión)
- 1 ciclo de 7 minutos a 72°C (terminación)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 13 µl, conteniendo 1 µl de ADN genómico (10 ng/µl), 0,11 µl de dNTPs (100 mM), 1,4 µl Buffer Taq 10X, 0,56 µl de Cl₂Mg (50 mM), 0,5 µl de cada uno de los primers SSR (10 µM), 0,1 µl de Taq ADN polimerasa Pegasus (PB-L®) y 8,02 µl de agua (calidad HPLC) para completar el volumen.

6. Resolución de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis vertical en cubas de secuenciación en geles de poliacrilamida al 6% (19:1 acrilamida-bisacrilamida) de 0,4 mm de espesor en condiciones desnaturalizantes utilizando el equipo Sequi-Gen DNA Electrophoresis Cell, Bio-Rad. El armado de los geles y preparación de los vidrios se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Agregar solución adherente (3µl Bind Silane, 5µl ácido acético glacial 0,5%, 950µl etanol) al vidrio con el fin de adherir el gel
2. Agregar solución repelente de agua (Rain X®) a la cuba electroforética
3. Colocar espaciadores entre el vidrio y la cuba
4. Sujetar con clamps (sujetadores)
5. Distribuir 70ml de la solución fresca de poliacrilamida con 330µl de APS (persulfato de amonio) y 33µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), controlando que no se formen burbujas durante el proceso
6. Colocar el peine con los dientes orientados hacia la parte superior del gel, para marcar el frente. Sujetar el peine con broches y dejar polimerizar como mínimo durante una hora.

El gel fue sometido a una pre-corrída en buffer TBE (11% tris base, 6% ácido bórico, 0,6% EDTA 0,5M) de dos concentraciones distintas (0,5X arriba y 1X abajo). Previo a la siembra, se agregó a las muestras amplificadas buffer de carga (200µl EDTA 0,5M, 9,6ml formamida y 300µl colorante-azul bromofenol y xilenocianol) y se desnaturalizó por calentamiento a 94°C durante 5 minutos, enfriando posteriormente a 0°C para evitar la unión de las cadenas. El volumen de

siembra fue de 2µl por calle.

El tiempo de duración de la corrida se adecuó al peso molecular (PM) estimado del SSR una potencia constante de 55W, con un voltaje variable entre 1400 y 2000 volts y con control de temperatura (máximo: 55° C). En cada corrida se utilizaron marcadores de peso molecular (variación del tamaño en bandas de a 10 y 25 pb, InvitrogenTM) para estimar el peso molecular de los alelos presente en cada SSR de las diferentes poblaciones.

Una vez finalizada la corrida se realizó el revelado de la bandas mediante la técnica de tinción con nitrato de plata según Benbouza *et al.*, (2006):

1. Fijación: Sumergir el gel en un litro de solución 10% de alcohol 96° (calidad alimenticia) y 0,5% ácido acético glacial, agitar durante 5 minutos.
2. Tinción: Sumergir el gel en una solución que contiene 1,5 gr de nitrato de plata en un litro de agua bidestilada y 1,5 ml de formaldehido, agitar durante 7 a 10 minutos.
3. Revelado: sumergir el gel en una solución que contiene 15 gr de hidróxido de sodio en un litro de agua bidestilada y 2 ml de formaldehido, agitar durante 5 a 10 minutos evitando que se despegue el gel del vidrio.
4. Stop: Sumergir el gel en la misma solución utilizada en el proceso de fijación, agitar durante 2 minutos.
5. Lavado: sumergir el gel en agua corriente por 5 minutos, dejar secar.

Una vez secos los geles se registraron las bandas obtenidas mediante la visualización de los productos de amplificación, colocando los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca. Los diferentes tamaños de bandas se consideraron diferentes alelos para el locus SSR analizado. Las imágenes se almacenaron mediante digitalización, utilizando Scanner Astra 2400slt.

Tabla 2.2. 15 SSR utilizados para caracterizar las nueve poblaciones de festuca alta colectadas, nombre del SSR, abreviatura, autor del SSR, secuencia forward, secuencia reverse, temperatura de melting calculada y temperatura de melting ajustada.

SSR	SSR abreviado	Autor	Secuencia forward	Secuencia reverse	Temperatura calculada (°C)	Temperatura ajustada (°C)	
NFA002	a-02	Saha <i>et al.</i> , 2006	GCTCCAGCTTCTCCATCATC	ACCAAGTCGTCCAAGTCAGC	62	58	
NFA015	a-15		GCGTCCACTAACAACACCAA	AGCAAGGCCAGCAAAAATTA	58	54	
NFA019	a-19		TGGATTTGCAATTAGCCTCA	GCTCGTGTATGGCCTTCAAT	58	54	
NFA023	a-23		AGTCGGTGGTGAAGCTGAAG	TACAAGTGGGGGCTGGTCA	62	58	
NFA024	a-24		TGCCACGAGGTCTATCTTC	AGCTTCCCCTTCATTCCACT	61	57	
NFA031	a-31		ACGGTCTGTACCGTGGATGT	GCTGTAGACTCAGCCGAACC	63	59	
NFA034	a-34		GCTGGGTGTAGGGCTGTAAA	CTCCTTTCCATCACCTCTGG	62	58	
NFA041	a-41		TCCTGAGAGACATCGAGCAAG	TCAAAAGCCAAACACTTCC	57	53	
NFA048	a-48		CAGGCTGTAAACGGTGTCTCT	CCTTCTTCTTGGGAGGGAAA	61	57	
NFA058	a-58		CAATCTACCGTCGCTTCACC	CAAAACCAGGTGGCAGATTT	60	56	
NFA064	a-64		TCATTTGACGCCACTTGAAC	GTCTTAGCGCCTTCCTTGGT	58	54	
NFA066	a-66		CTCCCCGTCCTTCCATCT	CAACCTCCTCCACCATCTTG	58	54	
LPSSRK03B03	B03		Jones <i>et al.</i> , 2001	GGGAATCTGGCAGAAGTATCACGT	GAAGATCTGGCCAAGTCTAATCCG	72	68
LPSSRK10H05	H05			AAGGAGACCTGGCAGCTTGGTGCT	CGACAAAGGTTTACAATGGAGGAG	74	70
LPSSRK02E08	E08	TCTGAAAGCCCGAGTGAGCG		CGACTGTGGCAGGGCTGACG	66	62	

7. Análisis estadístico

7.1. Matriz básica de datos (MBD)

El análisis estadístico de los datos se realizó con el fin de cuantificar la variabilidad genética de las poblaciones y estimar las relaciones genéticas entre ellas. Para tal fin se construyó una MBD a partir de las bandas observadas para cada locus SSR. Las bandas fueron codificadas como variables binarias (presencia/ausencia) mediante 1 y 0 (Saha *et al.*, 2005). Los individuos fueron ubicados en filas y los alelos en columnas.

Debido a que los marcadores moleculares del tipo SSR son codominantes, se espera que en un individuo perteneciente a una especie diploide (2X) se puedan observar hasta 2 bandas por locus (dependiendo de si son homocigotos o heterocigotos). En el caso de festuca alta, que es una especie alohexaploide con $2n=6x=42$ cromosomas, se debe tener en cuenta la posibilidad de obtener más de dos bandas por individuo heterocigota para cada SSR.

7.2. Software

Para el análisis de los datos obtenidos de SSR se utilizaron dos software estadísticos. El software Info-Gen/P versión 2016 (Balzarini y Di Rienzo, 2016) permite analizar datos de marcadores moleculares de distinta naturaleza suponiendo que los mismos se colectan para cada entidad biológica de interés (individuo o población) para identificar el estado alélico de múltiples loci.

7.3. Estructura poblacional

Se utilizó el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) que realiza inferencias bayesianas para realizar agrupamientos de genotipos debido a la presencia de subpoblaciones utilizando datos de marcadores genotípicos. El programa asigna probabilísticamente la pertenencia de un individuo a una o a más de una población. El último tipo de genotipos se denominan mezclas, ya que presentan fracciones del genoma pertenecientes a antepasados provenientes de distintas poblaciones. Para el análisis se consideraron los parámetros número de iteraciones “longitud” de *burn-in*, número de iteraciones MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) y el número de *runs* (repeticiones, *r*) para cada valor K de subpoblaciones. El *burn-in* corresponde al período en el que se correrá la

simulación previa a la recolección de datos para minimizar el error de la configuración inicial (MCMC). Los resultados obtenidos se cargaron en el programa on line STRUCTURE HARVESTER (Earl y Von-Holdt, 2011) y se calcularon los valores de verosimilitud a través de múltiples valores de K mediante el método de Evanno *et al.* (2005), para detectar el número de grupos (subpoblaciones) que mejor se adaptan a los datos. Una vez determinado el valor de K más probable, se obtienen r matrices Q, $n \times k$ (siendo r número de repeticiones, n número de individuos y k número de subpoblaciones). Cada una de las matrices Q ($n \times k$) representan la probabilidad de membresía de cada genotipo dentro de los diferentes grupos. Al analizar la conformación de los agrupamientos, se considera que un genotipo es asignado a un grupo, si el valor de membresía es mayor o igual a 0,7. En caso de no cumplir la condición para ninguno de los grupos, será asignada a un grupo extra denominado *mezcla*. Cada genotipo es representado por una columna que se pintan de un color dependiendo a que población pertenezcan o de varios colores en los casos que una línea comparta cierta fracción de su genoma con varias subpoblaciones (modelo de ancestría mezcla o *admixture*).

7.4. Descripción de marcadores moleculares

Cada SSR fue descrito según el número de alelos y contenido de información polimórfica (PIC). El valor de PIC expresa la capacidad de un marcador para establecer polimorfismos en la población en función del número de alelos detectados y de sus frecuencias de distribución (Powell *et al.*, 1996). Los marcadores monomórficos presentan un valor de PIC de cero.

7.5. Estimación de la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones

7.5.1. Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA)

El *Analysis of Molecular Variance* – AMOVA- (Excoffier *et al.*, 1992) es un método para estimar la diferenciación de una población directamente de datos moleculares y evaluar hipótesis sobre dicha diferenciación. Es un método de partición de sumas de cuadrados, en el contexto de información molecular multivariada. Es ampliamente usado ya que, por basarse en distancias (*Simple Matching* (1-S)), no depende de tantos supuestos biológicos como las técnicas de análisis basadas en frecuencias alélicas.

En este trabajo, se estimó la variancia de los componentes de distancia intrapoblacionales e interpoblacionales mediante el AMOVA utilizando el modelo lineal:

$$p_{ij} = p + B_i + \omega_{ij}$$

Donde p_{ij} es el genotipo de la j -ésima planta en la i -ésima población y p genotipo esperado.

La variancia total σ^2 es:

$$\sigma^2 = \sigma_B^2 + \sigma_\omega^2$$

Donde σ_ω^2 es la variabilidad entre individuos dentro de una misma población y σ_B^2 es la variancia entre distintas poblaciones.

7.5.2. Matriz de distancia genética

A partir de la matriz básica de datos se construyó una matriz de distancia genética (D) utilizando el coeficiente Dice. El índice de similitud de Dice pertenece al grupo de medidas de similitud sin simetría en cuanto a la co-presencia y co-ausencia de alelos ya que no considera en su expresión el conteo de coincidencias por falta de bandas, pero si tiene en cuenta la diferencia de alelos. Esto es importante a tener en cuenta ya que la ausencia de banda en forma simultánea no necesariamente implica similitud genética. Para este índice de similitud (S), la distancia genética se expresa matemáticamente como $(1-S)^{1/2}$.

La distancia entre X e Y se calcula según:

$$D_{xy} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

Donde:

- a** es el número de bandas compartidas por los individuos x e y
- b** es el número de bandas ausentes en el individuo x y presentes en el individuo y
- c** es el número de bandas presentes en el individuo x y ausentes en el individuo y

7.6. Análisis multivariados

7.6.1. Análisis de Ordenamiento: Coordenadas Principales (AcoorP)

Las bases de datos de variables discretas como la de los marcadores codificados en forma binaria son frecuentemente exploradas mediante análisis de coordenadas principales (ACoorP) o escalamiento multidimensional métrico (Gower, 1967). La técnica es particularmente útil ya que al trabajar con una matriz de distancias es posible seleccionar aquella que es apropiada según la naturaleza del dato. En el caso de utilizar datos binarios y seleccionar medidas de similaridad en lugar de distancias, luego las similitudes deben expresarse como distancias. Este procedimiento se puede realizar a través de distintas transformaciones matemáticas, como $(1-S)^{1/2}$.

El Análisis de Coordenadas Principales es una técnica multivariada de reducción de dimensión (TRD) que permite 1) resumir y graficar datos de marcadores de un conjunto de entidades, 2) explorar tendencias y relaciones entre éstas y 3) agrupar y clasificar no sólo entidades sino también variables.

Para este análisis se utilizó la matriz de distancia (Dice) obtenida a partir de la transformación $(1-S)^{1/2}$.

7.6.2. Análisis de conglomerados: Cluster

El objetivo del análisis de conglomerados (Cluster) es formar grupos tal que los elementos de un grupo sean más parecidos entre sí que con los elementos de otro grupo. El mismo se aplica cuando se supone que existe una estructura y se desea identificarla. Los resultados del agrupamiento se pueden observar a través de un dendrograma. Para el análisis de los datos moleculares se realizaron dos tipos de agrupamientos, uno teniendo en cuenta a las poblacionesl y otro teniendo en cuenta los genotipos. El agrupamiento por genotipos se realizó mediante el método de unión de vecino no ponderado sobre la matriz de distancias conformada a partir del índice de disimilitud de Dice en el paquete de software DARWIN v6.0.014.

7.6.3. Análisis espacial de la variabilidad genética (Mantel)

Muchos de los procesos que influyen sobre la variación genética están mediados por el espacio. Por ello, el análisis conjunto de la información genética y espacial permite inferir y explorar procesos genéticos subyacentes. El análisis de la variabilidad genética y su estructura espacial, puede referirse a su relación con la distancia geográfica o puede incorporar, además, las características del ambiente.

La prueba de Mantel es utilizada para estudiar la congruencia o correspondencia entre dos matrices de distancias (Mantel, 1967). En general se utiliza cuando es de interés conocer si existe correlación lineal entre matrices de distancias genéticas y distancias geográficas.

El estadístico Z de Mantel es:

$$r_{xy} = \frac{SP(X,Y)}{\sqrt{SS(X) \cdot SS(Y)}}$$

Donde el numerador representa la covarianza entre matrices y el denominar la raíz cuadrada del producto de la varianza de cada matriz. Cuando la correlación es estadísticamente significativa, se concluye que existe estructura espacial. Debido a que la prueba de Mantel mide la correlación entre matrices de distancia, es necesario calcular las mismas como un paso previo a Mantel. Para este análisis se utilizó la matriz de distancia (Dice) obtenida a partir de la transformación $(1-S)^{1/2}$ y la matriz de distancia geográfica calculada utilizando la fórmula de Vincenty (<https://es.planetcalc.com/73/>). Dicha fórmula se utiliza para calcular distancias teniendo en cuenta la curvatura de la tierra.

8. Análisis conjunto de la Caracterización morfológica y molecular

El objetivo de este análisis fue determinar las posibles relaciones existentes entre los datos provenientes del estudio de la variabilidad genética a nivel molecular y a nivel morfológico.

8.1. Análisis de Procrustes Generalizado

El Análisis de Procrustes Generalizados (Gower, 1975) permite 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). Previo

a esta configuración, se obtuvieron las componentes principales (CP) de los datos morfológicos estandarizados y las coordenadas principales (PCO) de los datos moleculares derivados del ACoorP sobre la matriz de distancia obtenida con la transformación $(1-S_{ij})^{1/2}$, donde S_{ij} es el índice de similitud de Dice. De esta forma se obtuvo un punto consenso entre las ordenaciones de las poblaciones producidas por cada conjunto de variables, como también su dispersión desde dicho punto. Para este análisis se incluyeron aquellas variables morfológicas que fueron medidas sobre los mismos individuos sobre los cuales se analizó su perfil molecular. Los datos fueron analizados mediante el software Info-Gen.

RESULTADOS

1. Extracción y cuantificación de ADN genómico

El protocolo utilizado permitió obtener ADN en cantidad y calidad suficiente. En la Figura 2.1 se observa la cuantificación de ADN de 20 individuos pertenecientes a la población 2. Las concentraciones de ADN obtenidas en las 9 poblaciones oscilaron entre 1000-10000 ng/ μ l por individuo.

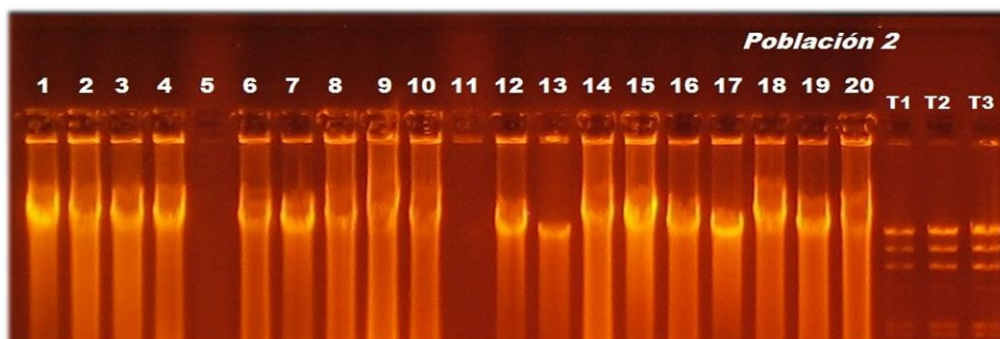


Figura 2.1. Cuantificación de ADN de 20 individuos pertenecientes a la población 2. T1: 1 μ l ADN testigo [125, 50, 30 ng/ μ l]; T2: 2 μ l ADN testigo [250, 100, 65 ng/ μ l]; T3: 3 μ l ADN testigo [375, 150, 97 ng/ μ l].

2. Amplificación del ADN genómico y selección de SSR informativos

Los 15 SSR utilizados presentaron productos de amplificación. En la Figura 2.2 se observan los distintos patrones de bandas de algunos de los SSR utilizados.

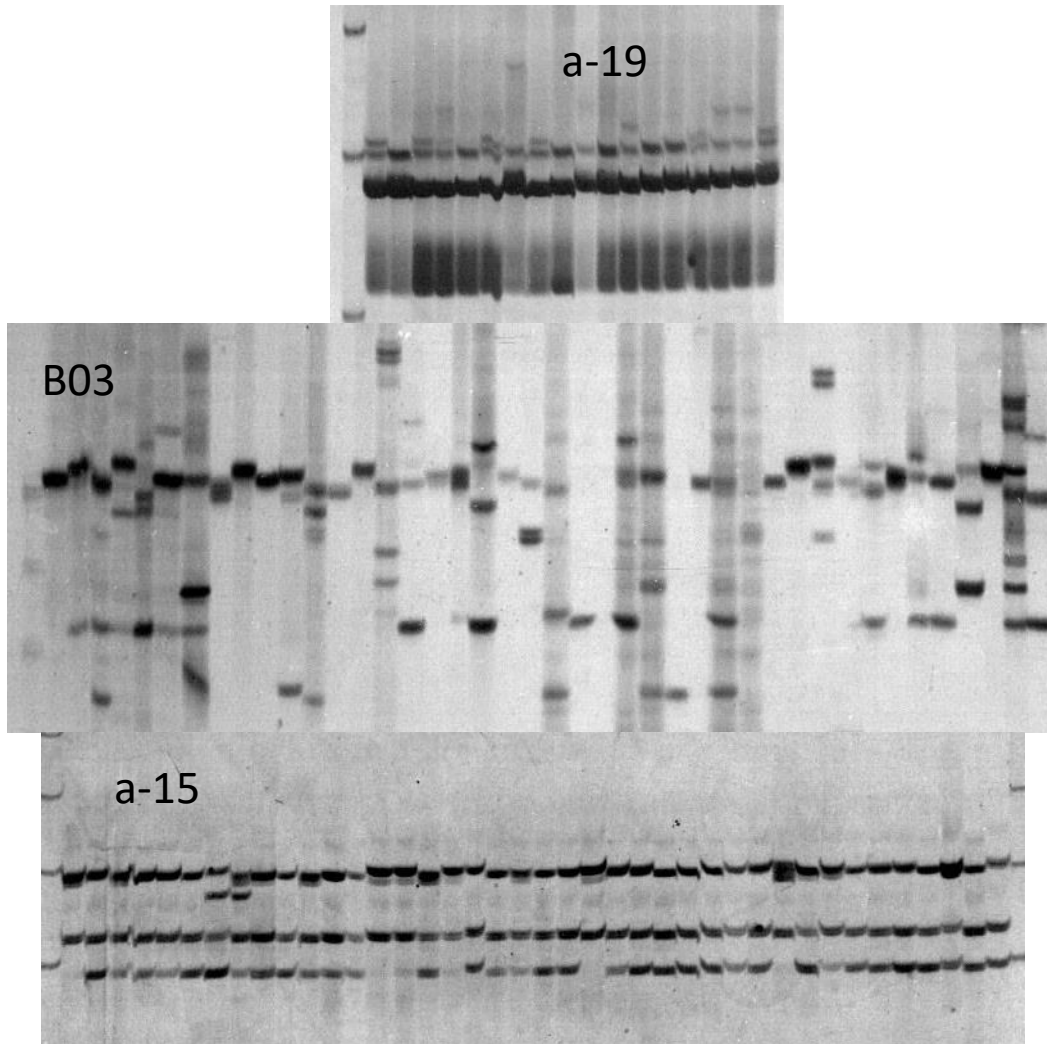


Figura 2.2. Patrones de bandas de los SSR NFFa015 (a-15), NFFa019 (a-19) y LPSSRK03B03 (B03) en geles de poliacrilamida al 6%.

3. Análisis y cuantificación de la variabilidad genética

Los 15 marcadores SSR utilizados mostraron un total de 220 alelos (bandas) en las nueve poblaciones estudiadas. Se detectó una variación de entre 7 y 30 alelos por locus. El SSR NFFa024 (a-24) presentó siete alelos, siendo el que menor polimorfismo. El SSR LPSSRK02E08 (E08) fue de más polimórfico con 30 alelos (Tabla 2.3).

El índice de contenido de información polimórfica (PIC) varió entre 0,111 y 0,359 (Tabla 2.3). Los SSR más informativos y con mayor capacidad discriminante entre las poblaciones

fueron NFFa064 (a-64), NFFa031 (a-31) y NFFa019 (a-19), mientras que el de menor poder discriminante fue el LPSSRK10H05 (H05).

Tabla 2.3. Número de bandas totales y contenido de información del polimorfismo (PIC) de los 15 SSR utilizados en la caracterización molecular de las nueve poblaciones de festuca alta.

SSR	N° bandas totales	PIC
a-02	11	0,214
a-15	15	0,282
a-19	8	0,331
a-23	8	0,34
a-24	7	0,283
a-31	8	0,338
a-34	12	0,238
a-41	11	0,324
a-48	15	0,291
a-58	22	0,18
a-64	12	0,359
a-66	15	0,244
B03	17	0,228
H05	29	0,111
E08	30	0,215
total	220	

3.1. Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA)

El AMOVA demostró la existencia de variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones ($p < 0,0001$). Además detectó que un 93% de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones y el 7% restante se encuentra entre las poblaciones (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Análisis de la Variancia Molecular entre y dentro de las nueve poblaciones de festuca alta.

Análisis de la Varianza							
F.V.	SC	gl	CM	p-valor	Iter	Var. estimada	% Var. estimada
Población	0,13	8	0,02	<0,0001	400	2,7E ⁻⁰⁴	6,52
Dentro	1,38	351	3,9E ⁻³	<0,0001	400	3,9E ⁻⁰³	93,48
Total	1,51	359	4,2E ⁻³			4,2E ⁻⁰³	100

3.2. Matriz de distancia genética

El promedio de los valores de distancias genéticas entre los pares de poblaciones fue 0,0027, con valores extremos de 0,0011 y 0,0051. Los pares de poblaciones que presentan mayor similitud a través de todos los loci son las poblaciones 6 y 7, las poblaciones 7 y 8, las poblaciones 4 y 6, y las poblaciones 5 y 6. Los pares de poblaciones que presentan mayor distancia son las poblaciones 1 y 8, las poblaciones 1 y 2, las poblaciones 3 y 5, y las poblaciones 3 y 9 (Tabla 2.5)

Tabla 2.5. Distancias genéticas entre las nueve poblaciones de festuca alta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0	0,005	0,0046	0,0043	0,0031	0,0024	0,0026	0,0051	0,0032
2		0	0,0015	0,002	0,004	0,002	0,0022	0,0032	0,0033
3			0	0,0023	0,0049	0,0023	0,0028	0,004	0,0049
4				0	0,0026	0,0013	0,0019	0,0019	0,0018
5					0	0,0013	0,0025	0,0046	0,002
6						0	0,0011	0,0023	0,0019
7							0	0,0012	0,0017
8								0	0,002
9									0

4. Estructura poblacional

Se realizaron corridas con 50.000 iteraciones, tanto para burn-in como para el procedimiento MCMC. La cantidad de subpoblaciones (K) probadas fue de 2 a 5 con 3 corridas (repeticiones, r) independientes con el fin de disminuir el error. Luego se calculó, mediante el programa Harvester, el valor de K más probable, el cual fue igual a 3 (Tabla 2.6). Cuando se analiza cómo están conformados los agrupamientos, se considera que una línea es asignada a un grupo, si el valor de membresía es mayor o igual a 0,7 (Anexo 2, Tabla 2.1). El resultado se visualiza a través de un diagrama denominado barplot, donde cada grupo es representado con un color y cada genotipo con una barra.

Al observar el barplot generado por STRUCTURE se pueden identificar tres grandes grupos de genotipos, en este caso llamados Pool1, Pool2 y Pool3. El Pool1 estuvo conformado con genotipos provenientes de las poblaciones 4, 5, 6, 7, 8, y 9. El Pool2 estuvo conformado con genotipos provenientes de las poblaciones 2, 3, 4 y 9. El Pool3 estuvo formado solo por genotipos provenientes de la población 1 (Figura 2.3).

Tabla 2.6. Cálculo de los valores de Delta K a partir de los valores de verosimilitud [LnP(K)] para diferente número de subpoblaciones (K).

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
2	3	-6239.800000	3.716181	—	—	—
3	3	-5983.566667	2.676440	256.233333	162.133333	60.577972
4	3	-5889.466667	7.105866	94.100000	23.466667	3.302436
5	3	-5818.833333	8.000208	70.633333	—	—

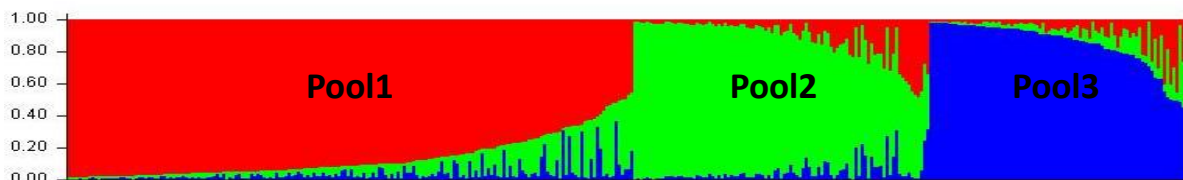


Figura 2.3. Barplot obtenido por el programa STRUCTURE con los datos de 15 SSR en nueve poblaciones de festuca alta.

5. Análisis multivariados

5.1. Análisis de Coordenadas Principales (AcoorP)

El AcoorP muestra que las dos primeras CP explican el 32,5% de la variación molecular total de las nueve poblaciones, mientras que con la tercera CP se explica un 47% de la variabilidad total (Tabla 2.7).

La primera coordenada explicó el 17,2% encontrada, separando a las nueve poblaciones en dos grupos, uno conformado con las poblaciones 2, 3, 4, 8 y 9, y el segundo grupo se conformó con las poblaciones 1, 5, 6 y 7. La segunda coordenada explicó el 15,3% de la variabilidad y separó a las nueve poblaciones en dos grupos, uno formado por las poblaciones 1 y 2, y el otro grupo se formó con las poblaciones restantes (figura 2.4).

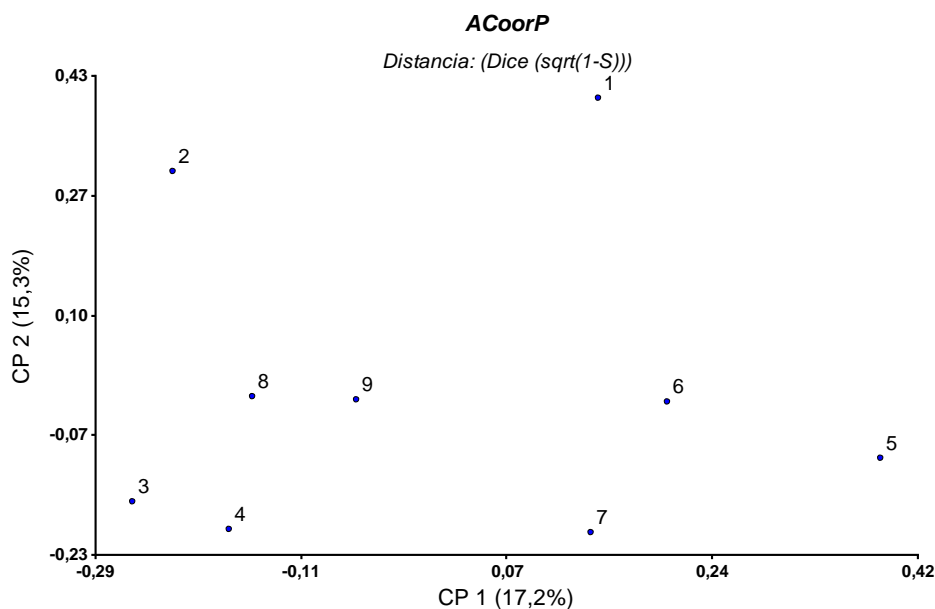


Figura 2.4. Análisis de Coordenadas Principales de las 9 poblaciones basado en la distancia genética de Dice. CP1 y CP2 son la primera y segunda coordenadas principales, respectivamente.

Tabla 2.7. Proporción de la variancia molecular total de las nueve poblaciones de festuca alta.

Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum
1	0,41	0,17	0,17
2	0,37	0,15	0,32
3	0,35	0,15	0,47
4	0,32	0,13	0,60
5	0,31	0,13	0,73
6	0,23	0,10	0,83
7	0,21	0,09	0,92
8	0,20	0,08	1,00
8 autovalores no mostrados			

5.2. Análisis de conglomerados

El análisis de Cluster de las nueve poblaciones realizado a través del método UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice, se muestra en el dendrograma de la Figura 2.5 (Correlación cofenética = 0,761). La distancia genética entre las poblaciones osciló entre 0,65 y 0,80, no observándose agrupamiento de las mismas hasta el 75% de la distancia presentada (0,63). Se detectaron cuatro grupos de poblaciones a una distancia de 0,78. La primer población en separarse del resto es la 2, luego se separa la población 3, seguida por

la población 1, el último grupo está conformado por las poblaciones 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

El análisis de Cluster de los 360 genotipos realizado mediante el algoritmo de unión de vecino no ponderado construido con los índices de disimilitud de Dice se muestra en la Figura 2.6. Se puede observar que en ambos graficos siempre se desprende del resto la población 1 (Grupo 3 - Azul). En el dendograma relacionado a STRUCTURE (A) los grupos 1 (rojo) y 2 (verde) no producen un patrón de agrupamiento demasiado claro. En el dendograma relacionado al origen poblacional de los genotipos (B) se diferencian algunas poblaciones (4, 5 y 9) mientras que por otro lado, se puede observar el agrupamiento de genotipos provenientes de distintas poblaciones.

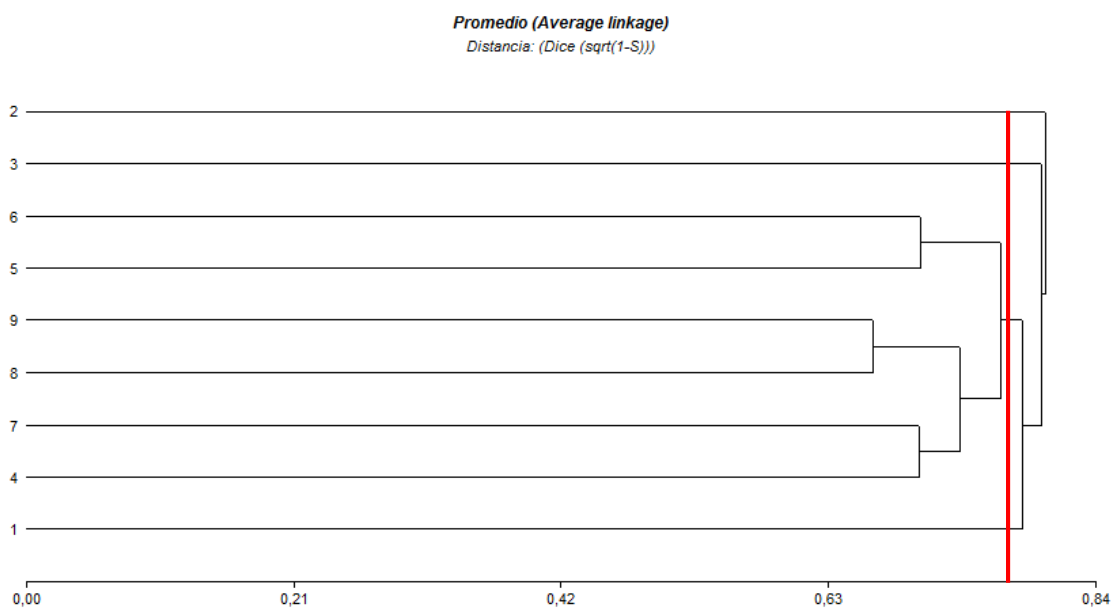


Figura 2.5. Dendrograma de las nueve poblaciones de Festuca alta obtenido con 15 SSR, a través del método UPGMA y el coeficiente de similitud de DICE.

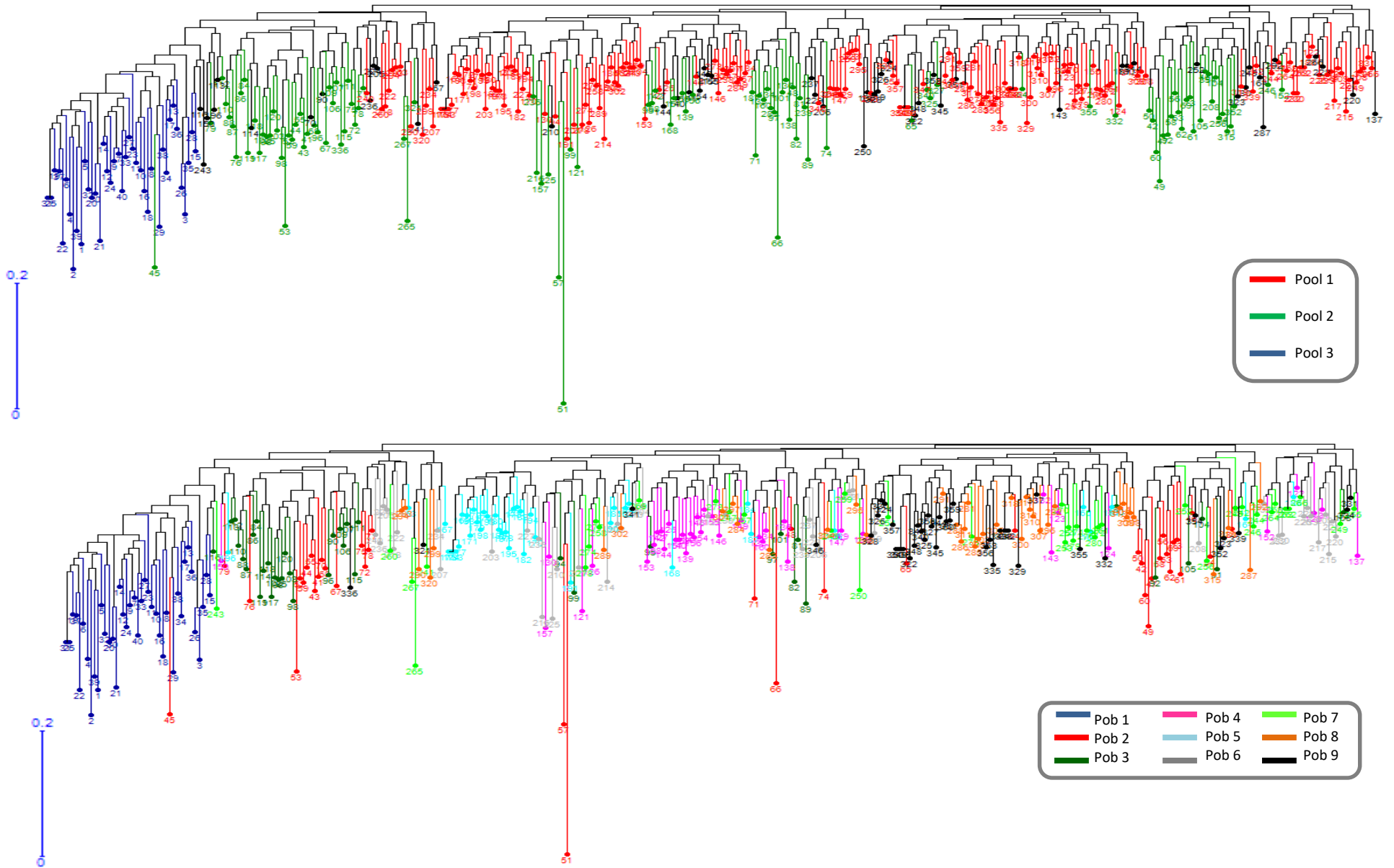


Figura 2.6. Dendrograma de unión de vecinos no ponderado basado en índices de disimilitud de Dice que muestran las relaciones entre los 360 genotipos de festuca alta. A) Los genotipos se colorearon de acuerdo a la asignación de grupos inferidos por STRUCTURE. B) Los genotipos se colorearon según la pertenencia a las poblaciones.

6. Análisis espacial de la variabilidad genética (Mantel)

No se encontró correlación lineal estadísticamente significativa ($r = -0,36$, valor-P = 0,9620) entre las distancias geográficas y las moleculares (Figura 2.7).

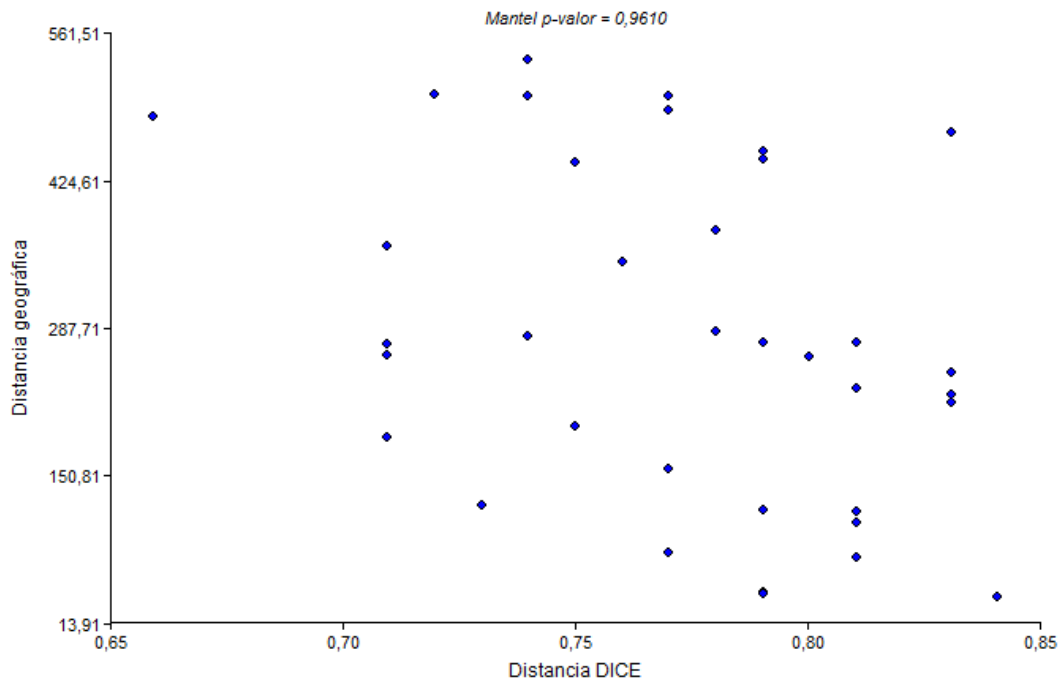


Figura 2.7. Test de Mantel, correlación entre la matriz de distancias geográficas y la matriz de distancias genéticas.

7. Análisis conjunto de la Caracterización morfológica y molecular

7.1. Análisis de Procrustes Generalizado (APG)

En la configuración consenso obtenida del APG entre los datos morfológicos y moleculares se observa que la variabilidad explicada a través del eje 1 de la descomposición de la matriz de consenso es 56% y a través del eje 2 el 44% restante (Figura 2.8). El punto de consenso se representa con un círculo negro, cada punto de consenso se encuentra a una distancia equidistante de los parámetros moleculares y morfológicos. Cuanto menor es la distancia entre ellos, mayor es el grado de consenso entre ambas caracterizaciones. Las poblaciones 8, 1, 9 y 5 presentan una mayor dispersión o discrepancia entre los datos morfológicos y los moleculares, mientras que las poblaciones 6, 7 y 2 presentan una dispersión intermedia, y las poblaciones 3 y 4 presentan la menor dispersión y por lo tanto mayor grado de consenso entre ambas caracterizaciones.

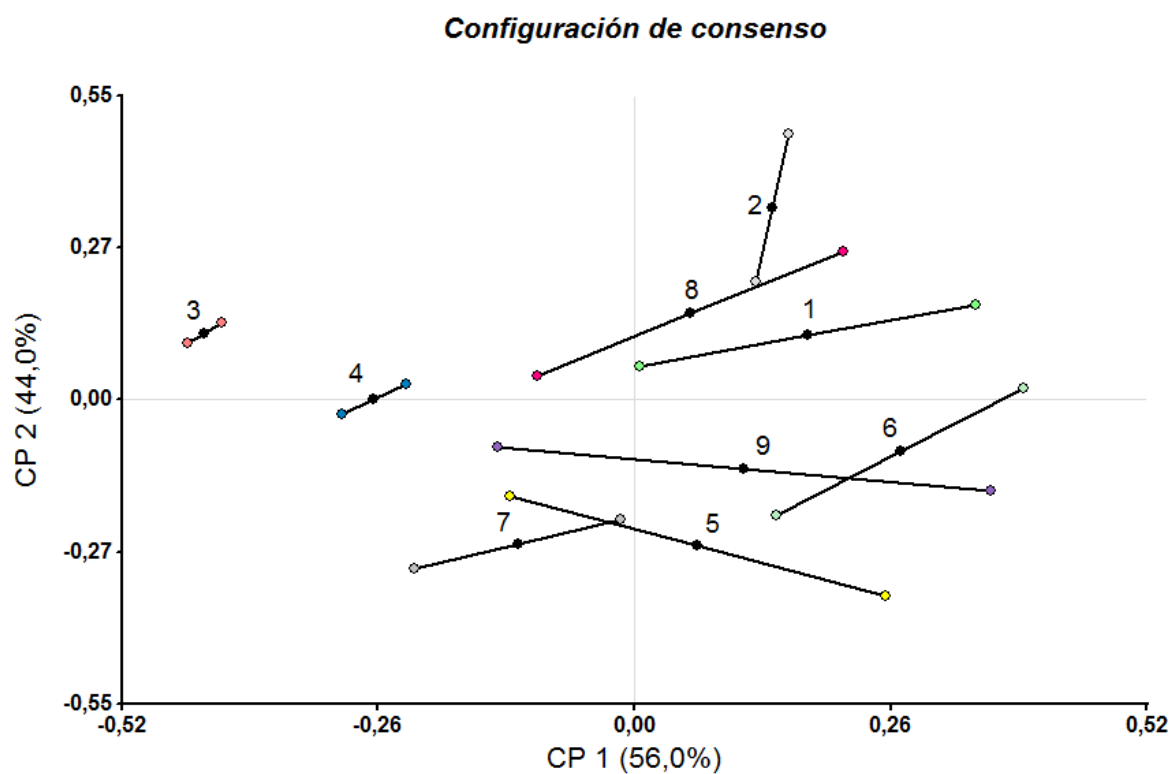


Figura 2.8. Ordenamiento consenso de las nueve poblaciones producido por los datos morfológicos y moleculares.

DISCUSIÓN

La determinación de la variabilidad genética a nivel poblacional, es de gran importancia para la conservación y utilización de las especies (Gowda *et al.*, 2012). En el presente estudio se confirmó la hipótesis planteada, que existe elevada variabilidad genética a nivel molecular entre y dentro de las poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico. La magnitud de la variabilidad genética fue mayor entre los genotipos dentro las diferentes poblaciones respecto de la detectada entre las poblaciones.

El uso de los 15 SSR garantizó la detección de una gran cantidad de polimorfismos, mostrando un total de 220 alelos, con una variación de entre 7 y 30 alelos por locus, y un promedio de 14,67 alelos por marcador. Numerosos autores hallaron resultados coincidentes en la especie, entre ellos, Elazreg *et al.* (2011) evaluó cuatro accesiones de festuca alta con cinco SSR específicos de *Lolium perenne* obteniendo 39 alelos totales, con una variación de 1 a 12 alelos por marcador, con un promedio de 7,8 alelos por locus. Similarmente, Cuyeu *et al.* (2013) genotiparon 133 accesiones de festuca alta con 15 SSR obteniendo 214 alelos totales, con una variación de 5 a 24 por marcador y un promedio de 14,26 alelos por locus. Los mismos autores realizaron una selección de 22 poblaciones representativas de la variabilidad genética y mediante la utilización de los mismos 15 SSR detectaron 153 alelos totales con un promedio de 14 alelos por locus. Sun *et al.* (2015 a) evaluaron 100 accesiones de festuca alta mediante la utilización de 90 marcadores SSR, los cuales amplificaron un total de 1010 alelos con una variación de 3 a 27 alelos por marcador, con un promedio de 11,22 alelos por locus. Sun *et al.* (2015 b) genotiparon 100 accesiones de festuca alta mediante 102 marcadores SSR que generaron 1204 alelos, con una variación de 3 a 26 alelos por locus. Lou *et al.* (2015) evaluaron 115 accesiones de festuca alta con 90 marcadores SSR obteniendo 1010 alelos totales, con una variación de 3 a 27 alelos por marcador y un promedio de 11,22 alelos por locus. Amombo *et al.* (2018) evaluaron 114 accesiones de festuca alta mediante 99 marcadores SSR detectando 1015 alelos totales, con una variación de 3 a 27 alelos por marcador y un promedio de 10,25 alelos por locus.

En este trabajo, el índice de contenido de información polimórfica (PIC) varió entre 0,111 y 0,359. Los SSR más informativos y con mayor capacidad discriminante entre las poblaciones fueron NFFa064 (a-64), NFFa031 (a-31) y NFFa019 (a-19), mientras que el de menor poder discriminante fue el LPSSRK10H05 (H05). Los valores obtenidos en este trabajo fueron menores a los informados por Cuyeu (2008) evaluando 161 accesiones de festuca alta, aunque los valores fueron similares a los obtenidos previamente en la evaluación de seis accesiones (Cuyeu, 2008). Valores de PIC similares a los detectados en este trabajo fueron encontrados por Sun *et al.* (2015 a-b), Lou *et al.* (2015) y Maciel (2018) evaluando familias de medio hermanos de *Thinopyrum*

ponticum.

El AMOVA demostró la existencia de variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones, aunque la variabilidad intrapoblacional fue mayor. Resultados similares fueron reportados en diversas especies forrajeras (Cuyeu *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015 b; Acuña, 2008; Affinito, 2014; Maciel, 2018). La variación entre poblaciones y entre individuos dentro de la misma población, puede indicar respuestas genéticas a procesos de selección determinados por varios factores tales como el rango ecológico de la especie, la localización geográfica, la heterogeneidad ambiental y el sistema reproductivo, entre otros (Bradshaw, 1984; Briggs y Walters, 1984). El mayor polimorfismo intra-poblacional detectado en el presente estudio podría estar reflejando variaciones ambientales presentes en pequeña escala en los ambientes de colecta, donde ocurren presiones de selección como producto de la interacción clima-planta, suelo-planta, planta-planta y planta-animal.

Las distancias genéticas promedio entre poblaciones fue 0,0027, con valores extremos de 0,0011 y 0,0051. Estos valores se consideran bajos en comparación a los reportados por Lou *et al.* (2015) que detectaron una distancia promedio de 0,255 y Sun *et al.* (2015 a-b) que detectaron distancias entre 0,0165 a 0,4999. Las poblaciones con mayor similitud a través de todos los loci fueron las poblaciones 6 y 7, las poblaciones 7 y 8, las poblaciones 4 y 6, y las poblaciones 5 y 6. Mientras que las poblaciones con mayor distancia fueron las poblaciones 1 y 8, las poblaciones 1 y 2, las poblaciones 3 y 5, y las poblaciones 3 y 9. Los menores valores de distancias genéticas obtenidas en este trabajo pueden estar relacionados a que las poblaciones fueron colectadas en una región menor a las evaluadas en los trabajos citados, ya que representan accesiones a nivel mundial.

El análisis de la estructura poblacional mediante STRUCTURE identificó tres grandes grupos de genotipos entre las nueve poblaciones. El grupo 1 (pool 1) estuvo conformado con genotipos provenientes de las poblaciones 4, 5, 6, 7, 8, y 9. El grupo 2 (pool 2) estuvo conformado con genotipos provenientes de las poblaciones 2, 3, 4 y 9. El grupo 3 (pool 3) estuvo formado solo por genotipos provenientes de la población 1. Cabe destacar que las poblaciones 4 y 9 tuvieron genotipos pertenecientes a dos grupos distintos. El ACoorP diferenció cuatro grupos de poblaciones, dos grupos fueron unipoblacionales (1 y 2) y dos grupos se formaron con las poblaciones 3-4-8-9 y 5-6-7.

Del análisis de los genotipos individuales de las plantas a través de STRUCTURE y Cluster se desprende que la subpoblación tres del structure (Pool 3) constituida por la población 1 conforma un grupo compacto fácilmente definido por ambas metodologías. Este desprendimiento tan evidente de la población mencionada abre el interrogante sobre el origen de la misma y de si

está relacionado a algún otro carácter fenotípico.

Luego de la población 1, se encuentran las poblaciones 3 y 5 con una compacidad intermedia en cuanto a la distancia (o similitud) que tienen sus miembros. La población 3 (color verde oscuro) se encuentra relativamente cercana a la población 1 tomando a los miembros que la componen en un grupo. La población 5 (celeste) también puede identificarse como una rama definida del árbol ya que agrupa a la mayor cantidad de los miembros que la constituyen. Solo 8 de sus miembros se encuentran alejados. Las poblaciones 3 y 5, diferenciadas por origen, se ubican muy alejadas entre sí en el dendograma y dentro de la subpoblación 2 y subpoblación 1, respectivamente, del STRUCTURE.

Se observó una falta de congruencia en la clasificación de los individuos de la población 2; el STRUCTURE la ubica en la subpoblación 2 con altos valores de membresía, sin embargo en el dendograma se divide prácticamente en dos grupos alejados en los extremos y miembros dispersos en el resto del dendograma. Contrariamente a lo que se puede decir de las poblaciones 1, 3, y 5, el grueso de las poblaciones de festuca 2, 4, 6, 7, 8, 9 están constituidas por individuos parcialmente determinados en grupos, con muchos miembros fuera de ellos y dispersos en el dendograma, coincidentemente con los resultados obtenidos en el AMOVA, donde la mayor variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones.

El dendograma realizado con las poblaciones separa a las poblaciones 1, 2 y 3 a distancias grandes y diferentes del resto. Congruente en la cercanía de las poblaciones 2 y 3 con los resultados de STRUCTURE que la ubican dentro de la subpoblación 2. El resto de las poblaciones no reflejan los resultados de STRUCTURE y de los genotipos. Además, en el dendograma se observan dos grupos, uno formado por las poblaciones 5 y 6 y otro por las poblaciones 4, 7, 8 y 9.

En términos generales se puede decir que el dendograma capturó mucho mejor la diversidad de los genotipos. Se puede especular que las poblaciones de festuca alta derivan de al menos tres poblaciones originales, que se podrían identificar con las poblaciones 1, 3, y el resto; un cuarto origen podría ser la población 5. El STRUCTURE acumuló una enorme variación en la subpoblación 1 (Rojo), distinguiendo apropiadamente la población identificada como 1 en la subpoblación 3 (Azul) y la población 3 en la subpoblación 2 (Verde). La variación de la población 2 no fue capturada apropiadamente por las subpoblaciones del STRUCTURE y, posiblemente tampoco, por el dendograma de las poblaciones. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron obtenidos por otros autores, los cuales obtuvieron agrupamientos con orígenes mixtos (Sun *et al.*, 2015 a; Lou *et al.*, 2015; Amombo *et al.*, 2018). Los agrupamientos realizados no podrían explicarse geográficamente debido a la superposición de las poblaciones en distintos

grupos (o subpoblaciones).

Al evaluar las distancias geográficas y las distancias obtenidas mediante los marcadores moleculares se detectó que no existe correlación lineal estadísticamente significativa entre las mismas. Resultados similares fueron encontrados por Sun *et al.* (2015 b). El análisis de Procrustes Generalizado realizado entre datos morfológicos (capítulo 1) y moleculares evidenció variabilidad entre las poblaciones y un consenso medio en el ordenamiento de las mismas. Se pudo observar que las poblaciones 3 y 4 presentan una gran similaridad en ambas caracterizaciones, mientras que las poblaciones 6, 7 y 2 presentan una dispersión intermedia. En cambio las poblaciones 8, 1, 9 y 5 presentan gran discrepancia entre los datos morfológicos y moleculares. Este análisis pretende conjugar dos tipos de datos, en este caso, morfológicos y moleculares, para ser utilizados en programas de mejoramiento genético. El mismo estudio fue utilizado en otras especies forrajeras como *Lolium multiflorum* (Acuña, 2008), *Lotus tenuis* (Affinito, 2014) y *Thinopyrum ponticum* (Maciel, 2018).

CONCLUSIONES

- Se corroboró la existencia de variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de festuca alta colectadas en los ambientes periféricos al nicho ecológico determinado en la región pampeana mediante marcadores moleculares.
- La variabilidad genética detectada fue mayor dentro de las poblaciones que entre poblaciones.
- La población 1 (Juncal) conforma un grupo compacto y aislado según STRUCTURE y Cluster por genotipos.
- No se detectó correlación lineal entre las distancias geográficas y las distancias obtenidas mediante los marcadores moleculares.
- El análisis de Procrustes Generalizado reveló un alto consenso en el ordenamiento de las poblaciones, confirmando la utilidad de la evaluación morfológica y molecular en la caracterización de poblaciones.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO INICIAL DE FMH DE FESTUCA ALTA BAJO CONDICIONES DE SALINIDAD EN HIDROPONIA

INTRODUCCIÓN

En la República Argentina hay aproximadamente 85 millones de hectáreas afectadas por exceso de sales y sodio, incluyendo los ambientes áridos y semiáridos del país (Szabolcs, 1979) ubicándose en tercer lugar, después de Rusia y Australia, con mayor superficie de suelos afectados por sales en el mundo (FAO, 2000). Entre las regiones más afectadas se encuentran el Chaco semiárido, la Depresión del Salado y el noroeste de Buenos Aires, zonas con una gran proporción de suelos halomórficos (Casas, 2013), considerados marginales para la producción agrícola (Lavado, 2008). En particular, en la Pampa Deprimida, la gran extensión de estos suelos presentan drenaje deficiente, anegamiento y procesos de alcalinización y salinización (Zamolinski, 2000), motivo por el cual se destinan principalmente a la producción ganadera (Imbellone *et al.*, 2010; Lavado, 2016).

Los suelos salinos se caracterizan por contener una alta concentración de sales solubles, con una conductividad eléctrica de 4 dS/m o más, que es equivalente a aproximadamente 40 mM de NaCl (Munns y Tester, 2008; Maas y Hoffman, 1977; Tester y Davenport, 2003). La recuperación de estos suelos mediante adición de químicos es económicamente inviable (Priano y Pilatti, 1989). Por lo tanto, el desarrollo de cultivares de especies forrajeras tolerantes al estrés salino, es imprescindible, para lograr una producción sustentable y para satisfacer la creciente demanda de alimentos (Muhammad y Nudrat, 2009).

El efecto de la salinidad en las plantas produce cambios en su composición interna (Oliveira *et al.*, 2008; Rowell, 1992), reduciendo la capacidad de absorción de agua (Epstein, 1979; Dodd y Donovan, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000) y produciendo toxicidad a través de los iones presentes en las sales (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2005; Martín *et al.*, 2012). Al reducir la capacidad de captación de agua, se producen situaciones de estrés hídrico y cierre de estomas por el efecto osmótico de las sales en las raíces (Munns y Tester, 2008), con reducción de la fotosíntesis (Tester y Davenport, 2003) y un aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los diferentes compartimentos celulares.

La consecuencia más evidente en las plantas debido al estrés salino es una disminución marcada en los parámetros de crecimiento, como la germinación, la producción de materia seca, el contenido de humedad en hojas, el número de tallos, la longitud de hojas (Vázquez de Aldana *et al.*, 2011; Qadir *et al.*, 2014; Shabala *et al.*, 2014; Munns y Gilliam, 2015), hasta la senescencia de las mismas.

La tolerancia a la salinidad se define en términos generales como la capacidad de las plantas para crecer satisfactoriamente en suelos salinos, independientemente del mecanismo que utilicen para disminuir el efecto negativo de las sales solubles. Las definiciones varían acorde a los

autores; Bernstein y Hayward (1958) definen a la tolerancia como la habilidad de una planta para crecer y completar su ciclo de vida en un medio estresante; mientras que Maas y Hoffmann (1977) definen la tolerancia en función de la reducción porcentual del rendimiento en condiciones salinas con respecto a no salinas; por su lado Yeo (1983) la define como la capacidad de un individuo de mantener el crecimiento y el metabolismo en situaciones de estrés por salinidad; y Sandhu *et al.* (2017) la definen como la capacidad de una planta para mantener su vigor, crecimiento y rendimiento en concentraciones elevadas de sal. Todas estas definiciones comparten básicamente el mismo concepto, que involucra la afectación diferencial del crecimiento de las plantas en condiciones salinas.

El nivel o grado de tolerancia a la salinidad, difiere acorde a cada especie y a cada grupo de genotipos, es dependiente de numerosas y complejas características que ocurren dentro de las plantas, como la habilidad para compartimentalizar iones, la regulación de la transpiración, el control de la pérdida de iones por el apoplasto de la raíz, la naturaleza de las membranas de la vacuola, la síntesis de solutos y la capacidad para tolerar bajas relaciones K^+/Na^+ en el citoplasma (Pesqueira, 2008). Adicionalmente, el grado de tolerancia puede variar entre los sucesivos estados de desarrollo de las plantas (Bernstein y Hayward, 1958), dependiendo de la especie en estudio y del grupo de genotipos estudiados, involucrando un gran número de características fisiológicas y genéticas asociadas. Por lo tanto, la evaluación de la tolerancia a la salinidad requiere que se realicen mediciones precisas sobre un gran número de individuos pertenecientes a un origen genético conocido y a una condición ambiental definida.

Usualmente la fenotipificación de la tolerancia se realiza principalmente a través de caracteres morfofisiológicos (Walter *et al.*, 2012) registrados en los genotipos investigados y en relación a su estado fenológico (Tobe *et al.*, 2000); en particular las primeras etapas de crecimiento de las plantas luego de la implantación del cultivo son las más críticas, debido a que afecta el establecimiento y la persistencia (Bradford, 1995; Praat, 1995; Hanselin y Eggen, 2005), incluso en los cultivos más tolerantes (Maas y Hoffman, 1977).

La metodología más utilizada compara el peso de las plantas creciendo en condiciones de salinidad con el peso de las mismas plantas creciendo en condiciones no salinas (Rajendran *et al.*, 2009), durante un período de tiempo determinado, lo que permite detectar diferencias en los mecanismos de tolerancia (Munns y Tester, 2008; Rajendran *et al.*, 2009; Munns, 2010). En el caso de las especies forrajeras, los principales caracteres que aportan información son la producción de biomasa (aérea y radicular), la estructura de la planta (altura, número de macollos) y la calidad del forraje, entre otros. Esta evaluación se ha aplicado en numerosas especies con la finalidad de cuantificar la diversidad genética de la tolerancia a la sal (Shahzad *et al.*, 2012).

En las décadas de 1970 y 1980 los estudios de tolerancia a la salinidad en forrajeras se realizaban con un gran número de especies en condiciones de campo, poco controladas experimentalmente (Albert y Popp, 1977; Briens y Larher, 1982; Gorham *et al.*, 1980; Glenn, 1987). Los resultados obtenidos en estas condiciones demostraron tener un elevado efecto ambiental, con una gran variación espacial y temporal (Flowers y Hajibagheri, 2001; Munns *et al.*, 2002; Genc *et al.*, 2007; James *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2009; Kopittke *et al.*, 2011; Tavakkoli, 2011), que provocaba una exposición muy dispersa de las plantas a las diferentes concentraciones de sal durante todo su ciclo de vida. Si bien esta situación experimental era la más cercana a las condiciones reales de crecimiento de las plantas, no permitía separar los efectos confundidos del ambiente. A partir de 1980, las evaluaciones se realizaron sobre un gran número de especies, pero en condiciones controladas de luz, temperatura y concentración salina (Ahmad *et al.*, 1981 a, b; Dudeck y Peacock, 1985; Gorham *et al.*, 1984; Glenn, 1987). Actualmente se utilizan metodologías rápidas, de bajo costo y eficaces, que permiten simular la temperatura, humedad y radiación (Walter *et al.*, 2012), permitiendo la detección de variabilidad genética con mayor precisión (Ashraf y McNeilly, 1988; Munns y James, 2003; Arzani, 2008). Uno de los métodos más difundidos en la evaluación de la tolerancia a salinidad en especies forrajeras, ha sido el sistema de cultivo hidropónico, que permite aplicar diferentes concentraciones salinas en simultáneo, sobre numerosos genotipos, disminuyendo el error experimental, permitiendo estimar la tolerancia y despejar con exactitud el efecto de la varianza genética (Dudeck *et al.*, 1993; Horst y Taylor, 1983; Horst y Beadle, 1984; Torello y Symington, 1984; Marcum y Kopec, 1997; Marcum *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 2000, Qian *et al.*, 2001).

Festuca alta es considerada tolerante a la salinidad (Alshammary *et al.*, 2004) aunque disminuye su potencial productivo con valores de conductividad eléctrica (CE) superiores a 1 dS.m⁻¹ (decisiemens por metro), mientras que con valores CE cercanos a 4 dS.m⁻¹ se ve afectada la supervivencia (Shannon, 1997). Se han realizado numerosos estudios en condiciones de salinidad en *festuca alta* observándose que la absorción de nutrientes y la tasa de crecimiento se ven afectadas por el estrés de salinidad (Lunt *et al.*, 1961; Bowman *et al.*, 2006) afectando la producción de biomasa, la densidad de la macollos y el número de hojas (Beard, 1985; Pitman, 1999). En este sentido, Bowman *et al.* (2006) evaluaron dos variedades de *festuca* bajo condiciones de salinidad y detectaron que afecta negativamente la absorción de nitrógeno. Tian *et al.* (2006) estudiaron plantas transgénicas AtNHX1 y control en distintas condiciones salinas (0, 50, 100, 200, 300 mM NaCl) durante un mes e informaron que la expresión del gen en la *festuca alta* transgénica confiere tolerancia a la sal. Gao y Li (2012) evaluaron dos variedades de *festuca* bajo condiciones de salinidad (25 dS.m⁻¹) detectando que distintos índices puede ser

utilizados para la búsqueda de genotipos con mayor tolerancia. Amombo *et al.* (2018) evaluaron 114 accesiones de *Festuca alta* en 200mM de NaCl detectando un fuerte efecto del tratamiento en el crecimiento de las accesiones.

Debido a lo mencionado anteriormente, este trabajo propone evaluar el crecimiento inicial de familias de medios hermanos de *festuca alta* bajo condiciones de salinidad en hidroponia.

Hipótesis

- El crecimiento inicial de 30 familias de medios hermanos de festuca alta en condiciones de salinidad contiene un componente genético heredable.

Objetivos

- Detectar diferencias en el crecimiento inicial de FMH en condiciones de salinidad.
- Discriminar familias tolerantes y susceptibles en condición de salinidad.
- Estimar la heredabilidad en sentido estricto en los diferentes ambientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. El germoplasma estudiado

A partir del resultado de estructura poblacional obtenido mediante el programa STRUCTURE (capítulo 2) se generaron tres pooles de policruzamiento, de 40 genotipos cada uno, considerando la distancia genética entre los genotipos. El criterio establecido para la formación de los pooles, fue incluir como integrantes a aquellos genotipos que tenían probabilidad de pertenencia al mismo grupo superior al 75%. Los tres pooles fueron trasplantados en el campo experimental de la ECANA (Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales de UNNOBA) en 2016. Se evaluaron caracteres asociados al rendimiento de semillas por planta (Anexo 2, Tabla 2.2 y 2.3). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron 10 genotipos de cada pool (30 genotipos totales) para dar origen a las 30 FMH (Tabla 3.1) objeto de estudio del presente capítulo.

2. Estudio del crecimiento inicial de las FMH en condiciones de salinidad

El 31 de julio de 2017 se realizó la siembra en invernáculo con control de temperatura, de las semillas de las 30 FMH. Desde la siembra hasta la finalización del ensayo de salinidad en condiciones hidropónicas transcurrieron 70 días, durante los cuales se registraron los valores de temperatura (°C) mínima, media y máxima mediante termómetros digitales marca TFA (Figura 3.1).

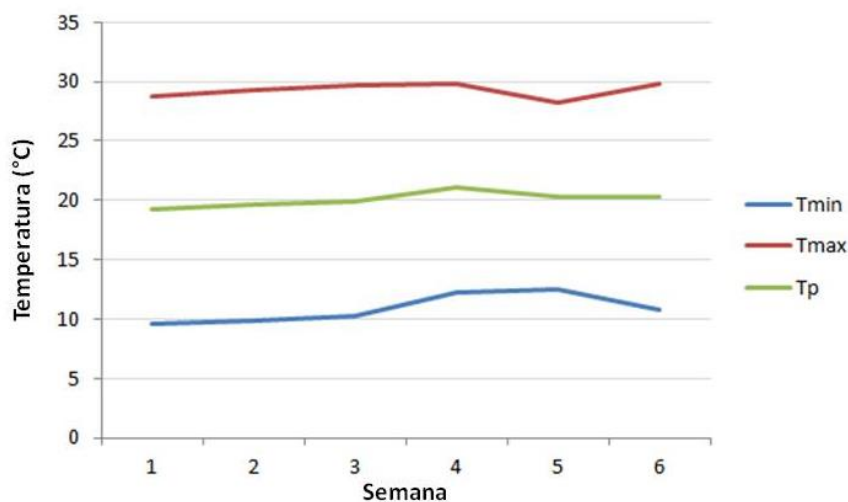


Figura 3.1. Temperatura (°C) semanal promedio (Tp), temperatura semanal máxima (Tmax), temperatura semanal mínima (Tmin) durante las seis semanas de duración del experimento en invernáculo.

Tabla 3.1. Procedencia de las 30 FMH evaluadas bajo condiciones salinas.

FMH	Pool	Población	Genotipo
1	1	9	30
2	1	9	26
3	1	5	22
4	1	8	15
5	1	5	9
6	1	7	20
7	1	5	3
8	1	6	27
9	1	6	14
10	1	9	21
11	2	2	29
12	2	3	33
13	2	2	38
14	2	3	40
15	2	2	4
16	2	3	1
17	2	2	6
18	2	3	18
19	2	3	16
20	2	4	40
21	3	1	13
22	3	1	27
23	3	1	1
24	3	1	11
25	3	1	2
26	3	1	3
27	3	1	4
28	3	1	8
29	3	1	21
30	3	1	6

Las 30 FMH se sembraron en *speedlings* conteniendo una mezcla de tierra y arena en proporciones iguales (1:1). Dentro de cada pocillo del *speedling* se colocaron tres semillas para asegurar el número de plántulas. Una vez comenzado el proceso de germinación se procedió a ralear para dejar solo una planta por pocillo. Luego de 28 días, cuando las plantas tuvieron al menos 3 hojas, fueron trasplantadas a macetas plásticas (jardineras) de 10L que contenían agua, para permitir que las raíces se limpien y que las plantas se aclimaten al sistema hidropónico. Tres días después el agua fue reemplazada con la solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). Cada maceta contuvo 2 FMH en línea; y cada FMH estuvo representada por 5 plántulas

(Figura 3.2), donde cada plántula estaba a 7cm de distancia, lo que simularía un stand denso. Luego de una semana de acondicionamiento en la solución Hoagland, se aplicó gradualmente 50 Mm NaCl/día, para evitar un shock osmótico y lograr una correcta aclimatación de las plántulas al estrés. El ensayo se dispuso bajo un diseño en bloques completos aleatorizados (DCBA) con tres repeticiones y tres tratamientos con 0 (control-C), 250mM (S1) y 500mM (S2) de NaCl, y cada familia estuvo representada por 45 genotipos. Las soluciones nutritivas contenidas en las macetas plásticas fueron oxigenadas mediante aireadores marca Precisión SR 7500 y se controló la evaporación renovando las mismas cada 7 días.



Figura 3.2. Disposición del ensayo hidropónico de crecimiento inicial de festuca alta en invernáculo.

El incremento gradual de la salinidad se inició con plántulas con tres macollos promedio y una altura promedio de 17,4 cm (Figura 3.3).



Figura 3.3. Tamaño de las plántulas al momento del inicio del incremento gradual de la salinidad.

2.1. Caracteres evaluados

Se evaluaron siete caracteres de crecimiento inicial a lo largo de todo el estudio (70 días). Los caracteres número de macollos y altura de planta fueron evaluados en dos fechas (5 y 15 días de lograda la concentración final) mientras que el resto de los caracteres se evaluaron al momento de finalizar el estudio (19 días desde la concentración final) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Caracteres de crecimiento inicial evaluados en las 30 FMH de festuca alta bajo condición de salinidad en hidroponia.

Caracter evaluado	Abreviatura	Momento de medición
Número de macollos	Nmac	5 y 15 días desde la concentración final
Altura de planta (cm)	Alt	
Peso fresco aéreo (g)	PFA	19 días desde la concentración final
Peso seco aéreo (g)	PSA	
Longitud de raíz (cm)	LR	
Peso seco de raíz (g)	PSR	
Peso seco total (g)	PST	

Número de macollos: A los 5 y 15 días de obtenidas las concentraciones salinas finales se contó el número de macollos totales por plántula.

Altura de planta (cm): A los 5 y 15 días de obtenidas las concentraciones salinas finales se midió con regla graduada la longitud total de cada plántula en cm.

Peso fresco aéreo (g): luego de 19 días de obtenidas las concentraciones salinas finales se procedió a realizar la cosecha de biomasa aérea de cada plántula de forma individual. Cada uno de los materiales cosechados fue identificado y conservado en bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad. El pesaje se realizó en balanza de precisión marca RADWAG modelo WTB200.

Peso seco aéreo (g): luego de realizar el peso fresco aéreo las muestras se colocaron en bolsas de papel tipo Kraft y se secó en estufa de aire forzado a 60°C por un período de 48 a 72 horas, hasta lograr un peso constante. Una vez secas se procedió a pesarlas en balanza de precisión marca RADWAG modelo WTB200.

Longitud de raíz (cm): una vez que se realizó la cosecha de biomasa aérea de cada plántula de forma individual, se procedió a la colecta de raíces. Las raíces se dejaron escurrir hasta el día siguiente y se midieron de forma individual mediante regla graduada.

Peso seco de raíz (g): las raíces se colocaron en bolsas de papel tipo Kraft y se secaron en estufa de aire forzado a 60°C por un período de 48 a 72 horas, hasta lograr un peso constante. Una vez secas se procedió a pesarlas en balanza de precisión marca RADWAG modelo WTB200.

Peso seco total (g): se determinó mediante la suma de PSA y PSR.

3. Análisis de la información

Los datos obtenidos durante la evaluación del crecimiento inicial bajo condición de salinidad en hidroponia fueron analizados mediante el software Infostat/P y su interfaz con R para la estimación de modelos lineales generales y mixtos. Se realizó estadística descriptiva, análisis de varianza (ANAVA), test de comparación de medias DGC y análisis exploratorios multivariados de componentes principales y de conglomerados.

3.1. Estadística descriptiva

Para todas las variables se ajustaron modelos de ANAVA bifactoriales, considerando los factores FMH y tratamiento y la interacción entre ellos (FMH*tratamiento). Se utilizó el Módulo de Modelos Lineales Generales y Mixtos del software Infostat/P (2015) en su interfaz con R.

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \delta_j + \gamma_k + (\delta\gamma)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ representa la media general, β_i es el efecto del i-ésimo bloque y se considera fijo, δ_j

es el efecto de la j-ésima FMH que se considera aleatorio, γ_k es el efecto del k-ésimo tratamiento salino que se considera aleatorio, $(\delta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre la j-ésima FMH y el k-ésimo tratamiento salino, ϵ_{ijk} es el término de error de la ijk-ésima observación debido a la variación ambiental.

Las comparaciones múltiples entre pares de medias se realizaron con el test DGC ($p \leq 0,05$) utilizando los factores tratamiento y FMH como fijos.

3.2. Estimaciones de correlaciones fenotípicas y genéticas

La asociación entre dos caracteres puede ser observado fenotípicamente y genéticamente. La correlación fenotípica fue realizada con el paquete estadístico Infostat/R mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La correlación genética fue realizada con el software META-R (Multi-Environment Trial Analysis with R) (Alvarado *et al.*, 2020). Ambas correlaciones miden la magnitud de la asociación entre dos variables y asume valores en el intervalo [-1;1] y el signo indica la dirección de la asociación.

3.3. Análisis Multivariados

Con la finalidad de relacionar las variables de crecimiento inicial por tratamiento se realizaron: Análisis de Componentes Principales y Análisis Jerarquizado (Clúster) mediante el paquete estadístico Infostat/R.

4. Estimación de parámetros genéticos

Las heredabilidades en sentido estricto (h^2) fueron calculadas para cada variable de forma conjunta y teniendo en cuenta el tratamiento salino y pool de procedencia. El cálculo se realizó según la fórmula:

$$h^2 = \frac{\sigma_f^2}{\sigma_f^2 + \frac{\sigma_e^2}{r}}$$

Donde, r son las 3 repeticiones, σ_e^2 es la variancia del error y σ_f^2 es la variancia genética.

5. Índice de tolerancia

La tolerancia a la salinidad para el peso seco aéreo (ITPSA) se estimó mediante la fórmula:

$$\text{ITPSA} = \text{PSA}_{\text{tratamiento}} / \text{promedio PSA}_{\text{control}}$$

Se realizó el cociente entre la producción de biomasa seca aérea de cada plántula (PSA tratamiento) en sal y el promedio del PSA de las plántulas en el control. Este cociente se calculó para cada FMH en condición de salinidad de 250 mM de NaCl.

Las FMH con mayor ITPSA se consideraron tolerantes y las FMH con bajos valores para el índice se consideraron susceptibles (Hannon y Bradshaw, 1968; Ashraf *et al.*, 1986; Maas, 1986; Shannon, 1997; Ali *et al.*, 2002; Argenteal *et al.*, 2009).

RESULTADOS

1. Análisis univariados

Todos los caracteres evaluados evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre FMH, entre TRAT e interacción FMH*TRAT significativa ($p < 0,05$) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Media de los caracteres Número de macollos 1, Número de macollos 2, Altura 1, Altura 2, peso fresco aereo, Peso seco aereo, Longitud de raíz, Peso seco de raíz y Peso seco total en cada una de las 30 FMH de *Festuca arundinacea* y valor p.

FMH	Nmac1	Nmac2	Alt1 (cm)	Alt2 (cm)	PFA (g)	PSA (g)	LR (cm)	PSR (g)	PST (g)
1	7,71	9,71	18,81	24,57	8,37	1,52	23,87	0,29	1,82
2	6,58	8,78	21,31	26,47	7,58	1,4	23,95	0,34	1,74
3	7,18	9,22	18,37	21,27	6,81	1,23	22,19	0,31	1,54
4	5,67	7,73	17,17	20,04	6,11	1,05	23,69	0,25	1,29
5	6,51	7,98	18,28	21,7	7,32	1,36	23,85	0,32	1,68
6	6,16	7,56	18,82	21,6	6,41	1,2	21,79	0,37	1,56
7	8,56	10,47	22,26	24,5	9,62	1,83	23,76	0,38	2,21
8	4,58	6,67	21,31	23,83	5,77	1,05	22,66	0,24	1,3
9	7,69	10,11	16,47	17,28	7,39	1,31	23,99	0,32	1,62
10	6,93	8,36	20,11	22,71	7,07	1,31	25,53	0,35	1,66
11	6,05	7,64	15,67	19,7	5,14	0,9	22,84	0,26	1,16
12	8,4	10,2	15,5	17,42	5,13	1,03	22,48	0,29	1,32
13	10,27	13,31	18,04	19,52	9,26	1,58	21,18	0,38	1,96
14	6,6	8,34	18,23	21,3	6,01	1,13	21,36	0,34	1,47
15	7,62	9,09	18,6	20,39	6,57	1,32	24,2	0,33	1,65
16	8,71	10,53	19,41	21,34	6,76	1,21	21,91	0,43	1,64
17	7,18	9,04	17,31	19,75	6,92	1,25	23,61	0,29	1,53
18	7,58	8,44	17,07	18,75	6,65	1,21	24,99	0,28	1,49
19	7,44	10,78	16,68	22,63	6,06	1,14	23,66	0,28	1,42
20	6,42	9,73	20,21	21,84	5,79	1,16	25,27	0,31	1,47
21	8,22	10,02	17,05	19,6	8,29	1,44	23,99	0,35	1,79
22	7,82	9,58	19,24	22,3	8,23	1,39	25,33	0,27	1,66
23	9,87	13,02	19,28	21,52	9,49	1,73	21,5	0,41	2,13
24	9,4	12,58	18,01	18,16	8,64	1,54	23,15	0,34	1,88
25	6,02	8,2	20,56	22,31	8,59	1,47	20,81	0,37	1,84
26	7,71	9,96	17,9	19,71	8,46	1,58	23,3	0,34	1,92
27	5,8	7,48	20,19	22,32	7,52	1,41	20,94	0,32	1,74
28	9,22	11,11	19,58	21,56	8,94	1,74	21,79	0,37	2,11
29	7,56	8,71	20,58	23,97	6,5	1,25	22,46	0,29	1,54
30	8,96	11,29	20,34	22,71	6,92	1,32	22,03	0,42	1,73
Valor p	0,0008	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001

1.1. Efecto de los tratamientos

Se observó una disminución del crecimiento con el aumento de la salinidad, pero aun así, no se observó mortandad en las distintas familias (Anexo 3 Tabla 3.1, Tabla 3.2, Tabla 3.3, Figura 3.4).



Figura 3.4. Efecto de los tratamientos Control, Salino 1 y Salino 2 a los 19 días de exposición a concentración final.

Tabla 3.4. Media y desvío estándar por pool de procedencia de las 30 FMH para los caracteres Número de macollos, Altura, Peso fresco aéreo, Peso seco aéreo, Peso seco de raíz, Peso seco total y Longitud de raíz en cada uno de los tres tratamientos salinos y momentos de evaluación.

		Pool 1	Pool 2	Pool 3	
Nmac	C	T1	23,35±4,53	22,08±4,39	23,68±5,39
		T2	33,91±6,18	31,46±6,61	33,14±7,358
	S1	T1	18,32±3,64	15,89±3,10	17,25±3,228
		T2	19,60±4,67	16,97±5,09	17,86±4,292
	S2	T1	16,49±3,18	15,00±2,68	16,88±2,838
		T2	13,64±3,70	12,68±5,64	13,12±4,143
Alt (cm)	C	T1	10,71±3,73	11,80±4,95	12,80±4,749
		T2	15,14±5,85	16,37±6,88	17,69±6,967
	S1	T1	5,45±2,01	5,93±2,38	6,39±2,334
		T2	6,58±2,49	6,61±2,78	7,83±2,88
	S1	T1	4,09±1,69	5,13±1,84	4,97±2,05
		T2	5,32±1,67	6,05±3,30	5,05±2,13
PFA (g)	C	16,74±6,29	15,19±6,28	19,28±8,43	
	S1	3,40±1,35	3,13±1,64	3,88±1,49	
	S2	1,59±1,32	0,97±0,46	1,31±0,54	
PSA (g)	C	2,79±1,05	2,53±1,10	3,17±1,38	
	S1	0,76±0,29	0,69±0,32	0,84±0,32	
	S2	0,41±0,24	0,34±0,15	0,43±0,17	
PSR (g)	C	0,59±0,21	0,59±0,23	0,63±0,26	
	S1	0,20±0,08	0,20±0,09	0,23±0,08	
	S2	0,16±0,08	0,17±0,10	0,18±0,08	
PST (g)	C	3,39±1,21	3,12±1,26	3,81±1,55	
	S1	0,96±0,35	0,90±0,37	1,08±0,38	
	S2	0,58±0,29	0,51±0,23	0,62±0,22	
LR (cm)	C	32,70±7,16	30,56±6,61	29,67±6,44	
	S1	20,44±3,51	20,81±3,85	20,49±4,80	
	S2	18,04±3,16	18,05±4,44	17,40±3,80	

Número de macollos

Al considerar la evolución del número de macollos en los pools de policruzamiento, a través del tiempo y de los tratamientos (Fig. 3.5), se observó que el número de macollos fue mayor en control, y disminuyó acorde aumentara la concentración salina. El pool 1 se destacó por producir la mayor cantidad de macollos en S1 en el tiempo 2. Por otro lado, los tres pools tuvieron similar producción de macollos en S2 (Tabla 3.4).

Al comparar la evolución del número de macollos de las familias, se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la interacción familia por tratamiento en los dos momentos de medición (Anexo 3, Tabla 3.2). En el primer recuento (N_{mac1}) en condiciones de control, la FMH 13 logró el mayor número de macollos y la FMH 8 el menor; en los tratamientos salinos S1 y S2 las FMH 24 y 8 produjeron la mayor cantidad y las FMH 11 y 4 la menor el menor respectivamente (Anexo 3, Tabla 3.2, Figura 3.7). En cuanto al segundo recuento (N_{mac2}) se observó que la FMH 13 logró el mayor promedio a través de los 3 tratamientos salinos, mientras que la FMH 8 tuvo el menor (Anexo 3, Tabla 3.2, Figura 3.8). Las FMH 8, 16, 19 y 20 se destacaron porque lograron producir mayor cantidad de macollos en la mayor concentración salina durante los dos momentos de recuento.

Altura de planta

Se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la interacción familia por tratamiento en los dos momentos de medición (Anexo 3, Tabla 3.2).

Al considerar la altura de planta de los tres pooles alcanzada a través del tiempo y de los tratamientos (Fig. 3.6), se observó que en todos los casos, la altura fue mayor en control y menor en los tratamientos salinos, en particular en la mayor concentración (S2). En el tratamiento S1 los tres pooles tuvieron comportamiento similar. En el tratamiento S2 se destacó el pool 2 ya que la altura fue similar a la observada en el tratamiento S1 (Tabla 3.4).

En cuanto a las familias, se observó que en el tratamiento control la FMH7 logró la mayor Alt1, mientras que la FMH 12 tuvo el valor mínimo. Por otro lado la FMH 2 mostró la mayor altura en la primer medición en las dos concentraciones salinas (Anexo 3, Tabla 3.2, Figura 3.9). En el tratamiento S2 el máximo valor de altura fue para la familia 20 y el mínimo para la 9 (Anexo 3, Tabla 3.2, Figura 3.10). Las FMH 19 y 20 se destacaron porque alcanzaron las mayores alturas en la mayor concentración salina durante los dos momentos de medición.

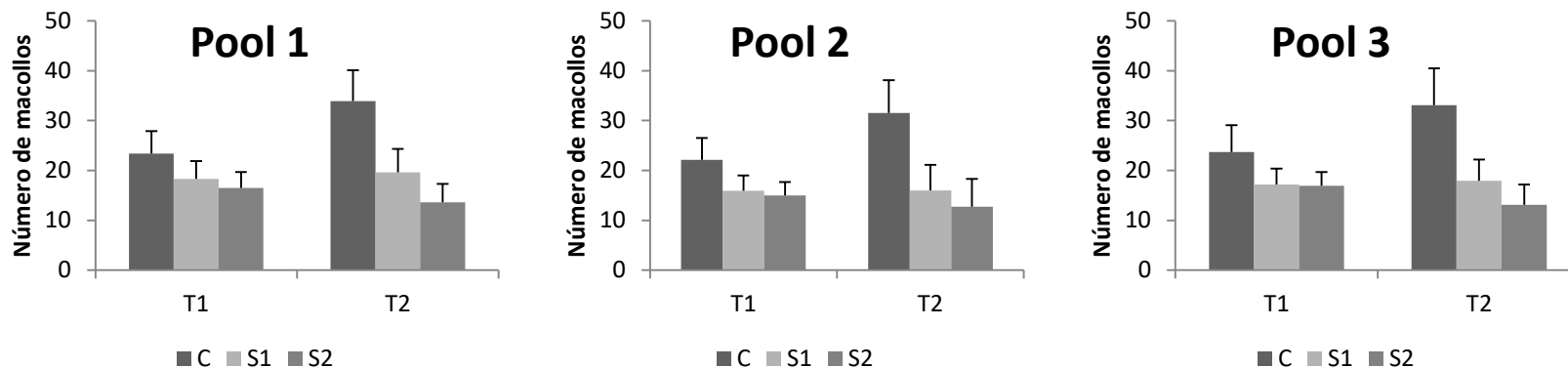


Figura 3.5. Número de macollos promedio para las 10 FMH pertenecientes a cada pool, en los tres tratamientos salinos y en dos momentos. Las barras indican medias y error estándar.

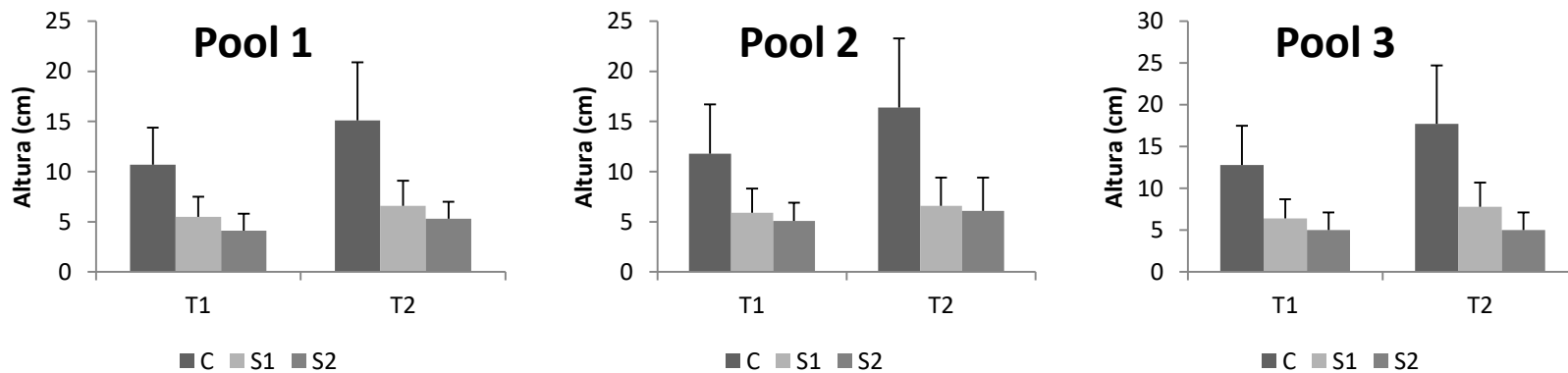


Figura 3.6. Altura de planta promedio para las 10 FMH pertenecientes a cada pool, en los tres tratamientos salinos y en dos momentos. Las barras indican medias y error estándar.

Peso fresco aéreo (PFA)

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa ($<0,0001$), lo que estaría demostrando una respuesta diferencial de las FMH a los tratamientos salinos impuestos (Anexo 3, Tabla 3.1, Figura 3.11). Al analizar el comportamiento de los pooles, se evidenció que todos mostraron una disminución del crecimiento del 80% en S1 y del 90 al 93 % en S2, respecto del tratamiento control. En el tratamiento S1 se destacaron las FMH provenientes del pool 3, mientras que en el tratamiento S2 se destacaron las FMH provenientes del pool 1 (Tabla 3.4). Al observar las familias, la FMH 9 se destacó por presentar mayor PFA en el tratamiento S2 que en el S1. De acuerdo a su origen la familia 9 deriva de la población 6 recolectada en un campo bajo ganadero ubicado en Lima, con baja frecuencia de genotipos. Adicionalmente la población 6 de evidenció elevada variabilidad intra-poblacional con valores muy elevados de número de macollos, peso seco total. En el tratamiento Control las FMH 7, 1, 13, y 23 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 12, 20 y 29 fueron las que menor PFA presentaron. En el tratamiento S1 las FMH 13, 28, 29 y 2 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 11, 4 y 3 fueron las que menor PFA presentaron.

Peso seco aéreo (PSA)

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa ($<0,0001$), lo que estaría demostrando una respuesta diferencial de las FMH a los tratamientos salinos impuestos (Anexo 3, Tabla 3.1, Figura 3.12). Al analizar el comportamiento de los pooles, se evidenció que todos mostraron una disminución del crecimiento del 73% en S1 y del 85% en S2, respecto del tratamiento control. El pool 3 marcó una leve tendencia de mayor crecimiento en los tres tratamientos (Tabla 3.4). Similarmente a lo explicado en el PFA la FMH 9 se destacó por presentar mayor PSA en el tratamiento S2 que en el S1, y le caben las mismas consideraciones anteriores. En el tratamiento Control las FMH 7, 1, 13, 23, 26 y 28 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 11, 12, y 29 fueron las que menor PSA presentaron. En el tratamiento S1 las FMH 2, 23, 28, 29 y 30 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 11, 4, 3, 8, 16, 17, 18 y 19 fueron las que menor PSA presentaron.

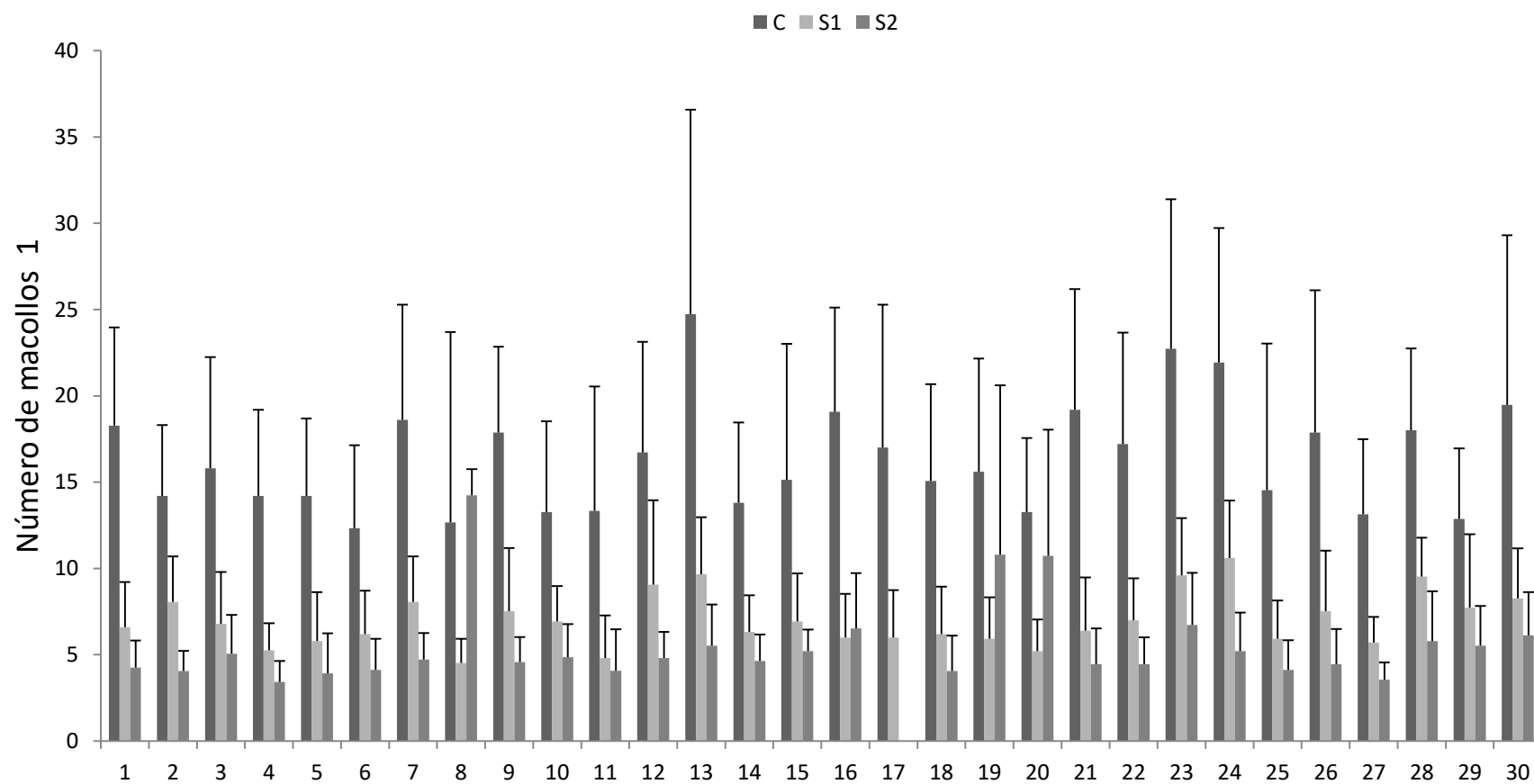


Figura 3.7. Número de macollos 1 de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

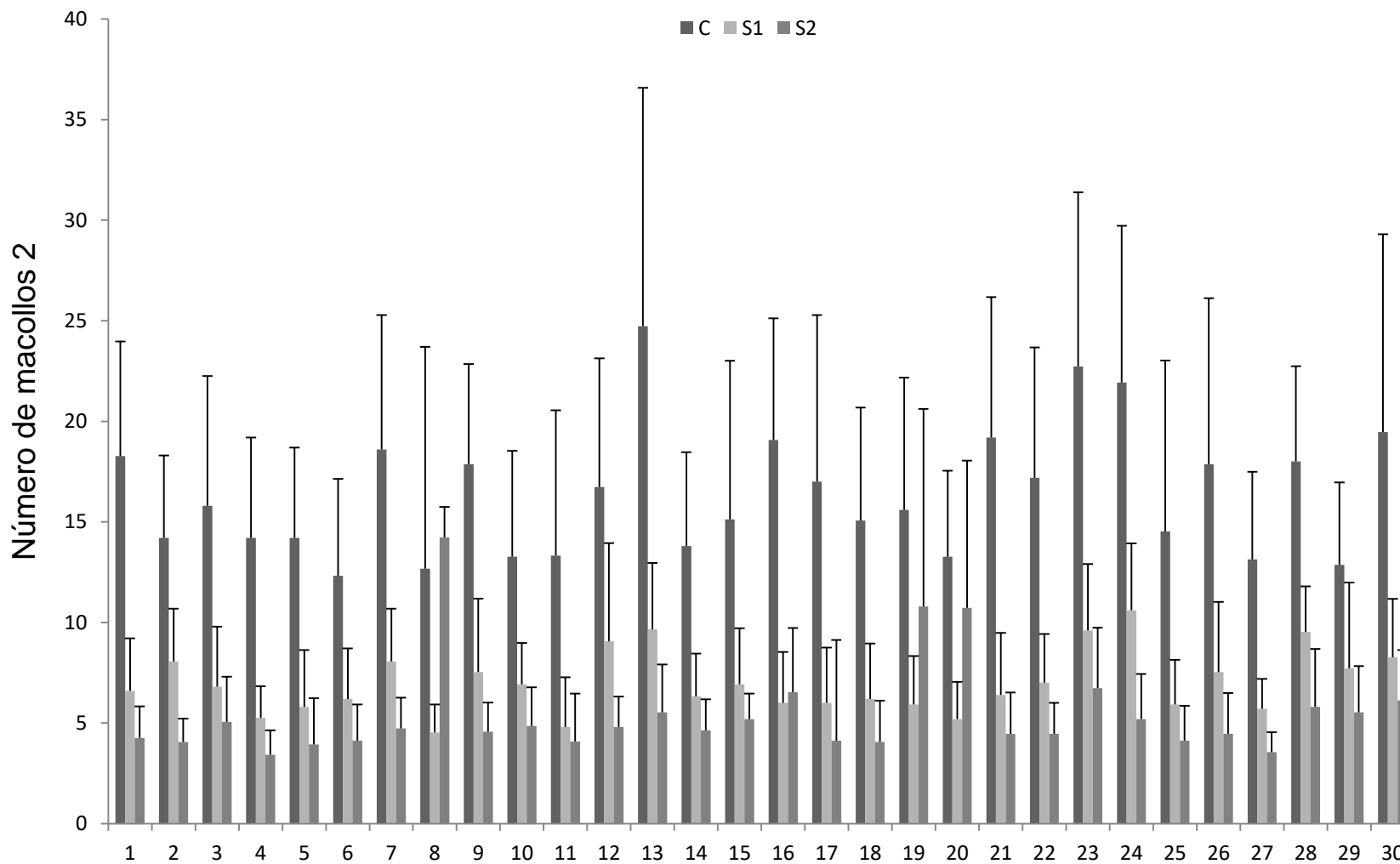


Figura 3.8. Número de macollos 2 de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

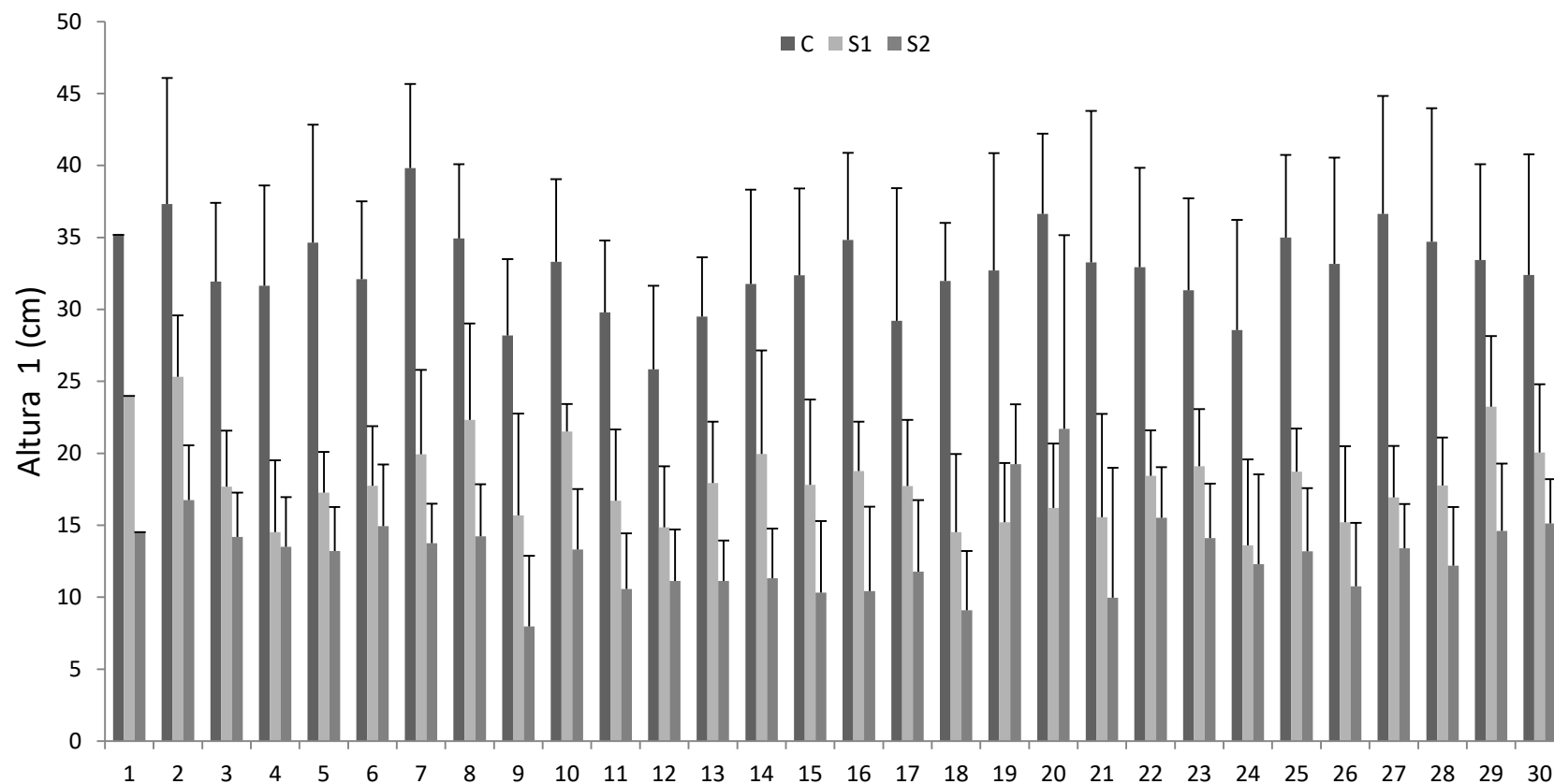


Figura 3.9. Altura de planta 1 de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

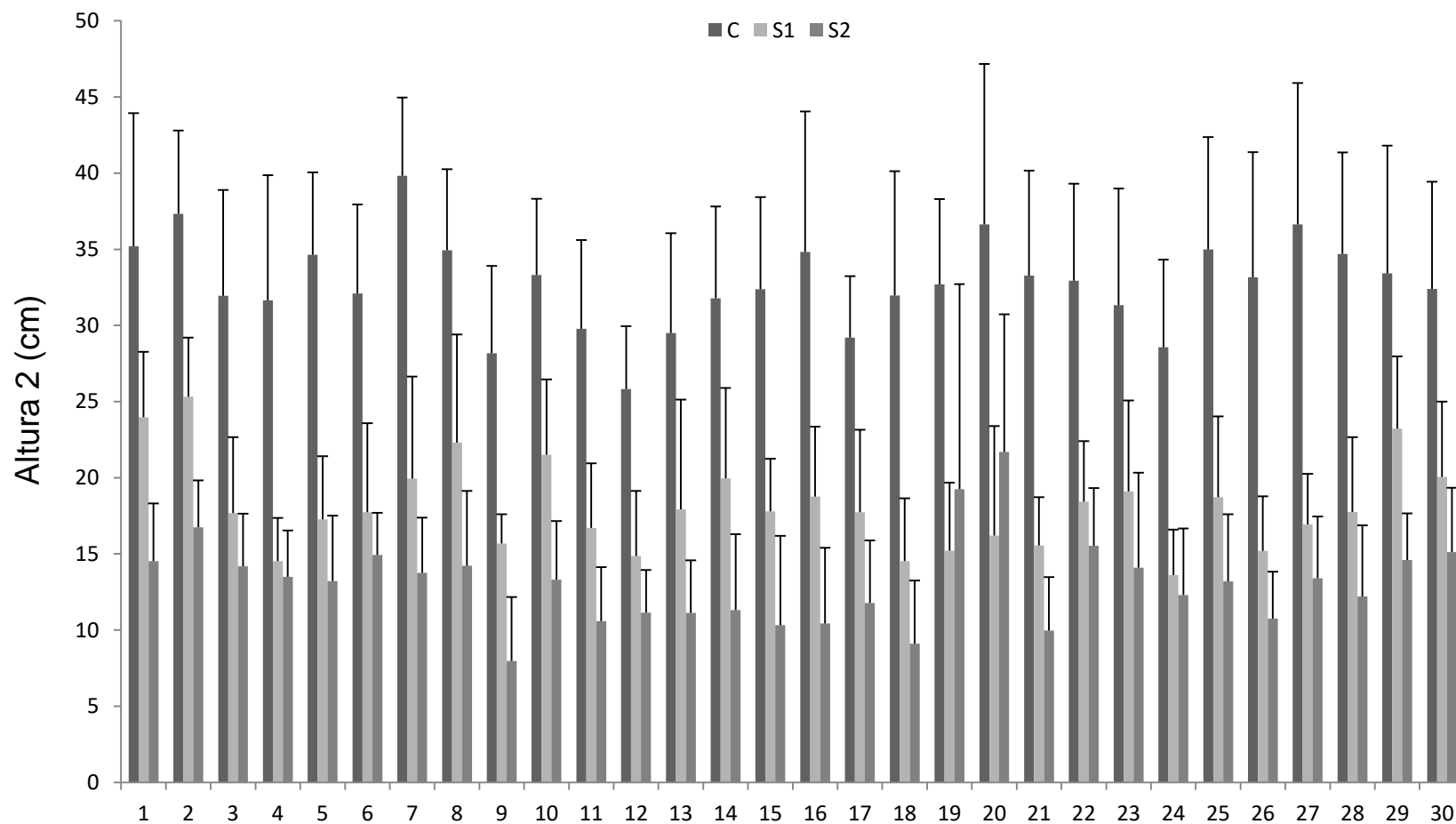


Figura 3.10. Altura de planta 2 de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

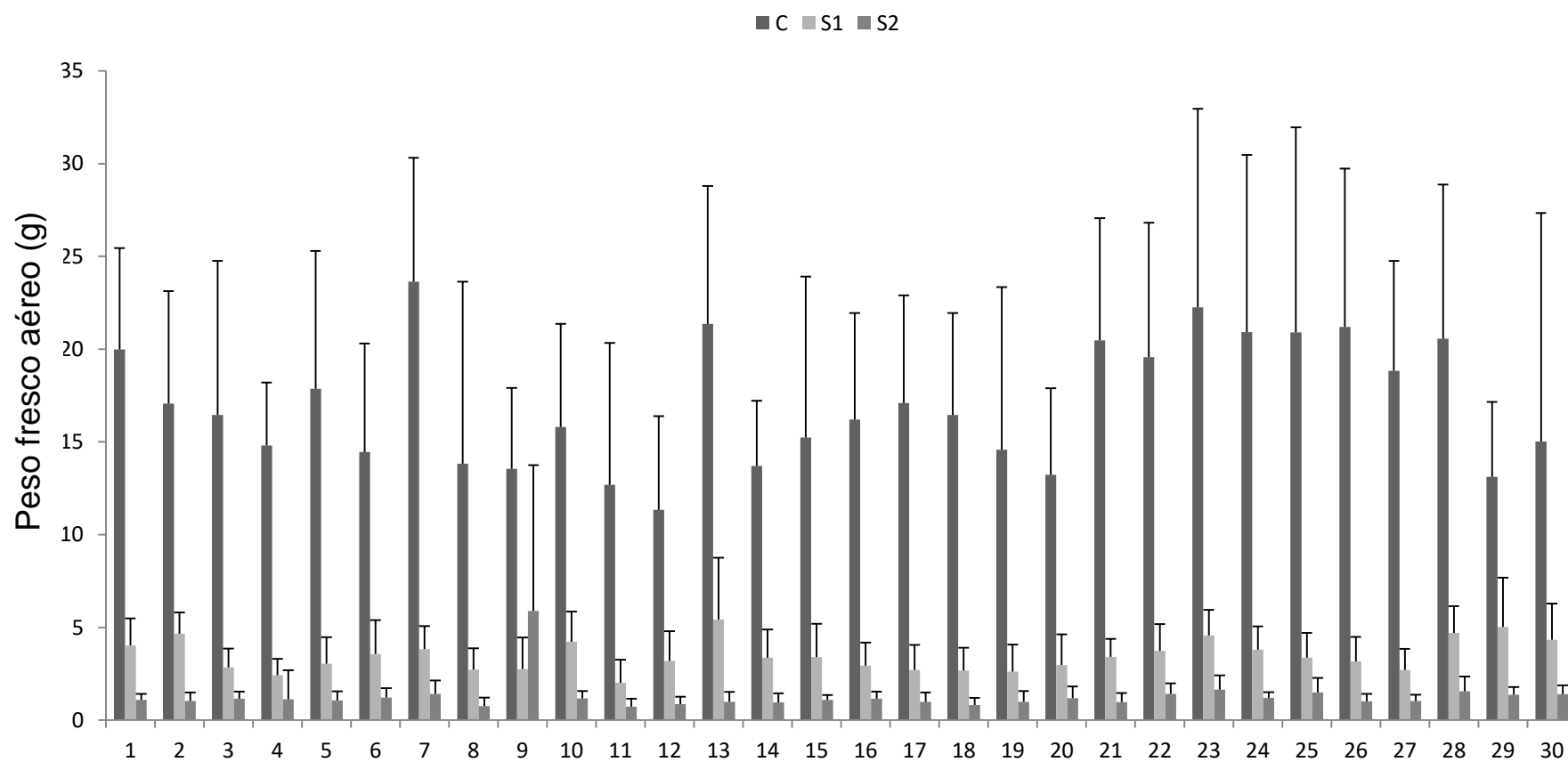


Figura 3.11. Peso fresco aéreo de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

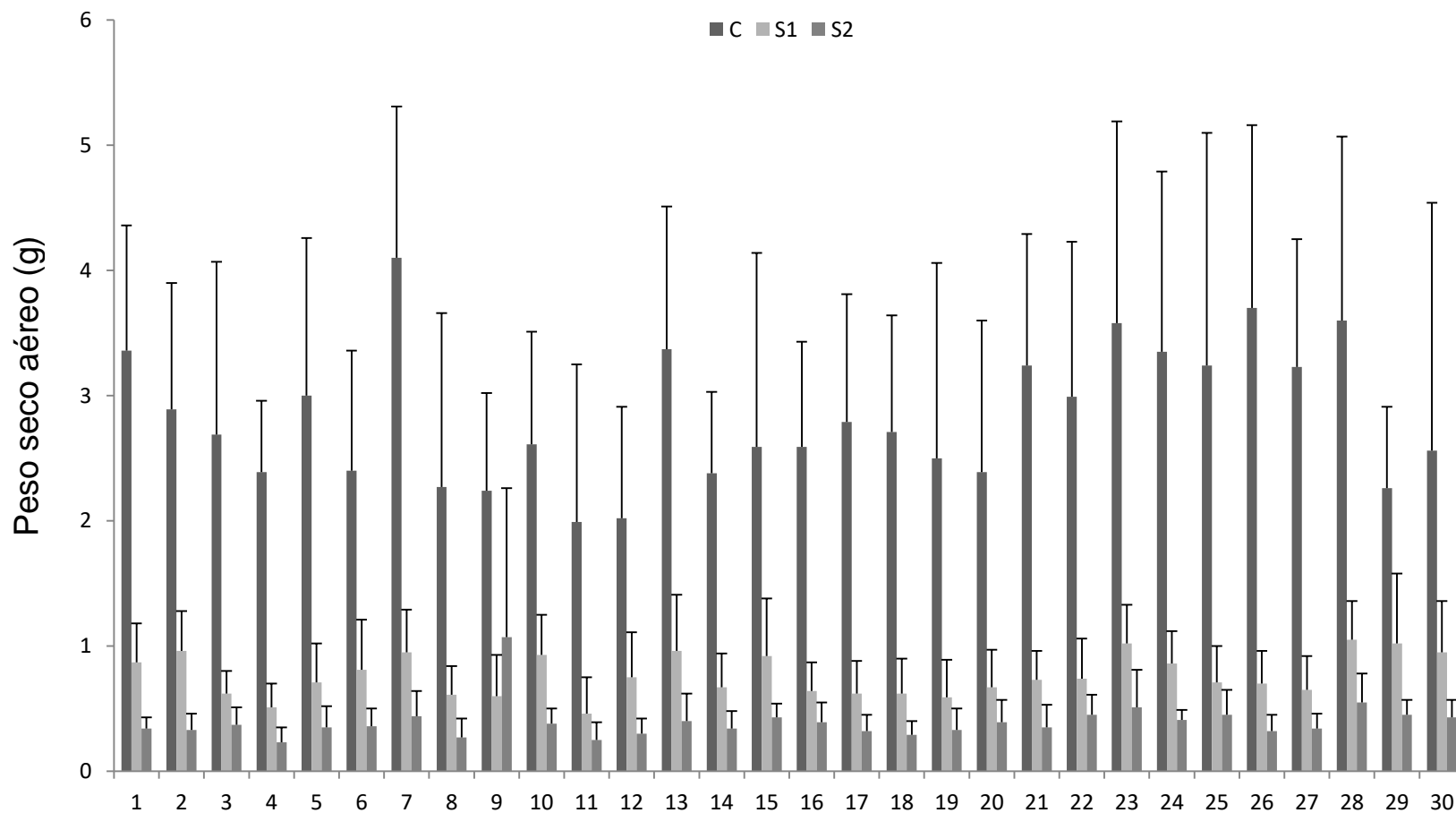


Figura 3.12. Peso seco aéreo de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

Longitud de raíz (LR)

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa ($<0,0001$) lo que estaría demostrando una respuesta diferencial de las FMH a los tratamientos salinos impuestos (Anexo 3, Tabla 3.3, Figura 3.13). La mayoría de las FMH tienen mayor LR en el tratamiento control, disminuyendo el LR en el tratamiento S1 y aun más en el tratamiento S2. Se observó que en ambos tratamientos salinos las FMH provenientes de los distintos pools tuvieron comportamientos similares (Tabla 3.4). Al observar las FMH, la FMH 15 se destacó por presentar mayor LR en el tratamiento S2 que en el S1. En el tratamiento Control las FMH 18, 1, 4, 5, 20 y 22 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 12, 14, 16 y 25 fueron las que menor LR presentaron. En el tratamiento S1 las FMH 2, 17, 12 y 8 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 25, 23, 27, 11 y 5 fueron las que menor LR presentaron. En el tratamiento S2 las FMH 8 y 10 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 2, 3, 14, 26, 27 y 30 fueron las que menor LR presentaron.

Peso seco de raíz (PSR)

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa ($0,0001$), lo que estaría demostrando una respuesta diferencial de las FMH a los tratamientos salinos impuestos (Anexo 3, Tabla 3.1, Figura 3.14). El comportamiento de los pools, evidenció una disminución del crecimiento del 73 al 71% en S2 y del 66 al 63% S1, respecto del tratamiento control (Tabla 3.4), indicando que la afectación del crecimiento de la raíz por salinidad fue menor al de la biomasa aérea.

Al observar las FMH en los tratamientos S1 y S2 se destacaron aquellas provenientes del pool 3 (Tabla 3.4); las FMH 9 y FMH 6 se mostraron igual o mayor crecimiento en S2 que en S1. La FMH 9 repitió la tendencia de mayor crecimiento en la mayor concentración salina; y en el caso de la FMH 6, deriva de la población 7 colectada en un campo agrícola de la localidad de Pigue, con mediana variabilidad intra-poblacional y con baja producción de forraje. En el tratamiento Control las FMH 16, 7 y 30 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 29, 4, 8, 11 y 12 fueron las que menor PSR presentaron. En el tratamiento S1 las FMH 2, 6, 12 y 14 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 4, 11, 8 y 22 fueron las que menor PSR presentaron.

Peso seco total (PST)

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa (0,0201), lo que estaría demostrando una respuesta diferencial de las FMH a los tratamientos salinos impuestos (Anexo 3, Tabla 3.1, Figura 3.15). La mayoría de las FMH tienen mayor PST en el tratamiento control, disminuyendo el PST en el tratamiento S1 y aún más en el tratamiento S2. En ambos tratamientos salinos se destacaron las FMH provenientes del pool 3 (Tabla 3.4). Similarmente a lo observado en los pesos fresco y seco de parte aérea y de raíz, la FMH 9 se destacó por presentar mayor PST en el tratamiento S2 que en el S1. Si bien fue una familia con baja altura de planta, logró una buena producción de macollos, los que pudieron haber compensado con su tamaño y aportado al peso total registrado. En este sentido, es importante resaltar que en las gramíneas los macollos constituyen las unidades morfológicas y funcionales (fitómeros) fundamentales para la perdurabilidad de la pastura, a partir de los cuales se originan nuevas hojas, macollos y raíces; y son altamente modificables por el ambiente (Langer, 1979). Adicionalmente, los caracteres altura de planta y peso seco total no mostraron correlación significativa en S2 (Tabla 3.7).

En el tratamiento Control las FMH 7, 13, 1, 22, 26 y 28 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 11, 12, 29 y 4 fueron las que menor PST presentaron. En el tratamiento S1 las FMH 2, 23, 28, 29 y 30 fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 11, 4, 3 y 9 fueron las que menor PST presentaron.

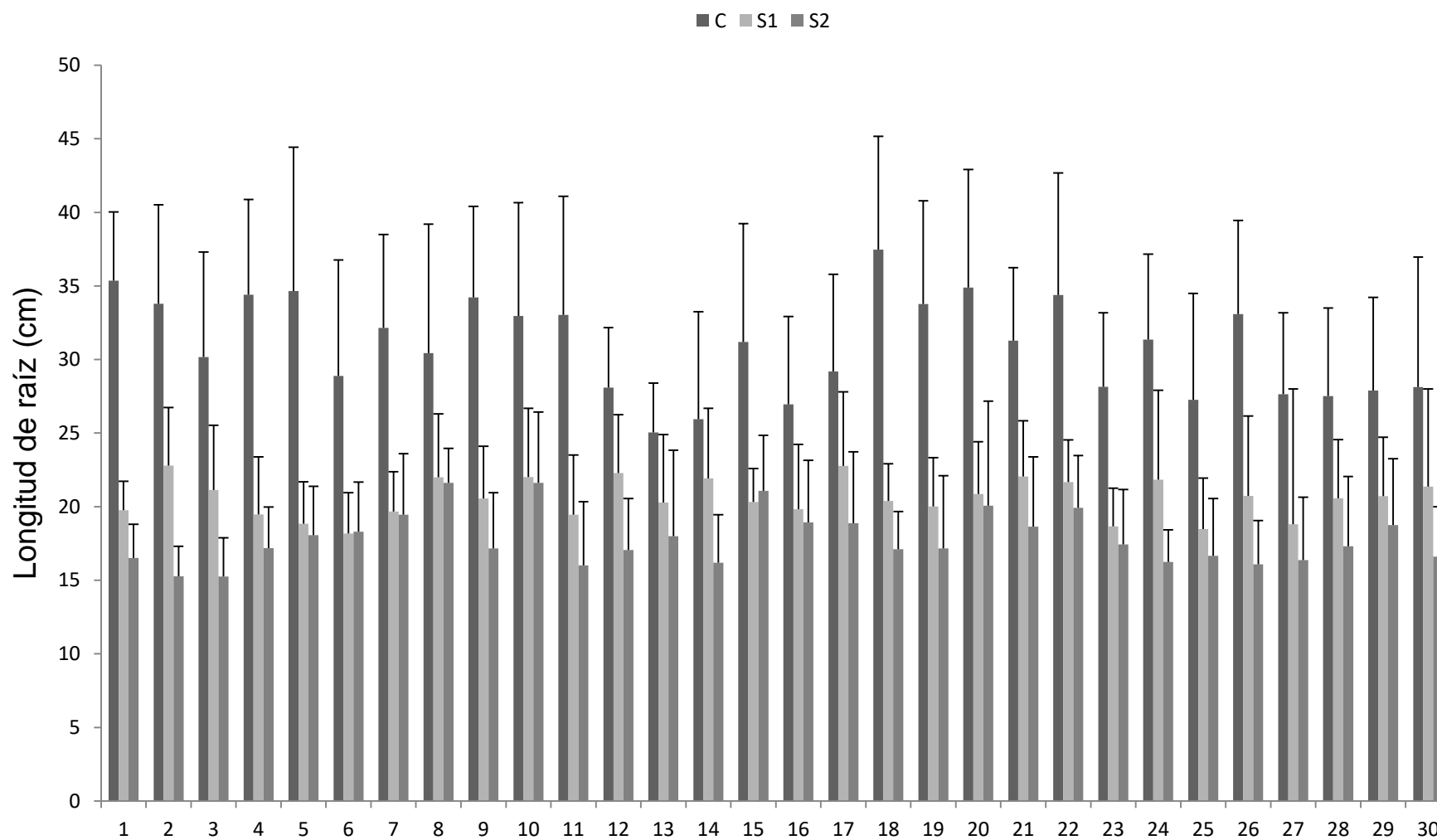


Figura 3.13. Longitud de raíz de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

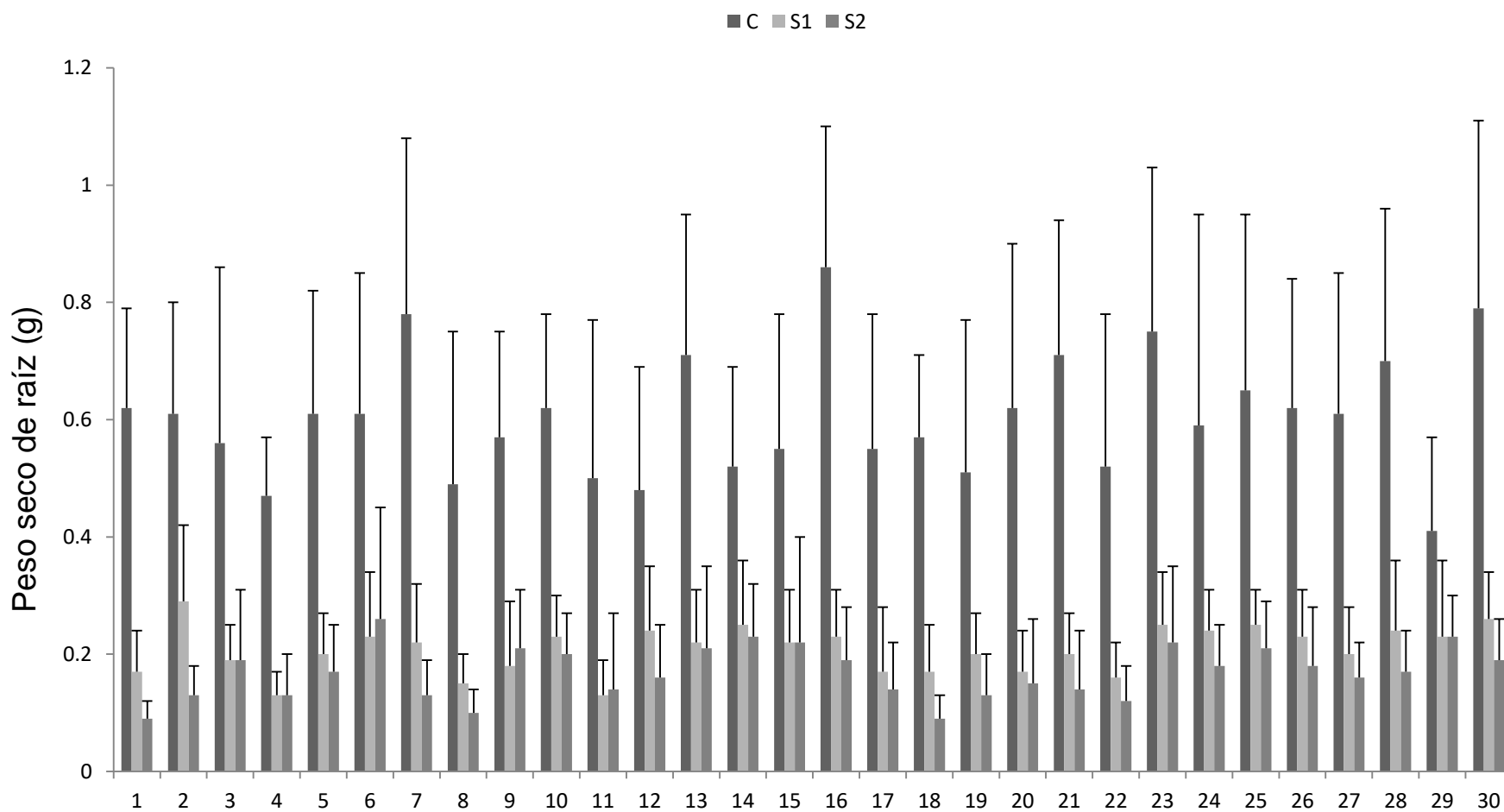


Figura 3.14. Peso seco de raíz de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

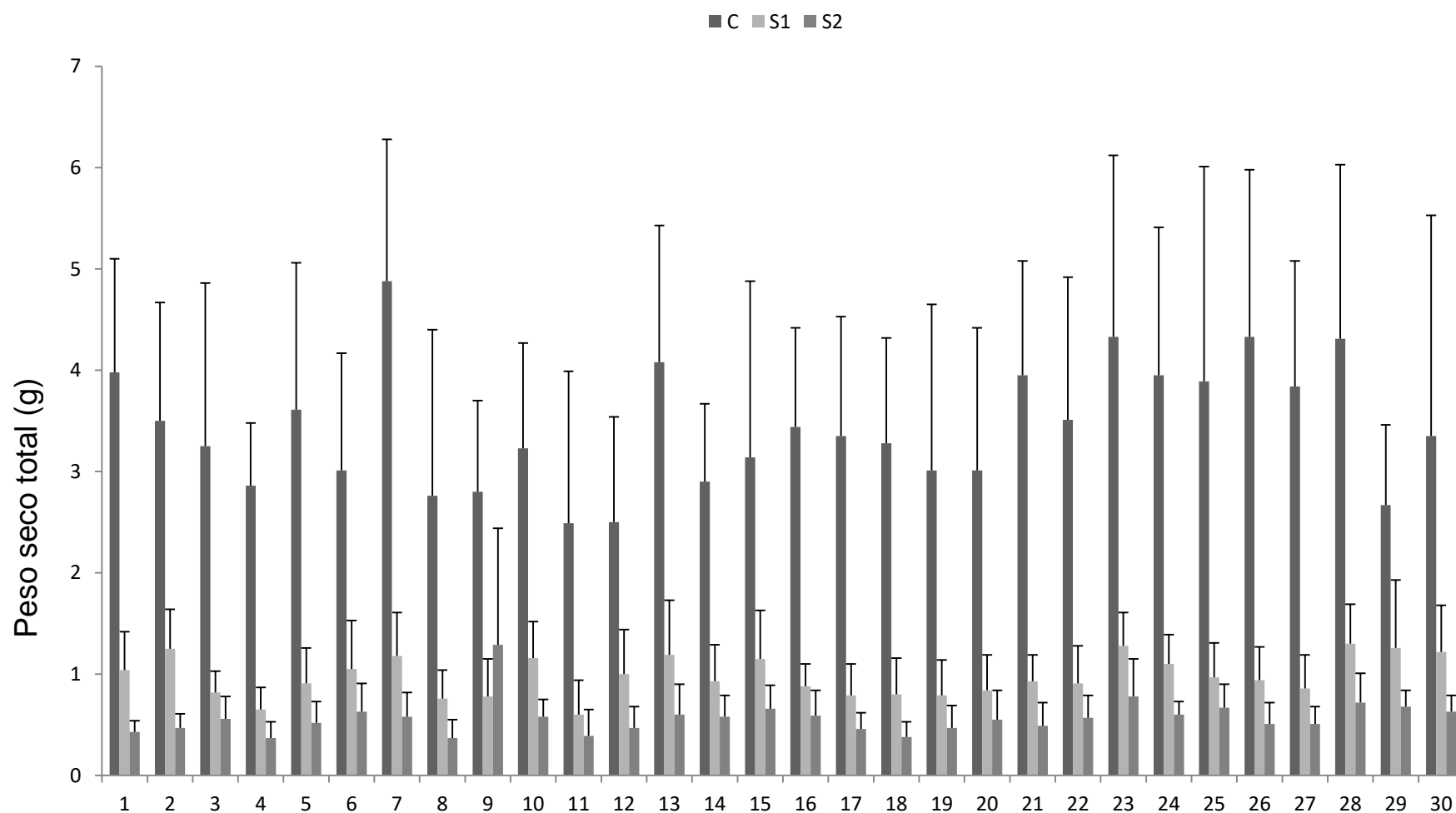


Figura 3.15. Peso seco total de las 30 FMH evaluadas en Control, 250mM y 500mM de NaCl. Las barras indican medias y desvío estándar.

1.2. Correlaciones Fenotípicas

En el tratamiento Control se detectó correlación significativa para la mayoría de las variables (Tabla 3.5) excepto para LR y Alt. Los coeficientes de correlación oscilaron entre -0,18 (Alt-Nmac) y 0,99 (PSA-PST).

Tabla 3.5. Coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia para siete caracteres evaluados en el tratamiento Control. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación entre los caracteres.

	Nmac	Alt	PF	PSA	LR	PSR	PST
Nmac	1	***	***	***	**	***	***
Alt	-0,18	1	***	***	NS	***	***
PF	0,61	0,25	1	***	**	***	***
PSA	0,58	0,27	0,96	1	**	***	***
LR	0,13	0,03	0,15	0,14	1	**	**
PSR	0,55	0,27	0,65	0,64	0,15	1	***
PST	0,61	0,28	0,96	0,99	0,15	0,73	1

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

En el tratamiento S1 se detectó correlación significativa para la mayoría de los caracteres (Tabla 3.6) excepto para Alt y Nmac. Los coeficientes de correlación oscilaron entre 0,13 (Alt-LR) y 0,98 (PSA-PST).

Tabla 3.6. Coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia para los siete caracteres evaluados en el tratamiento S1. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación entre los caracteres.

	Nmac	Alt	PF	PSA	LR	PSR	PST
Nmac	1	NS	***	***	***	***	***
Alt	0,01	1	***	***	*	***	***
PF	0,58	0,41	1	***	***	***	***
PSA	0,58	0,37	0,92	1,	***	***	***
LR	0,16	0,13	0,22	0,21	1	**	***
PSR	0,50	0,25	0,53	0,54	0,14	1	***
PST	0,61	0,38	0,91	0,98	0,21	0,69	1

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

En el tratamiento S2 se detectó correlación significativa para Alt-Nmac, PSA-Nmac, PSA-PF, LR-Nmac, LR-PSA, PSR-Nmac, PSR-PF, PSR-PSA, PST-Nmac, PST-PF, PST-PSA, PST-LR y PST-PSR (Tabla 3.7). Los coeficientes de correlación oscilaron entre 0,10 (PF-PSR y LR-PST) y 0,95 (LR-PST).

Tabla 3.7. Coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia para los siete caracteres evaluados en el tratamiento S2. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación entre los caracteres.

	Nmac	Alt	PF	PSA	LR	PSR	PST
Nmac	1	***	NS	*	***	*	**
Alt	0,40	1	NS	NS	NS	NS	NS
PF	0,05	-0,08	1	***	NS	*	***
PSA	0,13	-0,07	0,92	1	*	***	***
LR	0,20	0,05	0,06	0,11	1	NS	*
PSR	0,11	-0,04	0,10	0,21	0,03	1	***
PST	0,15	-0,07	0,85	0,95	0,10	0,49	1

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

1.3. Correlaciones Genéticas

En el tratamiento Control se detectó correlación significativa para la mayoría de las variables (Tabla 3.8) excepto para LR con Alt, PFA, PSA y PST; y Alt con Nmac. Los coeficientes de correlación significativos oscilaron entre -0,52 (LR-PSR) y 0,99 (PSA-PST).

Tabla 3.8. Coeficiente de correlación genética y nivel de significancia para los siete caracteres evaluados en el tratamiento Control. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación genética entre los caracteres.

	Nmac	Alt	PFA	PSA	LR	PSR	PST
Nmac		NS	***	**	*	***	***
Alt	-0,34		*	**	NS	*	**
PFA	0,61	0,38		***	NS	**	***
PSA	0,55	0,50	0,98		NS	**	***
LR	-0,46	0,23	-0,20	-0,18		**	NS
PSR	0,61	0,42	0,54	0,55	-0,52		***
PST	0,60	0,52	0,97	0,99	-0,25	0,66	

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

En el tratamiento S1 se detectó correlación significativa para el 62% de los pares de variables (Tabla 3.9) las mayores correlaciones se observaron para los pares PSA-PST, PFA-PSA, PFA-PST, PSR-PST. Los coeficientes de correlación significativos oscilaron entre 0,48 (PSA-LR) y 0,99 (PSA-PST).

Tabla 3.9. Coeficiente de correlación genética y nivel de significancia para los siete caracteres evaluados en el tratamiento Salino 1. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación genética entre los caracteres.

	Nmac	Alt	PFA	PSA	LR	PSR	PST
Nmac		NS	***	***	NS	***	***
Alt	-0,02		**	**	NS	NS	*
PFA	0,77	0,55		***	NS	***	***
PSA	0,79	0,50	0,94		NS	***	***
LR	0,22	0,27	0,05	-0,08		NS	NS
PSR	0,67	0,30	0,67	0,73	0,02		***
PST	0,80	0,48	0,93	0,99	-0,07	0,82	

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

En el tratamiento S2 se detectó correlación significativa solo para seis pares de variables Alt-Nmac, PSA-PFA, PSA-PSR, PST-PFA, PST-PSA y PST-PSR (Tabla 3.10). Los coeficientes de correlación significativos oscilaron entre 0,47 (PSA-PSR) y 0,98 (PSA-PST).

Tabla 3.10. Coeficiente de correlación genética y nivel de significancia para los siete caracteres evaluados en el tratamiento Salino 2. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación genética entre los caracteres.

	Nmac	Alt	PFA	PSA	LR	PSR	PST
Nmac		***	NS	NS	NS	NS	NS
Alt	0,69		NS	NS	NS	NS	NS
PFA	0,05	-0,28		***	NS	NS	***
PSA	0,15	-0,28	0,95		NS	*	***
LR	0,29	0,03	-0,01	0,14		NS	NS
PSR	0,08	-0,23	0,34	0,47	0,24		***
PST	0,14	-0,31	0,91	0,98	0,19	0,67	

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

2. Análisis multivariados

2.1. Análisis de componentes principales

En el tratamiento Control las dos primeras componentes explicaron el 75,3% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 51,6%, mientras que la CP2 explicó el 23,7%. Las variables con mayor aporte en la CP1 fueron PF y PSA, en la CP2 las variables con mayor peso fueron Alt y LR. A través de la CP1 se puede determinar que las FMH 7, 23, 13, 28, 26 y 21 fueron las de mayor crecimiento, mientras que las FMH 12, 11 y 29 fueron las de menor crecimiento (Figura 3.16). En el tratamiento S1 las dos primeras componentes explicaron el 73,9% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 56,5%, mientras que la CP2 explicó el 17,4%. Las variables con mayor aporte en la CP1 fueron PF y PSA, en la CP2 las variables con mayor peso fueron Alt y LR. A través de la CP1 se puede determinar que las FMH 2, 29, 30, 28, 13 y 23 fueron las de mayor crecimiento, mientras que las FMH 11 y 4 fueron las de menor crecimiento (Figura 3.17). En el tratamiento S2 las dos primeras componentes explicaron el 65,4% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 37,7%, mientras que la CP2 explicó el 27,7%. Las variables con mayor aporte en la CP1 fueron PF y PSA, en la CP2 las variables con mayor peso fueron Nmac y Alt. A través de la CP1 se puede determinar que la FMH 9 fue la de mayor crecimiento, mientras que el resto de las FMH tuvieron un crecimiento similar situándose cerca del origen (Figura 3.18).

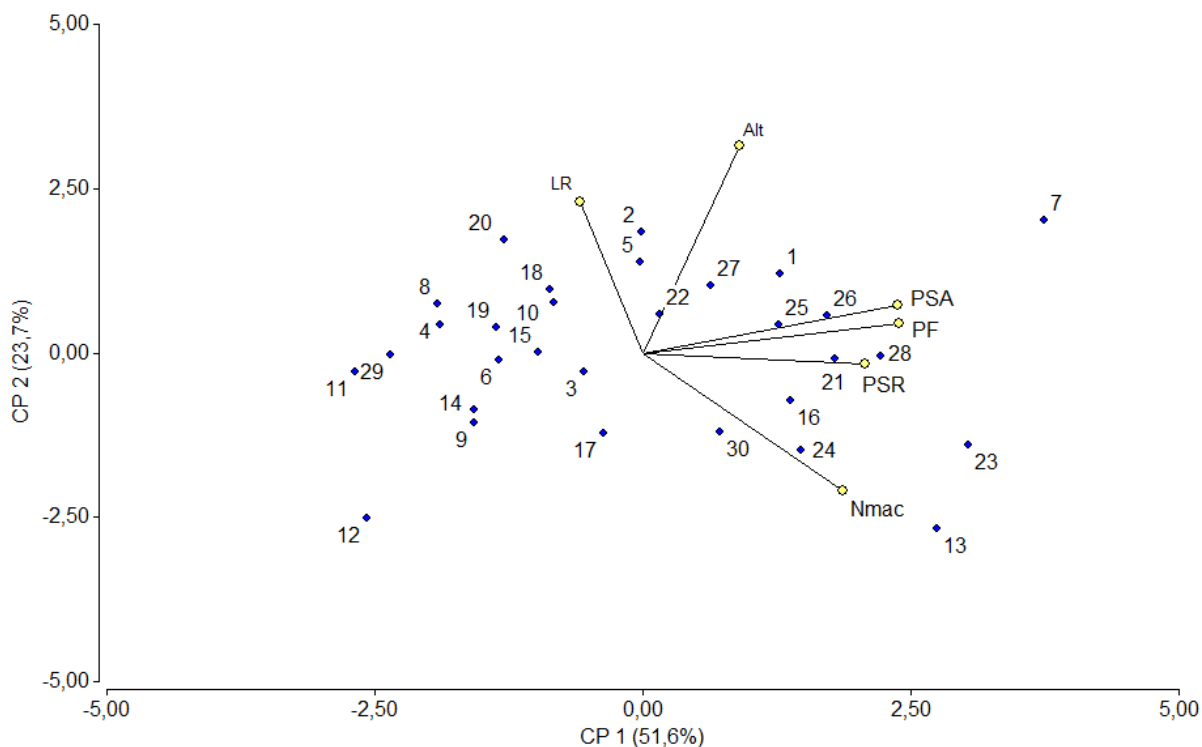


Figura 3.16. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Control.

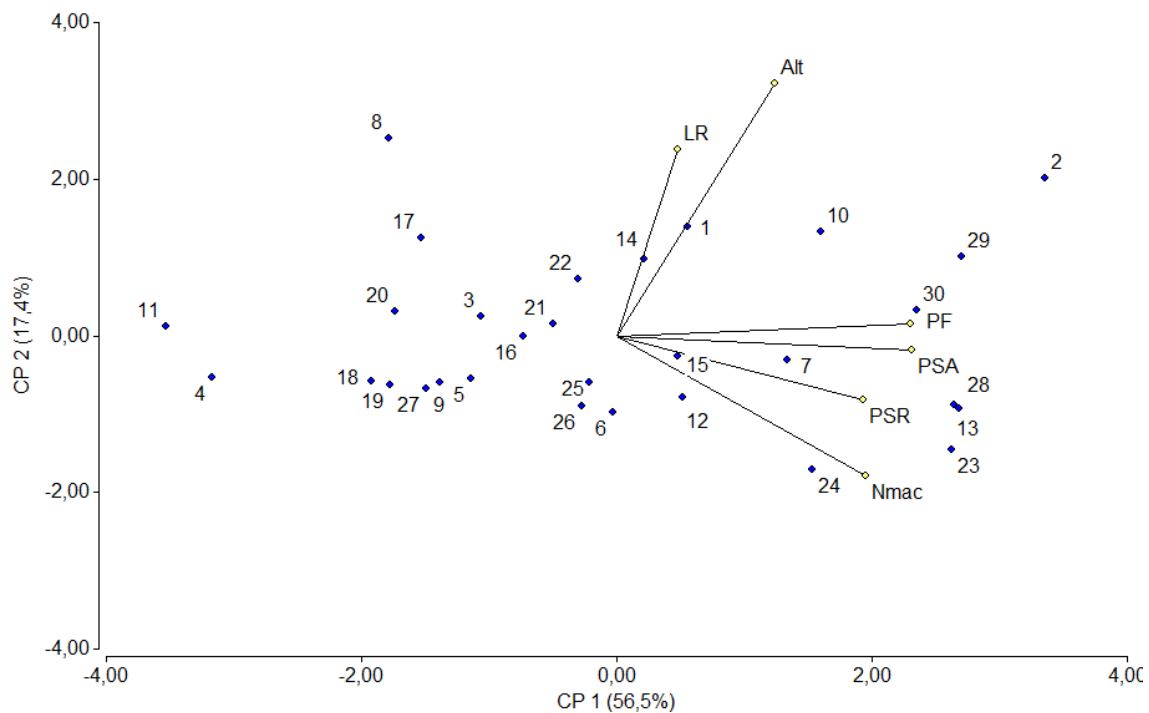


Figura 3.17. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Salino 1.

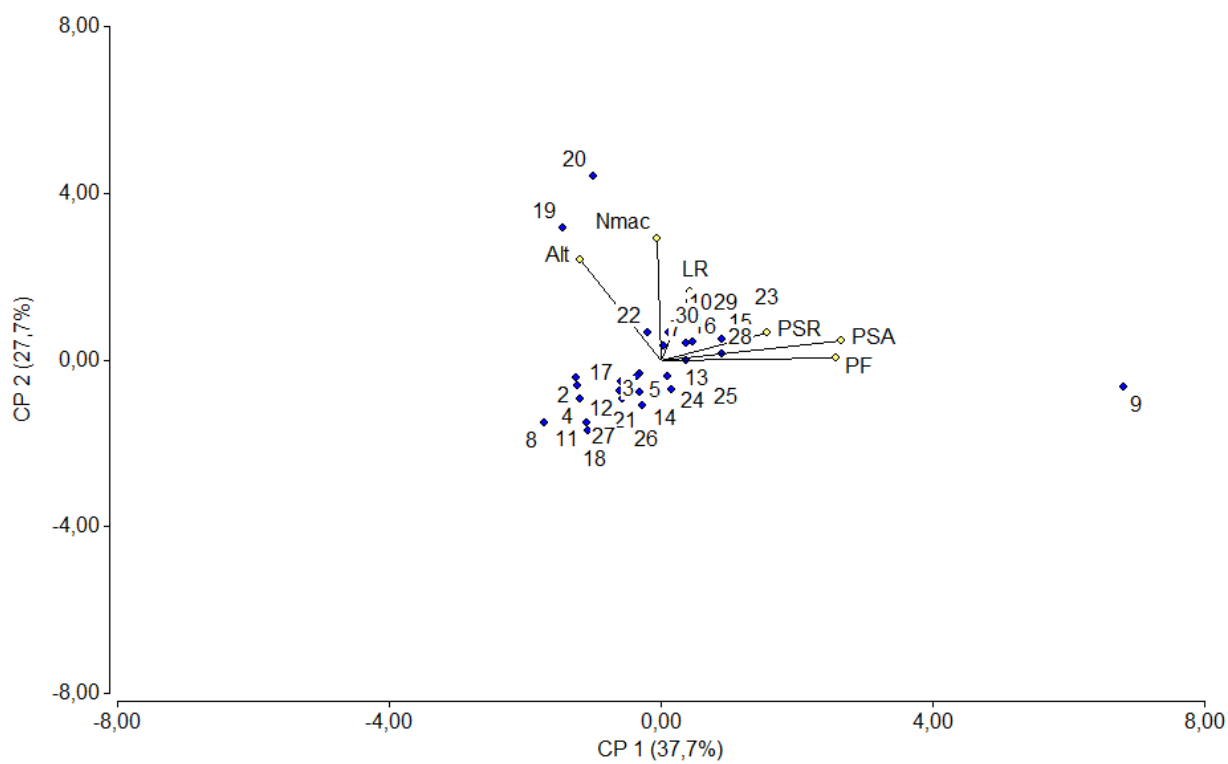


Figura 3.18. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Salino 2.

Al considerar los tres tratamientos en forma conjunta se puede observar que las dos primeras componentes explicaron el 96,1% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 92,7%, mientras que la CP2 explicó el 3,4%. Las variables con mayor aporte en la CP1 fueron PF y PSA, en la CP2 las variables con mayor peso fueron LR y Nmac. A través de la CP1 se pueden diferenciar tres grandes grupos, correspondientes cada uno a los tratamientos control (azul), S1 (amarillo) y S2 (verde). Los puntos (FMH) del tratamiento Control contienen una mayor dispersión, evidenciando así una mayor variabilidad, los puntos del tratamiento S1 se encuentran más cercanos unos de otros, y más aun los correspondientes al tratamiento S2 (Figura 3.19). Esto estaría demostrando que a mayor concentración salina, es menor la variabilidad expresada por las FMH.

Al considerar solo los tratamientos salinos se puede observar que las dos primeras componentes explicaron el 76,5% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 64,2%, mientras que la CP2 explicó el 12,3%. Las variables con mayor aporte en la CP1 fueron PSA y PF, en la CP2 las variables con mayor peso fueron PSR y Alt. A través de la CP1 se pueden diferenciar dos grandes grupos, correspondientes cada uno a los tratamientos S1 (azul) y S2 (amarillo), aun así se observan puntos de los distintos tratamientos en forma superpuesta, evidenciando así, un comportamiento diferencial según el tratamiento salino impuesto (Figura 3.20). Por analogía con lo observado en cada tratamiento, se repiten los comportamientos de las FMH con mayor y menor crecimiento en S1 y S2.

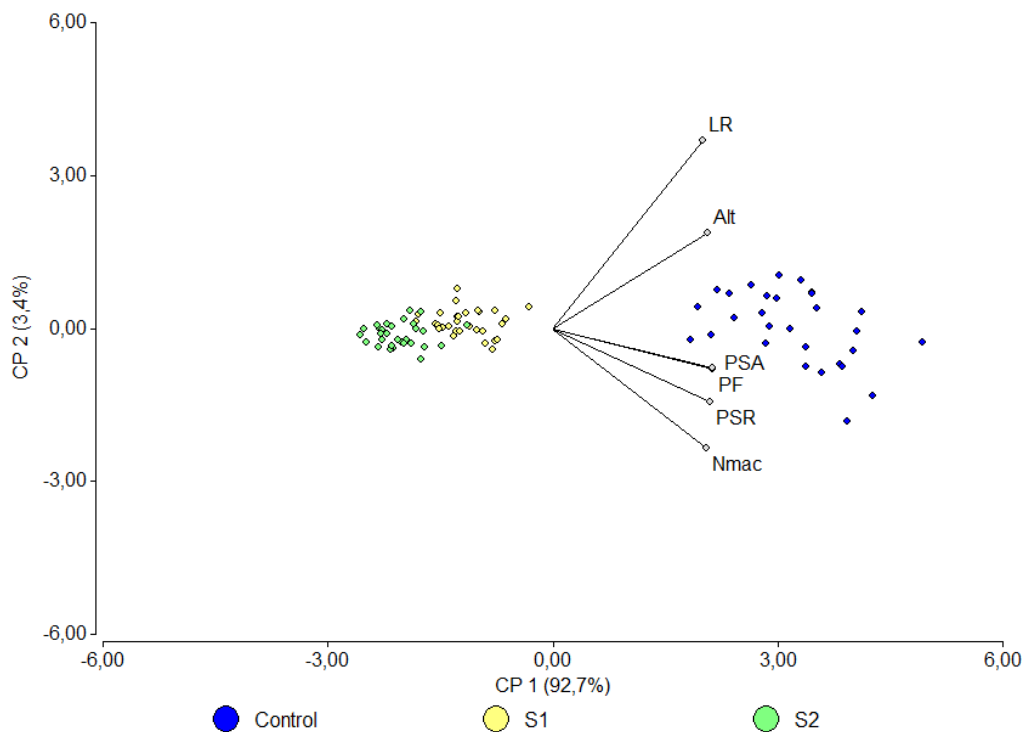


Figura 3.19. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en los tres tratamientos (Control – Salino 1 - Salino 2).

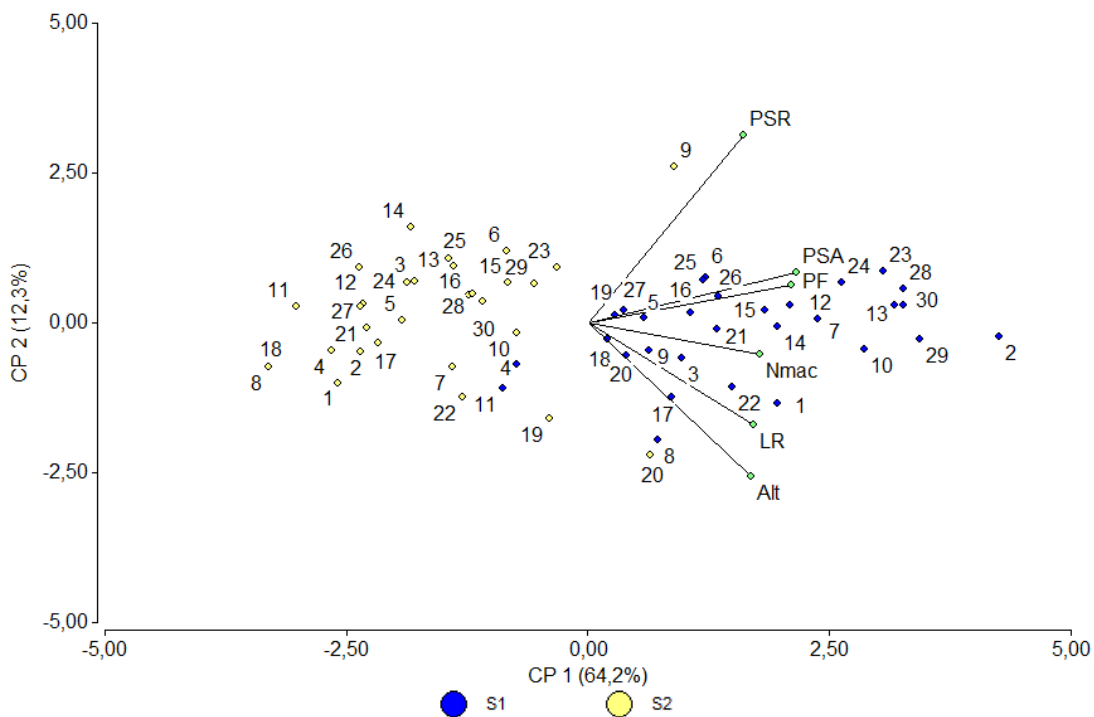


Figura 3.20. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en los tratamientos Salino 1 y Salino 2.

2.2. Análisis Jerarquizado (Clúster)

En el tratamiento Control se identificaron cinco grupos de FMH a una distancia del 75% (Figura 3.21) con una correlación cofenética de 0,664. El grupo 1 estuvo constituido por las FMH 1 (pool 1) y 26-22-21-28-25-27 (pool 3) que en el ACP se ubicaron en el cuadrante superior derecho y que por lo tanto tuvieron crecimiento elevado. El grupo 2 estuvo integrado por las FMH 13 (pool 2) y 23-24 (pool 3), y estuvieron asociadas a un elevado número de macollos. El grupo 3 estuvo conformado por las FMH 16 (pool 2) y 30 (pool 3), que presentaron un crecimiento intermedio. La FMH 7 (pool 1) fue la de mayor crecimiento separándose del resto. Las demás FMH se situaron del lado izquierdo del ACP indicando un menor crecimiento.

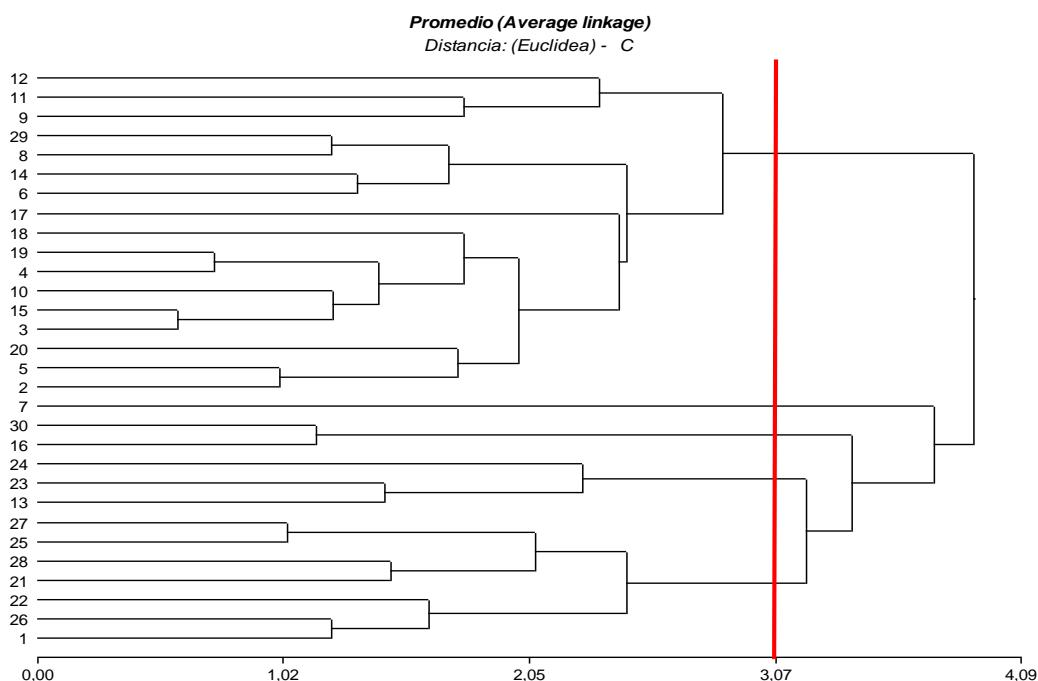


Figura 3.21. Dendrograma obtenido mediante Análisis de Conglomerados con los seis caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Control.

En el tratamiento S1 se identificaron cinco grupos de FMH a una distancia del 75% (Figura 3.22) con una correlación cofenética de 0,698. El grupo 1 estuvo constituido por las FMH 1-7-10 (pool 1), 13-15 (pool 2) y 30-29-28-23 (pool 3), que en el ACP se ubicaron en el sector central derecho y que por lo tanto tuvieron crecimiento elevado. La FMH 2 (pool 1) fue la de mayor crecimiento separándose del resto. Las FMH 12 (pool 2) y 24 (pool 3) formaron el tercer grupo y se caracterizaron por presentar elevado número de macollos. Las demás FMH se situaron del lado izquierdo del ACP indicando un menor crecimiento, dentro de estas se separó la FMH 8 (pool 1).

En el tratamiento S2 se identificaron dos grupos de FMH a una distancia del 75% (Figura 3.23) con una correlación cofenética de 0,925. El grupo 1 estuvo constituido por la FMH 9 (pool 1) ya que fue la que presentó mayor crecimiento. El resto de las FMH se ubicaron cercanas al origen ya que tuvieron un crecimiento intermedio. Las FMH 19-20 (pool 2) formaron un sub grupo dentro del grupo 2, ya que presentaron mayor cantidad de macollos y crecimiento. El resto de las FMH se ubicaron en un gran grupo ya que tuvieron un crecimiento intermedio a bajo y fue coincidente con el ACP correspondiente.

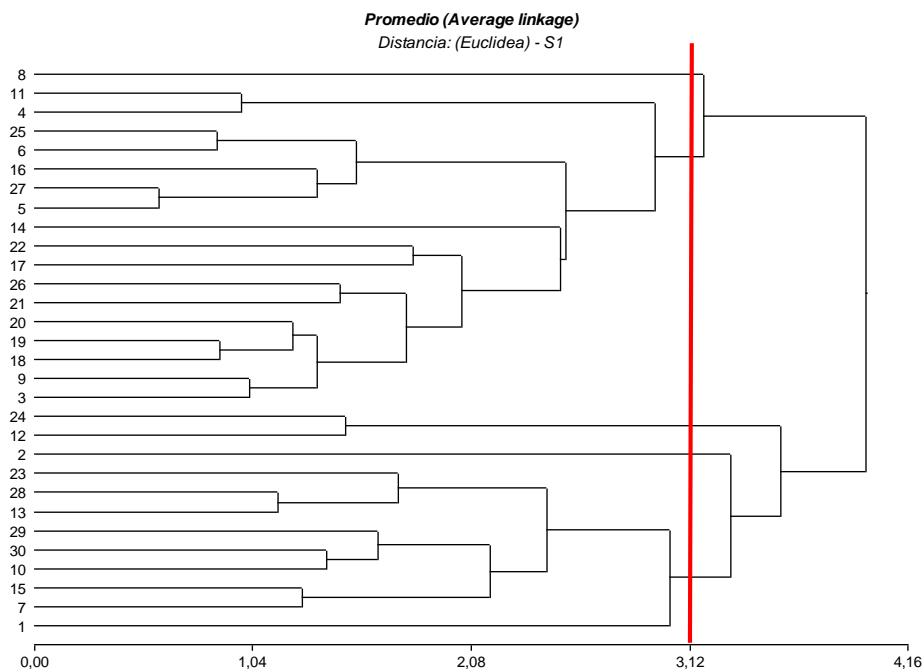


Figura 3.22. Dendrograma obtenido mediante Análisis de Conglomerados con los seis caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Salino 1.

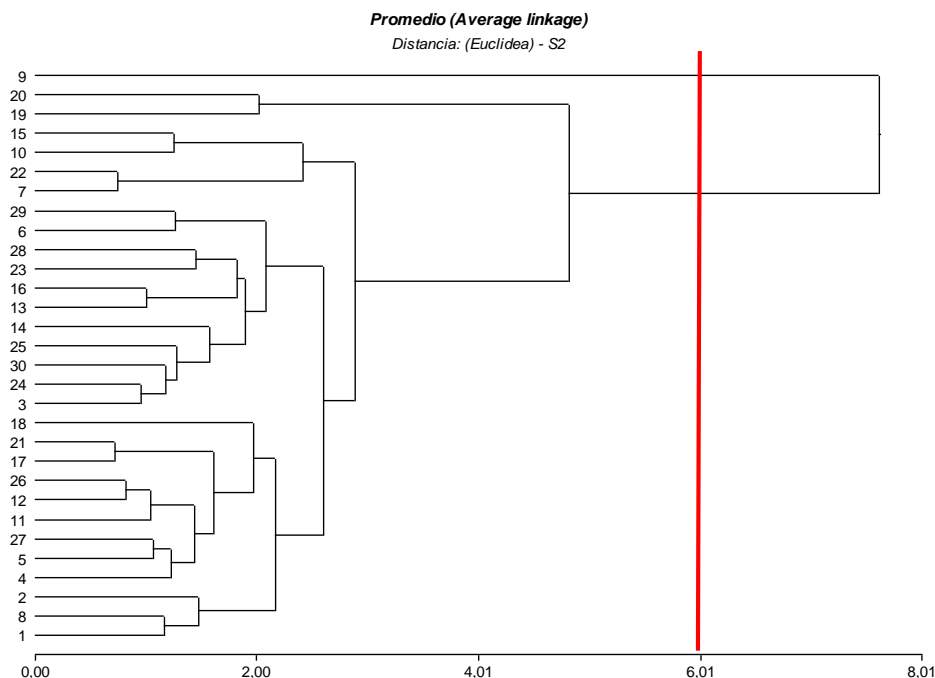


Figura 3.23. Dendrograma obtenido mediante Análisis de Conglomerados con los seis caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Salino 2.

3. Estimación de parámetros genéticos

En la Tabla 3.11 se muestran se muestran las heredabilidades en sentido estricto (h^2) calculadas para los siete caracteres de los tres pooles de familias de medio hermanos en los tres tratamientos salinos.

Las heredabilidades calculadas por pool de policruzamiento y tratamiento salino oscilaron entre 0,0008 y 0,99 (Tabla 3.11). En general las heredabilidades de los caracteres estudiados fueron similares entre los tres pooles, acorde al tratamiento considerado. En el tratamiento control las mayores h^2 estimadas fueron para el carácter PSR. Las menores h^2 estimadas fueron para los caracteres Alt, Nmac, LR y PFA. Las heredabilidades intermedias se obtuvieron para las variables PST y PSA. En el tratamiento S1 las mayores h^2 estimadas fueron para los caracteres PSR, PST y PSA. El resto de las variables tuvieron heredabilidades bajas. En el tratamiento S2 las mayores h^2 estimadas fueron para el carácter PSR. Las heredabilidades intermedias fueron para la variable PST y PSA. El resto de las variables tuvieron heredabilidades bajas.

Tabla 3.11. Heredabilidad en sentido estricto (h^2) para siete caracteres morfológicos en tres pooles (1, 2, 3) de familias de medio hermanos en los tres tratamientos (Control – Salino 1 – Salino 2).

Variable	Tratamiento	Heredabilidad		
		Pool 1	Pool 2	Pool 3
Nmac	Control	0,002	0,02	0,005
	S1	0,1	0,06	0,07
	S2	0,03	0,01	0,03
Alt	Control	0,04	0,03	0,001
	S1	0,04	0,01	0,04
	S2	0,03	0,05	0,01
PFA	Control	0,01	0,02	0,002
	S1	0,09	0,29	0,13
	S2	0,03	0,002	0,02
PSA	Control	0,33	0,38	0,03
	S1	0,72	0,91	0,8
	S2	0,54	0,18	0,38
LR	Control	0,01	0,01	0,01
	S1	0,03	0,004	0,03
	S2	0,01	0,01	0,02
PSR	Control	0,92	0,94	0,86
	S1	0,99	0,99	0,96
	S2	0,96	0,88	0,87
PST	Control	0,27	0,32	0,05
	S1	0,43	0,88	0,74
	S2	0,45	0,12	0,34

4. Índice de tolerancia

Se calcularon los índices de tolerancia para los caracteres PSA, PSR y PST en el tratamiento S1. En la Tabla 3.12 se muestran las medias de cada índice para las 30 FMH, y la media del IT de cada caracter.

Tabla 3.12. Valores de medias para cada índice calculado y media por caracter para las 30 FMH de *Festuca arundinacea* creciendo en el tratamiento Salino 1.

FMH	ITPSA	ITPSR	ITPST
1	0,27	0,38	0,27
2	0,34	0,48	0,37
3	0,23	0,34	0,25
4	0,22	0,29	0,23
5	0,24	0,32	0,25
6	0,34	0,39	0,35
7	0,23	0,28	0,24
8	0,27	0,31	0,28
9	0,28	0,33	0,29
10	0,36	0,38	0,36
11	0,23	0,26	0,24
12	0,38	0,49	0,40
13	0,28	0,30	0,28
14	0,3	0,47	0,33
15	0,43	0,44	0,44
16	0,25	0,27	0,26
17	0,23	0,30	0,24
18	0,24	0,30	0,25
19	0,24	0,39	0,26
20	0,28	0,27	0,28
21	0,23	0,28	0,24
22	0,26	0,31	0,27
23	0,3	0,34	0,30
24	0,26	0,43	0,28
25	0,22	0,40	0,25
26	0,2	0,37	0,22
27	0,21	0,35	0,24
28	0,3	0,36	0,31
29	0,5	0,61	0,51
30	0,38	0,33	0,54
MEDIA GENERAL	0,28	0,36	0,30

4.1. Relación entre productividad y tolerancia a la salinidad

Debido a que en el mejoramiento genético de especies forrajeras no solo es importante la tolerancia a la salinidad, sino que se debe tener en cuenta también la productividad en dichas condiciones, se procedió a realizar tres gráficos de dispersión donde uno de los ejes representa el carácter PSA, PSR o PST respectivamente (en el tratamiento S1) y el otro eje representa el promedio del ITPSA, ITPSR o ITPST respectivamente. Las líneas de corte en el eje x e y representan las medias del ITPSA, ITPSR o ITPST y PSA, PSR o PST, respectivamente, y permiten identificar cuatro cuadrantes.

En el caso del carácter PSA, el gráfico permite distinguir en el cuadrante superior derecho a las FMH con mejor comportamiento (10, 30, 12, 15 y 29) por presentar elevada productividad e ITPSA. En el cuadrante superior izquierdo se encuentran las FMH con elevada productividad pero bajo ITPSA (7, 28, 23, 2, 13, 24, 1 y 6). El resto de las FMH se caracterizaron por presentar baja productividad e ITPSA (Figura 3.24).

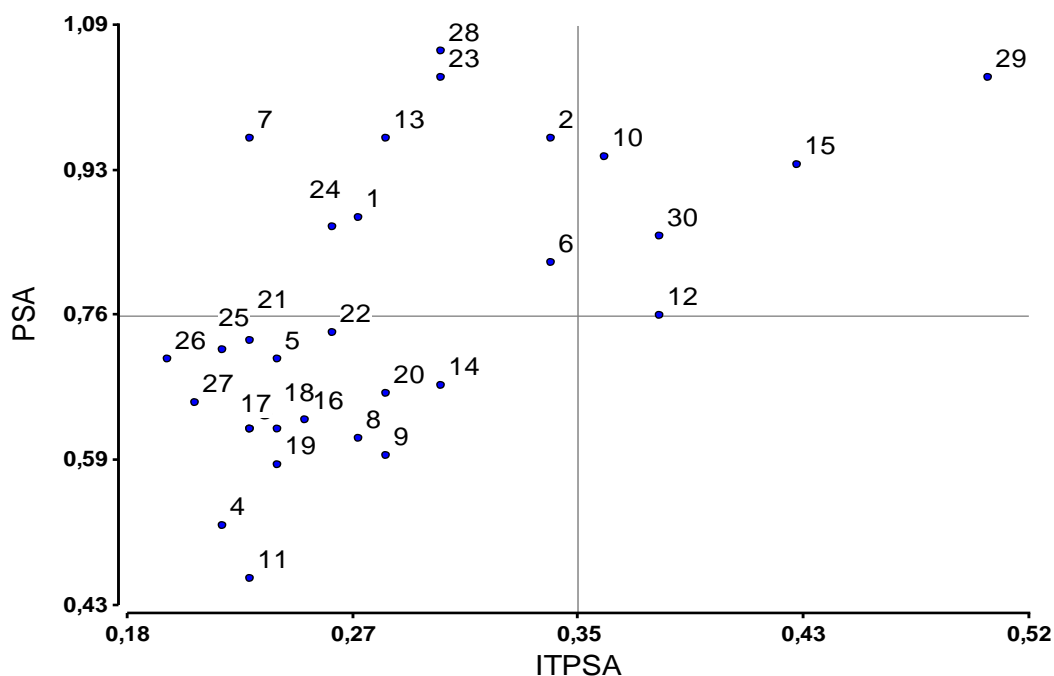


Figura 3.24. Gráfico de dispersión del comportamiento de las 30 FMH según la productividad (PSA) y el ITPSA en el tratamiento Salino 1.

En el caso del carácter PSR, el gráfico permite distinguir en el cuadrante superior derecho a las FMH con mejor comportamiento (29, 2, 14, 12, 25, 24, 15, 26, 6, 1, 10 y 28) por presentar elevada productividad e ITPSR. En el cuadrante superior izquierdo se encuentran las FMH con elevada productividad pero bajo ITPSR (30, 23, 16, 7 y 13). El resto de las FMH se caracterizaron por presentar baja productividad e ITPSR (Figura 3.25).

En el caso del carácter PST, el gráfico permite distinguir en el cuadrante superior derecho a las FMH con mejor comportamiento (29, 15, 10, 30, 12, 6, 2, 23 y 28) por presentar elevada productividad e ITPST. En el cuadrante superior izquierdo se encuentran las FMH con elevada productividad pero bajo ITPST (7, 13, 24, 23 y 1). El resto de las FMH se caracterizaron por presentar baja productividad e ITPST (Figura 3.26).

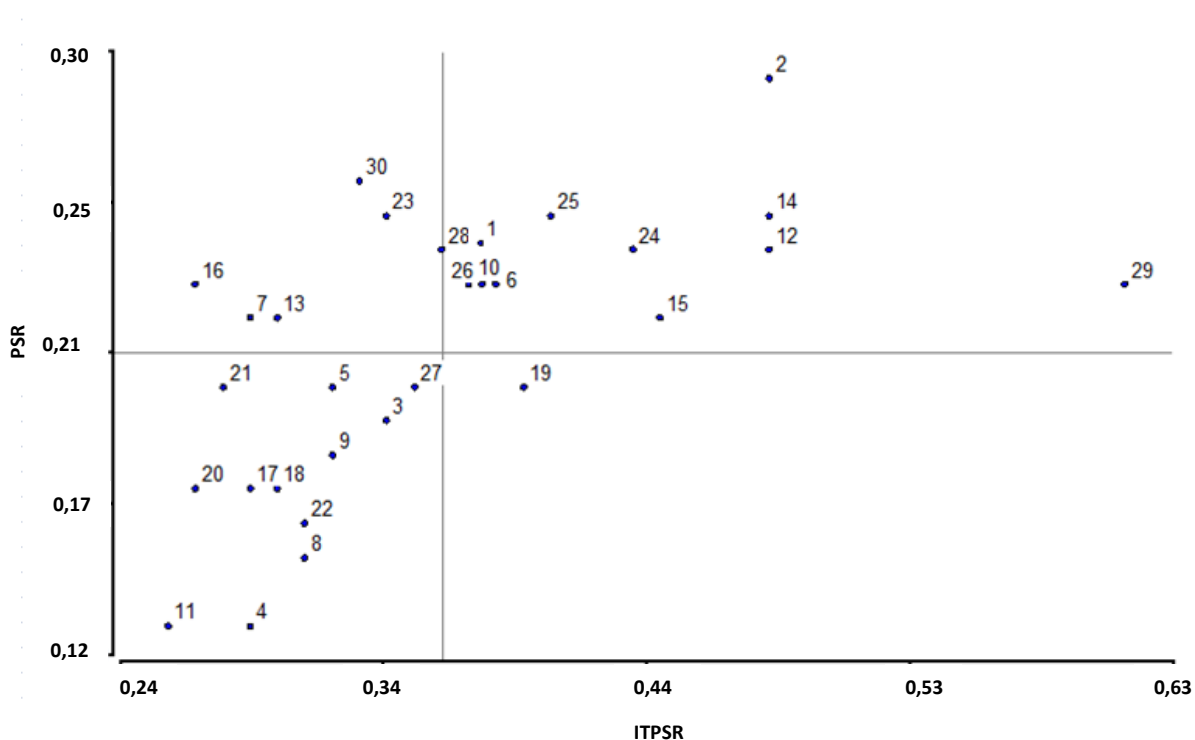


Figura 3.25. Gráfico de dispersión del comportamiento de las 30 FMH según la productividad (PSR) y el ITPSR en el tratamiento Salino 1.

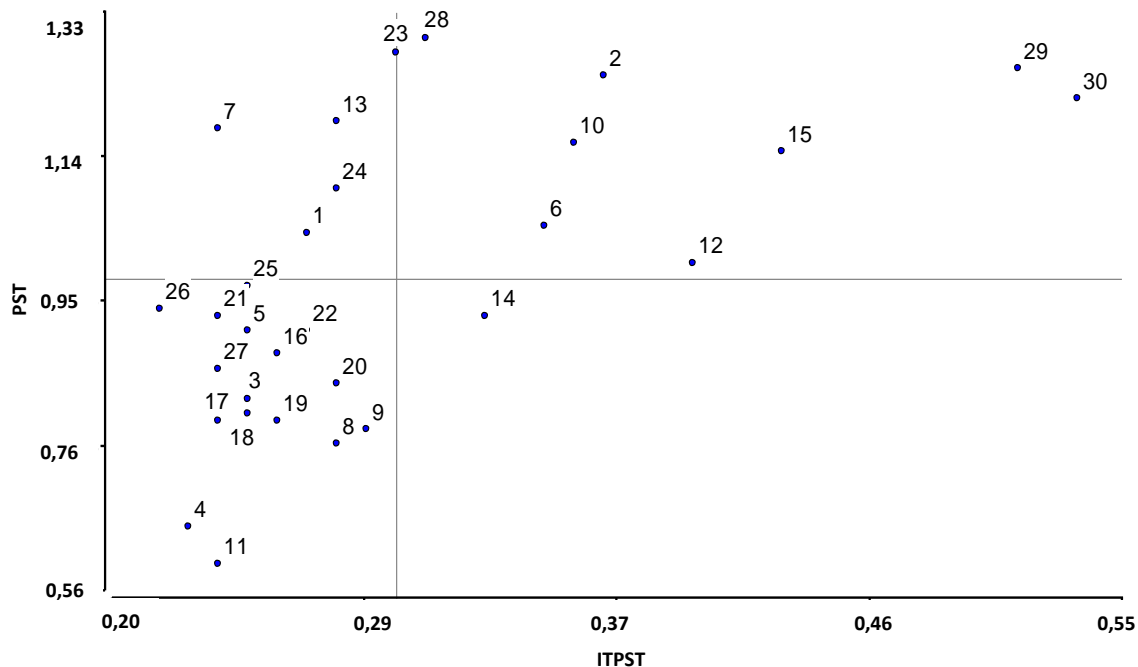


Figura 3.26. Gráfico de dispersión del comportamiento de las 30 FMH según la productividad (PST) y el ITPST en el tratamiento Salino 1.

DISCUSIÓN

El progreso en el mejoramiento genético de la tolerancia a la salinidad en plantas es generalmente lento debido a numerosos factores, como los comportamientos multigénicos, los mecanismos fisiológicos complejos, el uso de técnicas inadecuadas para evaluar la tolerancia, la baja eficiencia de selección y los escasos conocimientos sobre la salinidad y sus interacciones ambientales (Flowers, 2004). La salinidad reduce el crecimiento de la parte aérea y de las raíces, el área foliar y la tasa de fotosíntesis en las plantas, por lo tanto reduce su rendimiento. En regiones afectadas por la salinidad, el cultivo de especies tolerantes es una solución apropiada para prevenir la disminución de los rendimientos (Amira y Abdul, 2011).

Si bien la festuca alta es considerada una especie medianamente tolerante a salinidad respecto de otras poáceas y de otras especies del mismo género, los estudios genéticos relacionados con la tolerancia de poblaciones y familias en particular, resultan de gran importancia para aplicar en programas de mejoramiento y selección. En este trabajo se evidenció una reducción significativa del crecimiento inicial de las plántulas de las 30 familias en condiciones de salinidad en hidroponia, respecto de la condición control, y una importante Interacción familia*tratamiento. Sin embargo todos los genotipos estudiados sobrevivieron aún en la concentración salina más elevada. En promedio el peso seco total por planta se redujo un 71,5% en el tratamiento S1 y un 83,4% en el tratamiento S2, respecto del peso logrado en el tratamiento control. Estos resultados son coincidentes con otras investigaciones realizadas en trigo (Shahzad *et al.*, 2012) y agropiro alargado (Borrajó y Reigosa Roger, 2008; Maciel, 2018).

La concentración salina moderada (S1) fue una condición ambiental que expresó mayor variabilidad en la respuesta de los pools y de las familias respecto a la concentración salina más elevada (S2). Esto se vio reflejado en las elevadas heredabilidades en sentido estricto obtenidas en S1 para el Peso seco de raíz, el Peso seco aéreo y el Peso seco total, indistintamente del pool considerado. Los resultados obtenidos indicarían que estas tres variables serían las indicadas para utilizar en programas de selección por tolerancia a la salinidad. Resultados similares fueron presentados por Shahzad *et al.* (2012), Affinito (2020) y Maciel (2018) investigando *Lotus tenuis* y agropiro alargado, respectivamente, y confirmarían la opinión de algunos mejoradores que sostienen que el ambiente de selección ideal sería bajo condiciones de estrés, dado que promueven la expresión y segregación de genes de interés y se logran mayores avances en la selección (Byrne *et al.*, 1995; Gavuzzi *et al.*, 1997; Blum, 2011).

Si bien en S2 la variabilidad disminuyó, permitió observar comportamientos destacados de algunas familias, como las FMH 9 y 6, cuyo crecimiento fue mayor respecto a S1. Si bien ambas familias derivan de poblaciones diferentes, esta respuesta podría indicar una capacidad

diferencial para instalarse y desarrollarse en una gran variedad de ambientes, ubicados en la periferia del nicho ecológico explorado, ya sea por efecto de un alto grado de plasticidad o la existencia de adaptación local (Taiz y Zeiger, 1998) mediada por el nivel de poliploidía de la especie.

Desde el punto de vista fisiológico, la partición de los fotoasimilados en biomasa aérea y radicular está fuertemente afectada en gramíneas por las condiciones ambientales y en general se reduce ante condiciones de estrés, ya sea provocado por factores bióticos (defoliación animal) o por factores abióticos (sequía, salinidad) (Monteoliva *et al.*, 2019). En el presente estudio existieron grupos de familias tolerantes que priorizaron la asignación de recursos fotosintéticos a la biomasa aérea y otras a la biomasa radicular, probablemente asociado al estado particular de crecimiento (Bernstein y Hayward, 1958; Pasternak *et al.*, 1995), a su composición genética diferente y a una estrategia particular ante el estrés salino moderado. Existen estudios en *Cenchrus ciliaris* (Griffa *et al.*, 2010), *Elimus scabrifolius* (Zabala, 2016) y en *Panicum coloratum* (Cardamone *et al.*, 2018) que indican una mayor proporción de crecimiento de raíz respecto a crecimiento aéreo en respuesta a la salinidad. Contrariamente en agropiro alargado (Maciel, 2018) se produjo una disminución del crecimiento de raíz en condiciones de estrés por halomorfismo.

La tolerancia a la salinidad es un parámetro que permite discriminar al germoplasma estudiado según la biomasa producida bajo estrés y en condiciones no estresantes (control) (Ashraf *et al.*, 1999; Meneguzzo *et al.*, 2000; Munns *et al.*, 2002; Shabala, 2017). El nivel o grado de tolerancia a la salinidad difiere acorde a cada especie y a cada grupo de genotipos. Al calcular el índice de tolerancia promedio de los caracteres PSA, PSR y PST para cada FMH, se detectaron diferentes valores. En el caso del peso seco aéreo (ITPSA) se observó un rango que osciló entre 0,20 y 0,50. Dicho índice en la concentración salina intermedia (S1) permitió discriminar las FMH en tolerantes y susceptibles debido a que permitió detectar familias con menor o mayor reducción del crecimiento con respecto al control. En este sentido, se puede decir que las familias 10, 12, 15, 29 y 30 fueron las que presentaron mayor tolerancia y productividad ya que pudieron sostener una elevada producción de biomasa bajo estrés salino. Estos datos son coincidentes con estudios en especies forrajeras que muestran la posibilidad de detectar genotipos con mayor nivel de tolerancia al estrés (Francois, 1988; Láuchi, 1984; Smith *et al.*, 1981), expresado en caracteres asociados a la producción de biomasa aérea (materia seca) (Ixtaína y Mujica, 2004; Pesqueira, 2008). Al evaluar los índices de tolerancia conjuntamente se puede decir que las FMH 29, 12 y 15 conformaron el grupo de las más productivas y más tolerantes, indistintamente del carácter considerado (ITPSA, ITPSR, ITPST); similarmente las FMH 11 y 4 fueron las menos productivas

y menos tolerantes a la salinidad. Sin embargo los agrupamientos fueron coincidentes al establecer los IT en base al peso seco aéreo y al peso seco total (alta productividad y alta tolerancia: FMH 29, 15, 10, 30 y 12) y dispares al considerar las relaciones en base al peso seco de raíz (alta productividad y alta tolerancia: FMH 29, 2, 14, 12, 25, 24, 15). Estos resultados podrían explicarse por la elevada correlación positiva observada a nivel fenotípico y genético entre el peso seco aéreo y el peso seco total.

Los resultados obtenidos permitirían seleccionar grupos de genotipos de festuca para ser incorporados a programas de mejoramiento genético considerando principalmente la tolerancia como la reducción porcentual del rendimiento en condiciones salinas respecto a no salinas (Maas y Hoffmann, 1977). En el caso que el objetivo sea desarrollar cultivares de festuca alta que se establezcan y tengan una producción de forraje inicial exitosa en suelos con condiciones de salinidad moderada, las familias 29, 15, 10, 30 y 12 serían las indicadas para incluir en un programa de desarrollo. En aquellos casos donde se priorice el desarrollo de cultivares con capacidad de tolerar salinidad moderada y con capacidad de explorar perfiles de suelo restrictivos las familias indicadas serían la 29, 2, 14, 12, 24 y 15. Indiscutiblemente las FMH 12, 15 y 29 serían las indicadas para incluir como base de germoplasma de un programa de obtención de cultivares tolerantes, independientemente del carácter considerado (ITPSA, ITPSR, ITPST). Si bien en la concentración salina se redujo la variabilidad en el comportamiento de los genotipos, la familia 9 sería la indicada para incorporar en un plan de mejora para obtención de cultivares con elevada tolerancia.

CONCLUSIONES

- El sistema salino hidropónico y las concentraciones utilizadas fueron efectivos para detectar variabilidad fenotípica y genética en la tolerancia a salinidad en estado de plántula.
- La salinidad produjo una reducción significativa en el crecimiento inicial respecto de la condición control, en todas las FMH de festuca alta evaluadas, sin afectar la sobrevivencia de las mismas.
- La respuesta de las FMH dependió del tratamiento impuesto. Se detectó mayor variabilidad entre familias en 250mM de NaCl, mientras que la concentración más elevada (500mM) no permitió discriminar entre FMH.
- El Índice de Tolerancia (ITPSA) permitió determinar diferencias significativas entre las FMH en 250mM, destacando a las FMH “tolerantes” (29, 15, 10, 30 y 12) y “susceptibles” (4, 5, 8, 9, 11, 17, 18, 21, 22, 26, 27).
- La heredabilidad en sentido estricto detectada en el material en estudio fue variable teniendo en cuenta las concentraciones salinas impuestas y el pool de procedencia de las FMH evaluadas.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO INICIAL DE FMH DE FESTUCA ALTA BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA

INTRODUCCIÓN

La sequía constituye una de las restricciones más importantes para la productividad de los cultivos, causando enormes pérdidas económicas en la agricultura (Boyer, 1982). Es considerada un factor de estrés abiótico que ocurre en las plantas cuando la disponibilidad de agua es insuficiente para satisfacer sus necesidades básicas y modular su crecimiento y desarrollo (Pardo, 2010). Varios autores definen a la sequía como el estrés que impide que los cultivos expresen su potencial genético en la producción de biomasa y el rendimiento de semillas (Xiong y Zhu, 2002; Borsani *et al.*, 2003; Ashraf, 2004; Yamaguchi and Blumwald, 2005; Agarwal *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2007; Munns y Tester, 2008; Witcombe *et al.*, 2008; Salekdeh *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista agronómico, la tolerancia se define como la habilidad de las plantas de sobrevivir y producir rendimientos económicos en condiciones de estrés y se expresa como la relación entre el rendimiento de una variedad en condiciones estresantes con respecto a su rendimiento en condiciones normales. Con diferente nivel de sequía en el suelo esta relación puede variar, por lo que al caracterizar el grado de tolerancia se debe especificar el nivel humedad del sustrato (González *et al.*, 2002).

En términos generales las especies han desarrollado diversos mecanismos a lo largo de la evolución para tolerar períodos de sequía. Algunas expresan mecanismos de escape al estrés, completando su ciclo de vida y produciendo semillas para sobrevivir (Fry y Huang, 2004); otras especies pueden persistir disminuyendo el estrés a través de una reducción de la transpiración y manteniendo o mejorando la absorción de agua; también existen aquellas que suspenden el crecimiento de la parte aérea entrando en estado de latencia para sobrevivir (Richardson *et al.*, 2008) y vuelven a rebrotar cuando existe disponibilidad de agua. Algunas de estas estrategias se focalizan en el ajuste estomático, el incremento de la captura de agua a través de la modificación en la longitud y profundidad de las raíces, la acumulación de osmolitos y el engrosamiento de la pared celular, entre otros (Verslues *et al.*, 2006; Rampino *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista fisiológico, la sequía genera una reducción del potencial hídrico de la planta (Verslues *et al.*, 2006) afectando la tasa de aparición de hojas, la elongación foliar y por ende el tamaño final de las hojas (Hsiao, 1973; Ilahi, 1982; Frensch, 1997). Al respecto, se ha demostrado una relación directa entre disponibilidad de agua en el suelo y la tasa de elongación foliar (Acevedo *et al.*, 1971) en condiciones de sequía moderada a severa, lo que produce una senescencia foliar prematura. Similarmente, se afecta el macollaje de las plantas, observándose disminuciones en la densidad de macollos a medida que el estrés hídrico es más severo, hasta casos extremos en que ocurre la muerte de los mismos (Chaturvedi *et al.*, 1981; Davidson y

Chevalier, 1987).

La festuca alta fue ampliamente estudiada por su elevada tolerancia a la sequía (Beard, 1973; Fry y Huang, 2004; Turgeon, 2005; Karcher, *et al.*, 2008; Pessarakli y Kopec, 2008). Brar y Palazzo (1995) evaluaron la tolerancia a la sequía en festuca alta y festuca rubra, en condiciones controladas en macetas y con tres tratamientos (7, 14 y 21 días sin riego), detectando que ambas toleraron bien la sequía pero de distintas formas. Mientras que la festuca rubra presenta raíces superficiales y baja tasa de crecimiento y de uso de agua, la festuca alta presenta raíces profundas y elevada tasa de crecimiento y de uso del agua. El comportamiento de la festuca alta fue confirmado por otros autores (Beard, 1989; Biran *et al.*, 1981; Githinji *et al.*, 2009; Carrow, 1996; Huang y Gao, 2000 b; Sheffer *et al.*, 1987; Fu *et al.*, 2006). Además Beard (1989) determinó que la festuca alta bajo condición de sequía posee una evapotranspiración baja, lo que se relaciona con un mayor rendimiento. Fu y Huang (2003) evaluaron 12 cultivares de festuca alta en condición de sequía en invernáculo y midieron características de las hojas (densidad estomática, contenido de cera epicuticular, ancho de la hoja, grosor de la hoja, densidad del tejido) observando que las hojas más gruesas con mayor cantidad de cera epicuticular se correlacionaron con mayor calidad. Pirnajmedin *et al.* (2015) evaluaron 24 genotipos de festuca alta detectando un gran efecto de tratamiento sequía reduciendo el crecimiento y la producción de biomasa. Wang *et al.* (2017) evaluaron 26 cultivares detectando un efecto de tratamiento sequía significativo, los mismos sugieren la importancia del mantenimiento del contenido de agua en las hojas durante periodos prolongados de sequía, lo mismo fue comprobado por Cross *et al.* (2013). Ebrahimiyan *et al.* (2013) evaluaron el comportamiento de 30 genotipos de festuca alta bajo condiciones de sequía en cuanto a caracteres morfológicos (número de macollos, altura de planta y peso seco) y caracteres fisiológicos relacionados a la eficiencia fotosintética. Los mismos detectaron diferencias significativas entre los genotipos indicando la existencia de variabilidad genética en el germoplasma evaluado para la tolerancia a la sequía. Además encontraron que el peso seco, el número de macollos y la altura de planta son reducidos significativamente por la condición de estrés por sequía.

En los programas de mejoramiento genético es importante conocer en qué proporción la variabilidad detectada es heredable; en particular, interesa conocer la heredabilidad de sentido estricto. Se han realizado estudios sobre la tolerancia a la sequía en cultivos agrícolas importantes detectando rasgos heredables cuantitativos (De la Peña y Hughes, 2007; Diab *et al.*, 2004). En trigo se detectaron múltiples genes con efectos aditivos relacionados a la tolerancia a la sequía (Dhanda y Sethi, 1998; Rebetzke *et al.*, 2006). En sorgo se determinó que varios factores relacionados a la tolerancia a la sequía están controlados por múltiples genes (Tuinstra

et al., 1997). En festuca alta existe una amplia variación genética para la tolerancia a la sequía, tanto entre genotipos como entre poblaciones (Beard and Sifers, 1997). Es por ello que el presente capítulo propone evaluar el crecimiento inicial de familias de medios hermanos de festuca alta bajo condiciones de sequía.

Hipótesis

- El crecimiento inicial de 30 familias de medios hermanos de festuca alta en condiciones de sequía expresa un componente genético heredable.

Objetivos

- Detectar diferencias en el crecimiento inicial de FMH en condiciones de sequía.
- Discriminar familias tolerantes y susceptibles en condición de sequía.
- Estimar la heredabilidad en sentido estricto en los diferentes ambientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. El germoplasma estudiado

Se evaluaron las mismas 30 FMH que se evaluaron en condición de salinidad en hidroponia (Capítulo 3).

2. Estudio del crecimiento inicial de las FMH en condiciones de sequía

El 14 de abril se realizó la siembra de las 30 FMH en un invernáculo con control de temperatura. El período de evaluación en condiciones de sequía fue de 41 días, durante los cuales se registraron los valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) mínima, media y máxima mediante termómetros digitales marca TFA (Figura 4.1).

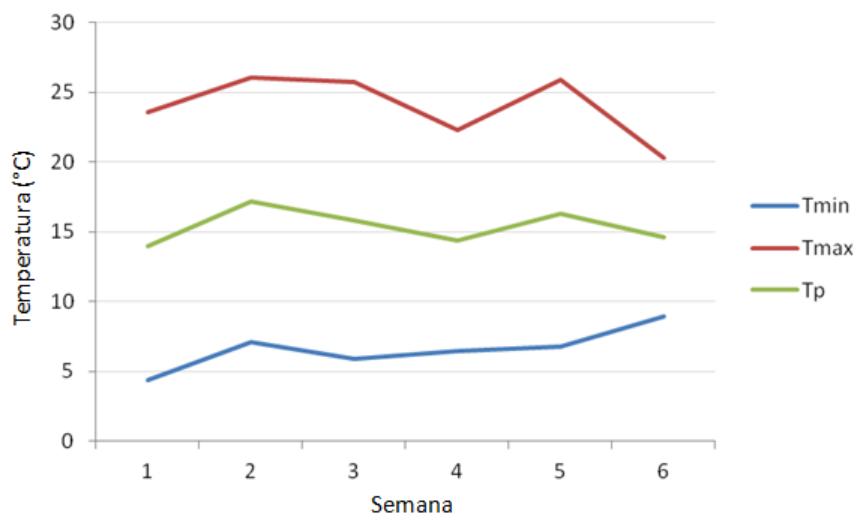


Figura 4.1. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) semanal promedio (Tp), temperatura semanal máxima (Tmax), temperatura semanal mínima (Tmin) durante las seis semanas de duración del experimento en el invernáculo.

Las 30 FMH se sembraron en *speedlings* conteniendo una mezcla tierra arena 1:1. Dentro de cada pocillo se colocaron tres semillas para asegurar el número de plántulas. Una vez comenzado el proceso de germinación se procedió a ralea para dejar solo una planta por pocillo. Luego de 56 días, cuando las plantas tuvieron al menos 3 hojas, fueron trasplantadas a macetas plásticas (jardineras) de 10L que contenían una mezcla de tierra arena 3:2 para permitir un buen drenaje del agua. Se realizaron dos riegos a saturación para partir de una condición de capacidad de campo y a las plantas bajo tratamiento de sequía se les suspendió totalmente el riego.

El ensayo se dispuso bajo un diseño en bloques completos aleatorizados (DCBA) con tres

repeticiones y dos tratamientos control (riego periódico) y sequía (suspensión total del riego) (Figura 4.2). Cada maceta contenía 5 plántulas por FMH y un total de 10 plántulas (se evaluaron dos FMH por maceta) y cada familia estuvo representada por 30 genotipos. Las plántulas se situaron a 7cm una de otra simulando un stand denso. Se monitoreó diariamente la humedad contenida en cada una de las macetas mediante la utilización de sonda TDR300. En cada maceta se registró tres veces el contenido de humedad para luego ser promediado. El ensayo en condición de sequía se inició con plántulas con cuatro macollos promedio y una altura promedio de 8,3 cm (Figura 4.3, Figura 4.4).

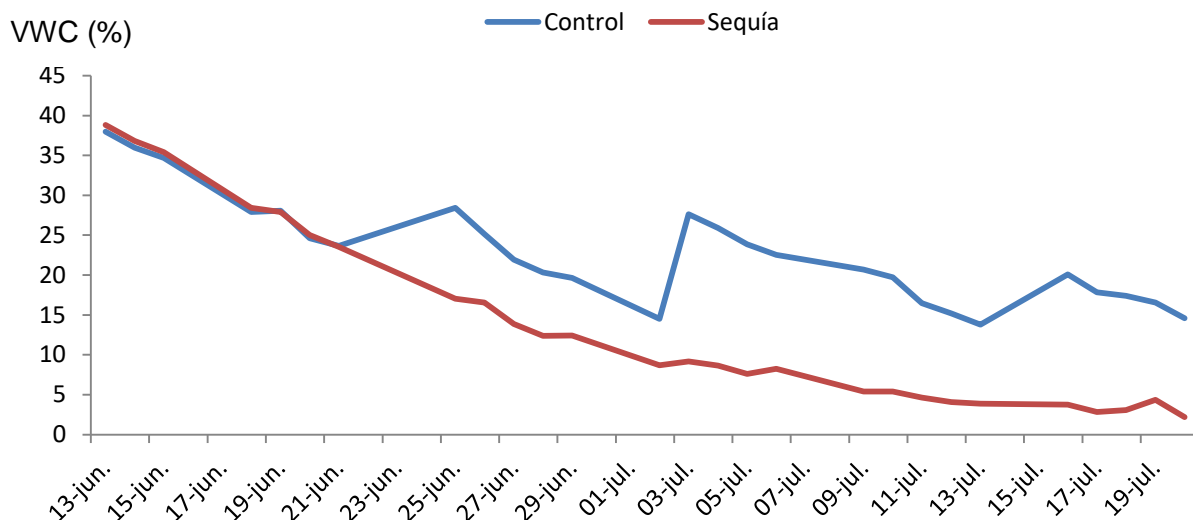


Figura 4.2. Porcentaje de contenido volumétrico de agua (VWC) por tratamiento durante los 41 días de duración del ensayo en condición de sequía.



Figura 4.3. Tamaño de las plántulas al momento del inicio del ensayo en condición de sequía.



Figura 4.4. Disposición del ensayo de crecimiento inicial de festuca alta en condiciones de sequía.

2.1. Caracteres evaluados

Se evaluaron cuatro caracteres de crecimiento inicial a lo largo de todo el estudio. Los caracteres número de macollos y altura de planta fueron evaluados en tres fechas (20, 31 y 41 días de implementados los tratamientos) mientras que el resto de los caracteres se evaluaron al momento de finalizar el estudio (41 días) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Caracteres de crecimiento inicial evaluados en las 30 FMH de festuca alta bajo condición de sequía, abreviatura y momento de medición.

Caracter evaluado	Abreviatura	Momento de medición
Número de macollos	Nmac1	20 días
	Nmac2	31 días
	NmacF	41 días
Altura de planta (cm)	Alt1	20 días
	Alt2	31 días
	AltF	41 días
Peso fresco aéreo (g)	PFA	41 días
Peso seco aéreo (g)	PSA	

Número de macollos: a los 20, 31 y 41 días de implementados los tratamientos se contó el número de macollos totales por plántula.

Altura de planta (cm): a los 20, 31 y 41 días de implementados los tratamientos se midió con regla graduada la longitud total de cada plántula en cm.

Peso fresco aéreo (g): luego de 41 días de implementados los tratamientos se procedió a realizar la cosecha de biomasa aérea de cada plántula de forma individual. Cada uno de los materiales cosechados fue identificado y conservado en bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad. El pesado se realizó en balanza de precisión marca RADWAG modelo WTB200.

Peso seco aéreo (g): luego de realizar el peso fresco aéreo las muestras se colocaron en bolsas de papel tipo Kraft y se secó en estufa de aire forzado a 60°C por un período de 48 a 72 horas hasta lograr un peso constante. Una vez secas se procedió a pesarlas en balanza de precisión marca RADWAG modelo WTB200.

3. Análisis de la información

Los datos obtenidos durante la evaluación del crecimiento inicial bajo condición de sequía fueron analizados mediante el software Infostat/P y su interfaz con R para la estimación de modelos lineales generales y mixtos. Se realizó estadística descriptiva, análisis de varianza (ANAVA), test de comparación de medias DGC y análisis exploratorios multivariados de componentes principales y de conglomerados.

3.1. Estadística descriptiva

Para todas las variables se ajustaron modelos de ANAVA. Se utilizó el Módulo de Modelos Lineales Generales y Mixtos del software Infostat/P (2015) en su interfaz con R.

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \delta_j + \gamma_k + (\delta\gamma)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ representa la media general, β_i es el efecto del i -ésimo bloque y se considera fijo, δ_j es el efecto de la j -ésima FMH que se considera aleatorio, γ_k es el efecto del k -ésimo tratamiento de sequía que se considera aleatorio, $(\delta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre la j -ésima FMH y el k -ésimo tratamiento de sequía, ε_{ijk} es el término de error de la ijk -ésima observación debido a la variación ambiental.

Las comparaciones múltiples entre pares de medias se realizaron con el test DGC ($p \leq 0,05$) utilizando los factores tratamiento y FMH como fijos. Para las variables número de macollos y altura de planta se utilizaron modelos trifactoriales teniendo en cuenta el factor tiempo.

3.2. Estimaciones de correlaciones fenotípicas y genéticas

La asociación entre dos caracteres puede ser observado fenotípicamente y genéticamente. La correlación fenotípica fue realizada con el paquete estadístico Infostat/R mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La correlación genética fue realizada con el software META-R (Multi-Environment Trial Analysis with R) (Alvarado *et al.*, 2020). Ambas correlaciones miden la magnitud de la asociación entre dos variables y asume valores en el intervalo [-1;1] y el signo indica la dirección de la asociación.

4. Análisis Multivariados

Con la finalidad de relacionar las variables de crecimiento inicial por tratamiento se realizaron: Análisis de Componentes Principales y Análisis Jerarquizado (Clúster) mediante el paquete estadístico Infostat/R.

5. Estimación de parámetros genéticos

Las heredabilidades en sentido estricto (h^2) fueron calculadas para cada variable de forma conjunta y teniendo en cuenta el tratamiento de sequía y pool de procedencia. El cálculo se realizó a partir de las varianzas estimadas anteriormente según la fórmula:

$$h^2 = \frac{\sigma_f^2}{\sigma_f^2 + \frac{\sigma_e^2}{r}}$$

Donde, r son las 3 repeticiones, σ_e^2 es la variancia del error y σ_f^2 es la variancia genética.

6. Índice de tolerancia

La tolerancia a la sequía para el peso seco aéreo (ITPSA) se estimó mediante la fórmula:

$$\text{ITPSA} = \text{PSA}_{\text{tratamiento}} / \text{promedio PSA}_{\text{control}}$$

Se realizó el cociente entre la producción de biomasa seca aérea de cada plántula (PSA tratamiento) en condición de sequía y el promedio del PSA de las plántulas en el control. Este cociente se calculó para cada FMH en condición de sequía.

Las FMH con mayor ITPSA se consideraron tolerantes y las FMH con bajos valores para el índice se consideraron susceptibles (Hannon y Bradshaw, 1968; Ashraf *et al.*, 1986; Maas, 1986; Shannon, 1997; Ali *et al.*, 2002; Argentel *et al.*, 2009).

RESULTADOS

1. Análisis univariados

Todos los caracteres evaluados evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre FMH, entre TRAT e interacción FMH*TRAT significativa ($p < 0,05$) (Tabla 4.2). En el caso de las variables evaluadas en distintos momentos (Alt y Nmac) no se detectó interacción triple significativa (FMH*TRAT *M).

1.1. Efecto de los tratamientos

Se observó una disminución del crecimiento en el tratamiento sequía con respecto al tratamiento control, pero aun así, no se observó mortandad en las distintas familias (Anexo 4, Tabla 4.1, Tabla 4.2, Figura 4.5).



Figura 4.5. Efecto de los tratamientos control y sequía a los 30 días de iniciados.

Tabla 4.2. Media de los caracteres Número de macollos 1, Número de macollos 2, Número de macollos final, Altura 1, Altura 2, Altura final, Peso fresco aéreo y Peso seco aéreo en cada una de las 30 FMH de *Festuca arundinacea* y valor p.

FMH	Nmac1	Nmac2	NmacF	Alt1 (cm)	Alt2 (cm)	AltF (cm)	PFA (g)	PSA (g)
1	7,23	10	10,83	14,03	15,76	17,27	1,4	0,24
2	6,8	9,63	10,73	14,93	16,62	18,13	1,45	0,24
3	8,83	11,07	12,83	13,64	15,01	16,78	1,68	0,29
4	9,93	12,9	14	13,13	13,67	15,16	1,78	0,31
5	8,13	10,77	11,67	12,59	13,68	14,94	1,52	0,29
6	7,77	9,7	10,57	13,5	14,43	16,4	1,42	0,27
7	7,53	9,97	10,93	13,85	15,01	17,35	1,5	0,28
8	8,03	10,4	10,7	14,1	16,29	17,7	1,6	0,29
9	11,83	16,1	17,6	13,62	15,95	16,87	1,75	0,32
10	8,3	10,53	10,87	15,5	17,21	19,01	1,58	0,29
11	11	14,37	14,53	11,64	12,49	13,29	1,36	0,26
12	9,67	12,67	13,83	12,7	13,79	14,81	1,4	0,27
13	11,23	15,63	17,93	11,08	12,99	14,58	1,67	0,29
14	7,07	9,57	11	12,06	15,1	16,11	1,35	0,24
15	8,17	11,6	12,2	14,18	16,58	18,43	1,76	0,29
16	10,4	12,37	13,23	12,49	13,87	14,56	1,31	0,23
17	11,1	13,93	15,23	11,7	12,8	13,71	1,48	0,29
18	11,5	14,83	15,13	12,37	13,29	14,03	1,32	0,26
19	9,13	11,77	12,67	14,46	16,45	17,66	1,51	0,29
20	7,83	10,93	12,17	13,6	16	17,21	1,71	0,31
21	11,53	15,5	16,5	12,32	13,07	13,81	1,52	0,3
22	11,7	15,17	15,37	12,94	14,05	15,25	1,49	0,3
23	11,63	15,27	16,3	14,48	16,04	16,59	2,13	0,36
24	13	16,63	19,93	11,96	12,97	14,2	2,46	0,39
25	8,37	10,93	11,2	15,36	16,83	18,16	1,6	0,32
26	10,9	14,93	16,3	14,75	15,32	16,55	2,16	0,41
27	6,57	8,6	9,83	15,48	18,34	19,19	1,53	0,25
28	7,83	10,1	11,2	14,84	16,43	17,68	1,57	0,26
29	11,2	13,8	13,7	13,44	14,76	16,06	1,52	0,3
30	10,77	13,2	13,67	13,25	13,92	14,5	1,54	0,27
Valor p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0148

Tabla 4.3. Media y desvío estándar por pool de procedencia de las 30 FMH para los caracteres Número de macollos, Altura, Peso fresco aéreo y Peso seco aéreo en cada uno de los tratamientos hídricos y momentos de evaluación.

		Pool 1	Pool 2	Pool 3		
Nmac	Control	T1	8,51±2,66	9,69±3,28	10,27±2,95	
		T2	11,67±3,49	13,25±4,28	14,10±3,97	
		TF	13,90±4,02	15,61±5,12	16,19±4,90	
	Sequía	T1	8,37±2,70	9,73±2,82	10,43±2,88	
		T2	10,55±3,49	12,28±3,37	12,73±3,40	
		TF	10,24±3,47	11,98±3,48	12,61±3,90	
	Alt (cm)	Control	T1	13,63±2,31	12,53±2,18	13,94±2,47
			T2	15,33±3,23	14,50±2,97	15,93±3,27
			TF	17,19±3,19	15,92±2,90	16,97±3,37
Sequía		T1	14,15±2,58	12,72±2,25	13,82±2,70	
		T2	15,39±2,99	14,37±2,66	14,41±3,01	
		TF	16,74±3,79	14,95±2,56	15,43±2,97	
PFA (g)	Control	2,29±0,63	2,17±0,69	2,67±1,04		
	Sequía	0,85±0,27	0,80±0,25	0,83±0,27		
PSA (g)	Control	0,31±0,10	0,30±0,10	0,36±0,16		
	Sequía	0,25±0,09	0,25±0,07	0,27±0,09		

Número de macollos

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa ($<0,0001$) para el número de macollos evaluado en los tres momentos, lo que estaría demostrando una respuesta diferencial de las FMH a los tratamientos impuestos (Anexo 4 Tabla 4.1, Figura 4.6). La mayoría de las FMH logró incrementar el número de macollos en el tiempo en la condición control. Sin embargo, en el primer conteo no difirieron en el número de macollos en ambos tratamientos; y tampoco aumentaron la producción de macollos entre el segundo conteo y el final en la condición sequía.

La Figura 4.6 representa la evolución del número de macollos en el tiempo para los diferentes tratamientos hídricos en los tres pools de policruzamiento. En el tiempo 1 el número de macollos fue similar para las condiciones control y sequía, sin embargo, en los tiempos 2 y 3, el número de macollos fue mayor en el tratamiento control que en el tratamiento sequía, independientemente del pool de procedencia (Tabla 4.3). En cuanto a las familias, se observó que en el tratamiento sequía las FMH de mejor comportamiento para el primer conteo fueron FMH 18 y 17 provenientes del pool 2 y las FMH 22 y 24 provenientes del pool 3; para el segundo conteo fueron FMH 9 (pool1), 18 (pool2) y 21, 22, 24, 26 (pool 3) y para el conteo final fueron FMH 9

(pool1), 13 y 18 (pool 2) y 21, 24, 26 (pool 3). Por otro lado, las FMH de peor comportamiento para el primer conteo fueron FMH 2 (pool 1), 14 (pool 2) y 20, 27 (pool 3), para el segundo conteo fueron FMH 2 y 6 (pool 1), 27 y 28 (pool 3), y para el conteo final fueron las FMH 6, 2 y 10 (pool 1), 15 (pool 2), y 27 y 28 (pool 3) (Figura 4.8, Figura 4.9, Figura 4.10).

Altura de planta

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa ($<0,0001$) para la altura de planta registrada en los tres momentos, lo que estaría demostrando una respuesta diferencial de las FMH a los tratamientos impuestos (Anexo 4 Tabla 4.1, Figura 4.7). La Figura 3.6 representa la evolución de la altura de planta en el tiempo para los diferentes tratamientos hídricos en los tres pooles de policruzamiento. La mayoría de las FMH logró incrementar la altura de planta a través del tiempo. Al observar los pooles de procedencia de las FMH se vio que los pooles 1 y 2 mantuvieron una altura similar en el momento 2, en las dos condiciones hídricas; y en el momento final se redujo en la condición de sequía. En el pool 3 se detectó que tanto para el momento 2 y final, se redujo la altura de planta en el tratamiento de sequía (Tabla 4.3).

En cuanto a las familias, se observó que en el tratamiento sequía las FMH de mejor comportamiento en la primer medición fueron las FMH 2, 9 y 10 (pool 1), 25 y 27 (pool 3), para el segundo registro fueron las FMH 9, 2 y 10 (pool 1) y 27 (pool 3) y para el registro de altura final fueron las FMH 2, 7, 9, 10 (pool 1), 25 y 27 (pool 3). Por otro lado las FMH que menor altura lograron en la primer fecha fueron las FMH 13, 16 y 17 (pool 2) y 24 (pool 3), para la segunda fecha fueron las FMH 11, 12, 13 y 17 (pool 2) y 24, 21 (pool 3), y para el final fueron las FMH 16 y 17 (pool 2) y 24 (pool 3) (Figura 4.11, Figura 4.12, Figura 4.13).

Peso fresco aéreo (PFA)

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa ($0,0001$) lo que estaría indicando diferentes respuestas de las FMH a los tratamientos impuestos (Anexo 4 Tabla 4.2, Figura 4.14). La totalidad de las FMH alcanzaron mayor PFA en el tratamiento control que en el tratamiento sequía, con una reducción del 65% del peso fresco aéreo en sequía. En el tratamiento control se destacaron las FMH provenientes del pool 3, mientras que en el tratamiento de sequía se destacaron las FMH provenientes del pool 1 (Tabla 4.3). Al observar las FMH, en el tratamiento sequía las FMH 9 (pool 1) y 26 (pool 3) fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 16 (pool 1) y 30 (pool 3) fueron las que menor PFA presentaron.

Peso seco aéreo (PSA)

Se detectó interacción FMH*TRAT significativa (0,0148) (Anexo 4 Tabla 4.2, Figura 4.15). La mayoría de las FMH alcanzaron mayor PSA en el tratamiento control, disminuyendo en promedio un 19% el PSA en el tratamiento sequía. Tanto en el tratamiento control como en el de sequía se destacaron las FMH provenientes del pool 3 (Tabla 4.3). Al observar las FMH, en el tratamiento sequía las FMH 9 (pool 1) y 22, 25 y 26 (pool 3) fueron las de mejor comportamiento, mientras que las FMH 1, 2 (pool 1), 16 (pool 2) y 27 y 28 (pool 3) fueron las que menor PSA presentaron.

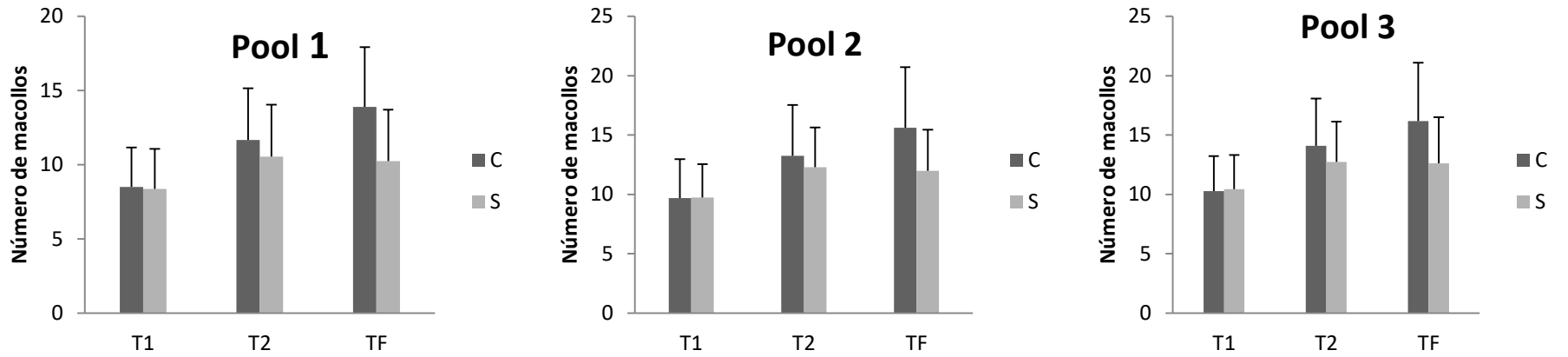


Figura 4.6. Número de macollos promedio para las 10 FMH pertenecientes a cada pool, en los dos tratamientos y en tres momentos. Las barras indican medias y error estándar.

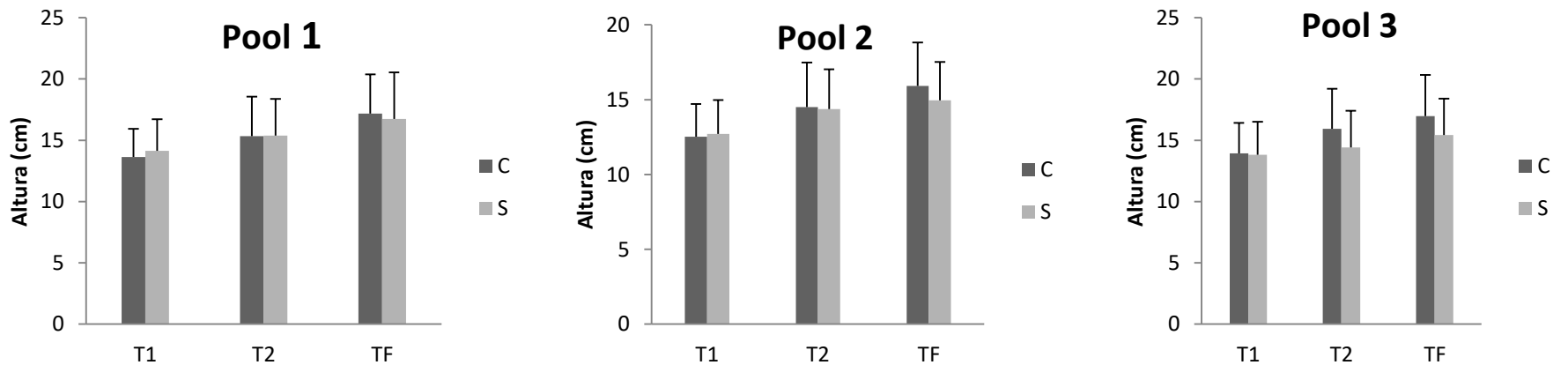


Figura 4.7. Altura de planta promedio para las 10 FMH pertenecientes a cada pool, en los dos tratamientos y en tres momentos. Las barras indican medias y error estándar.

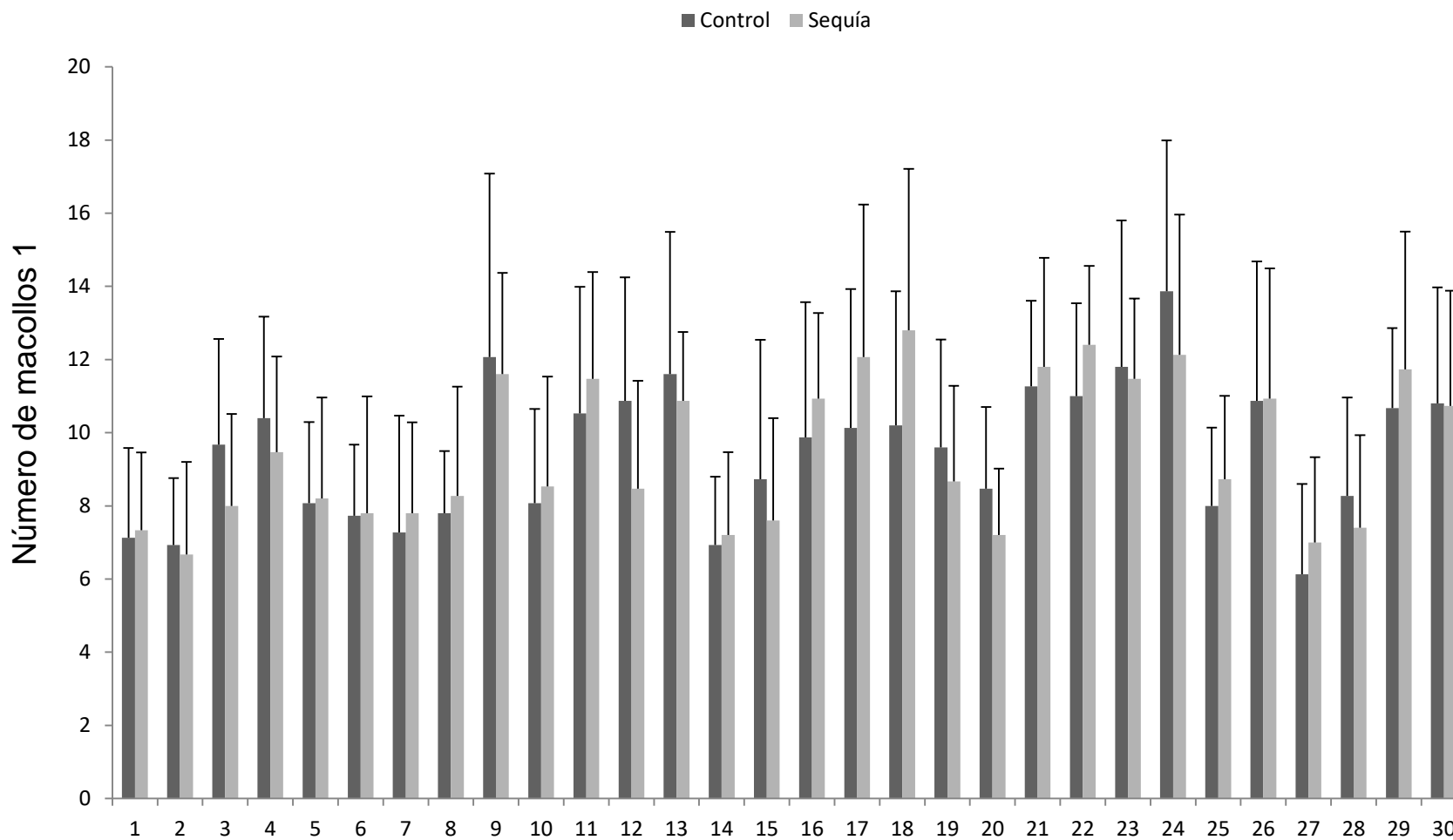


Figura 4.8. Número de macollos 1 de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

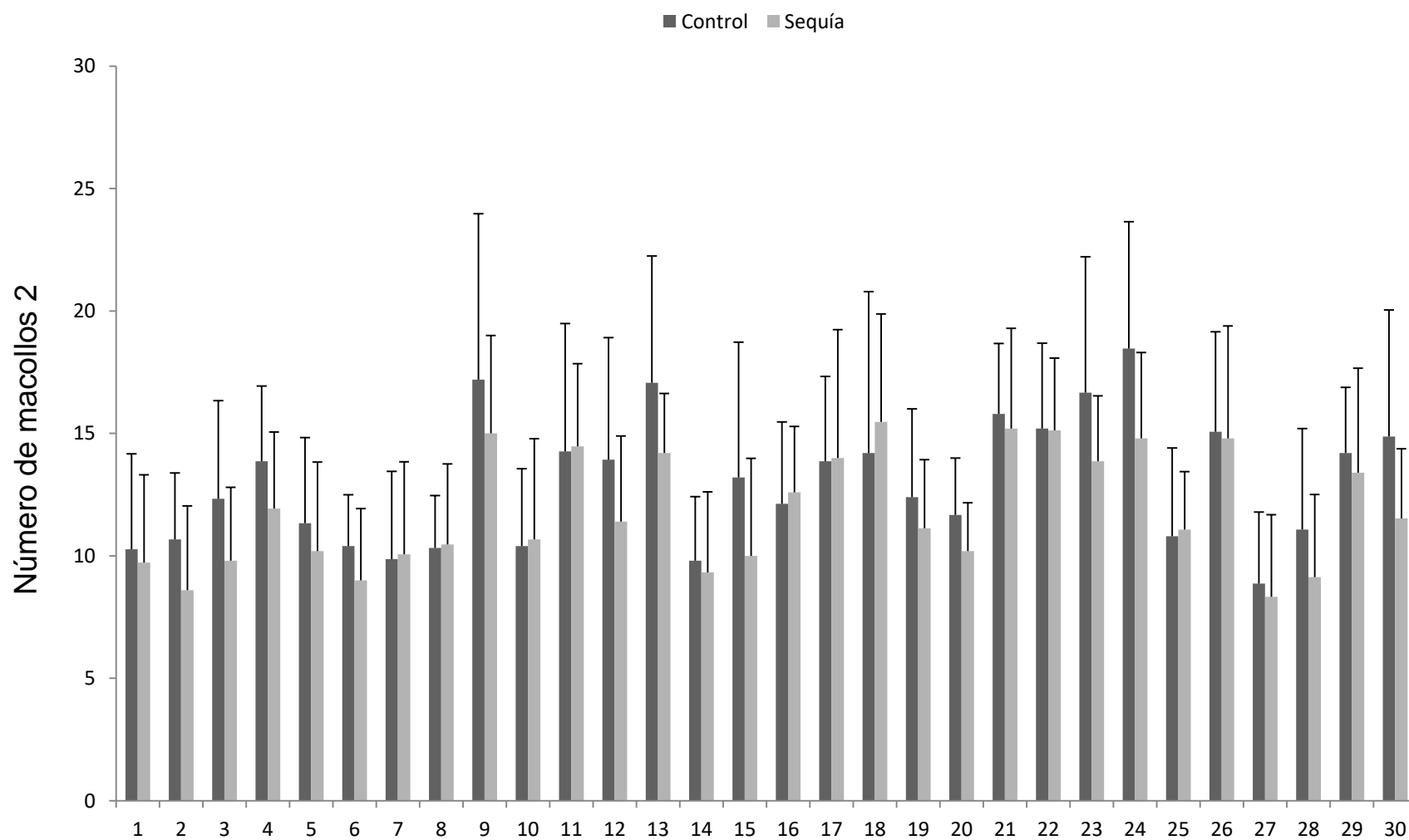


Figura 4.9. Número de macollos 2 de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

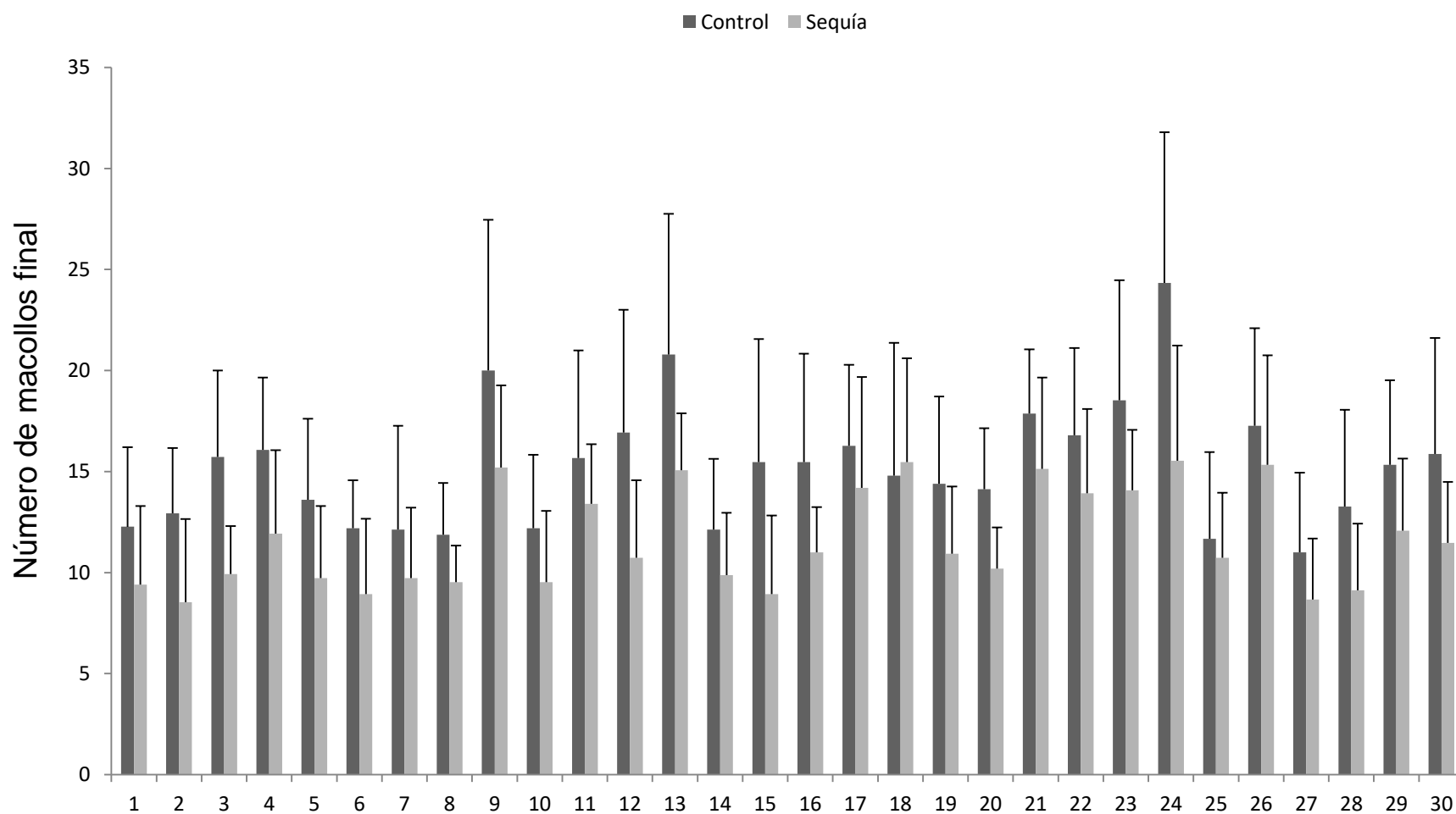


Figura 4.10. Número de macollos final de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

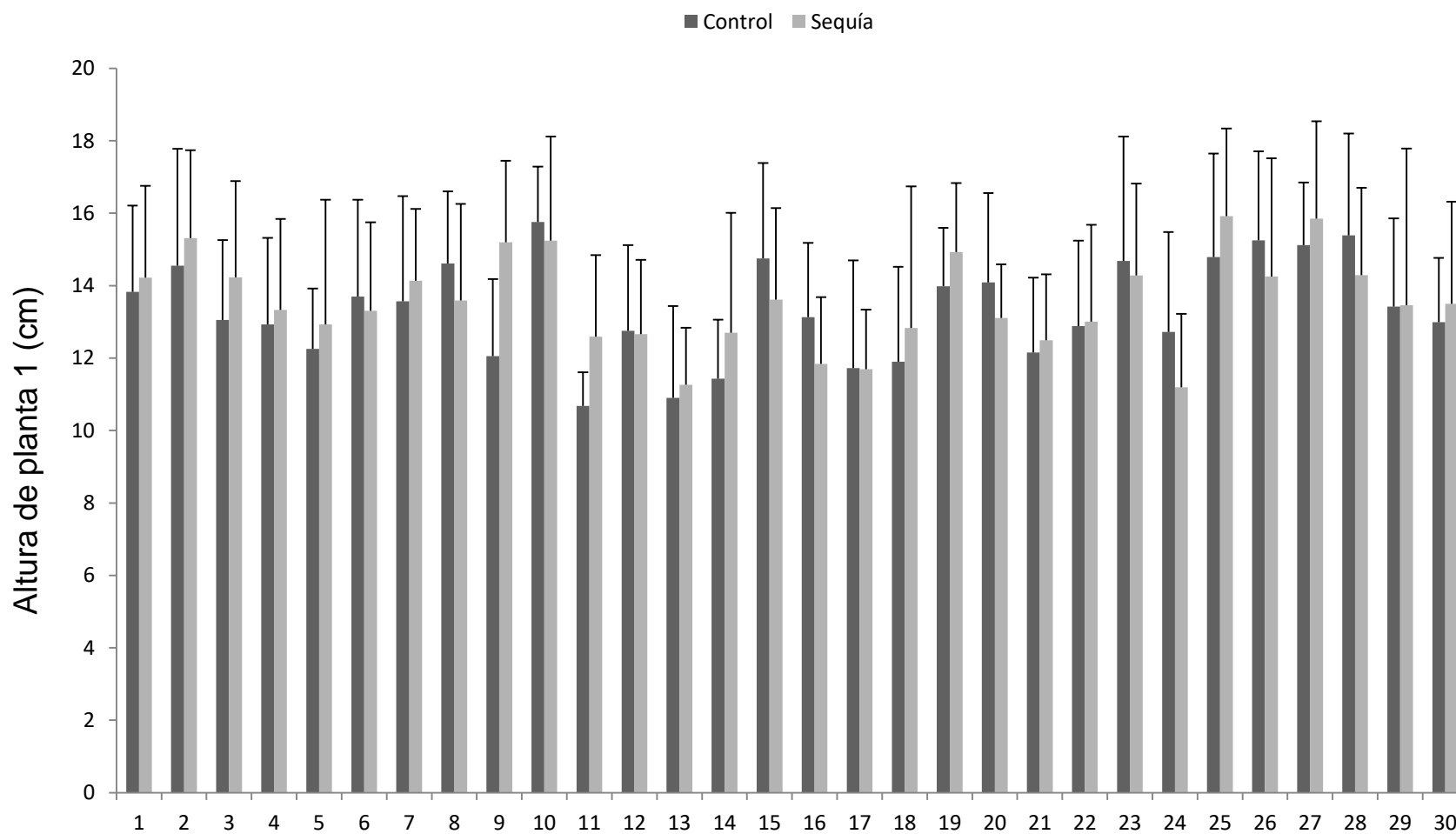


Figura 4.11. Altura de planta 1 de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

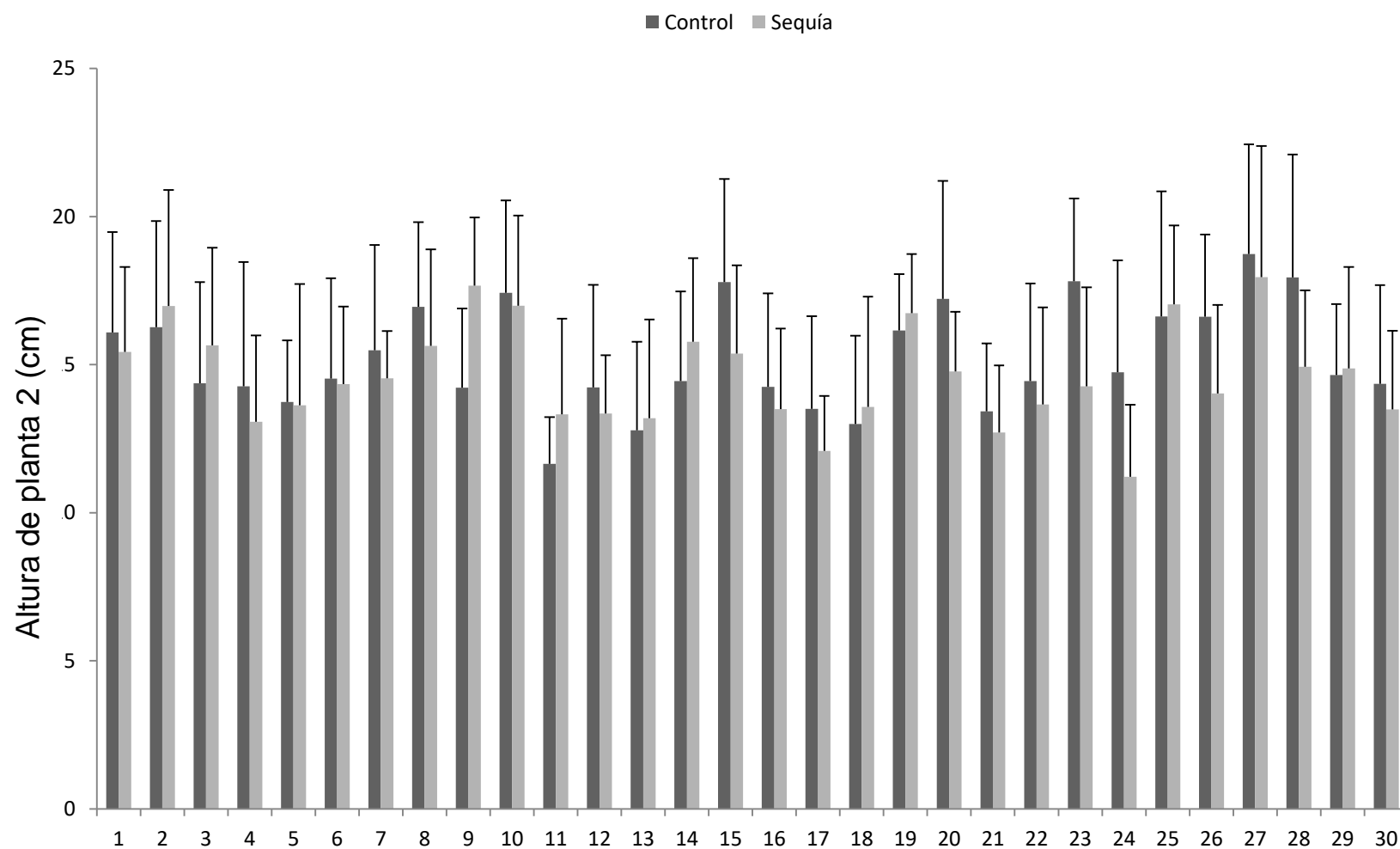


Figura 4.12. Altura de planta 2 de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

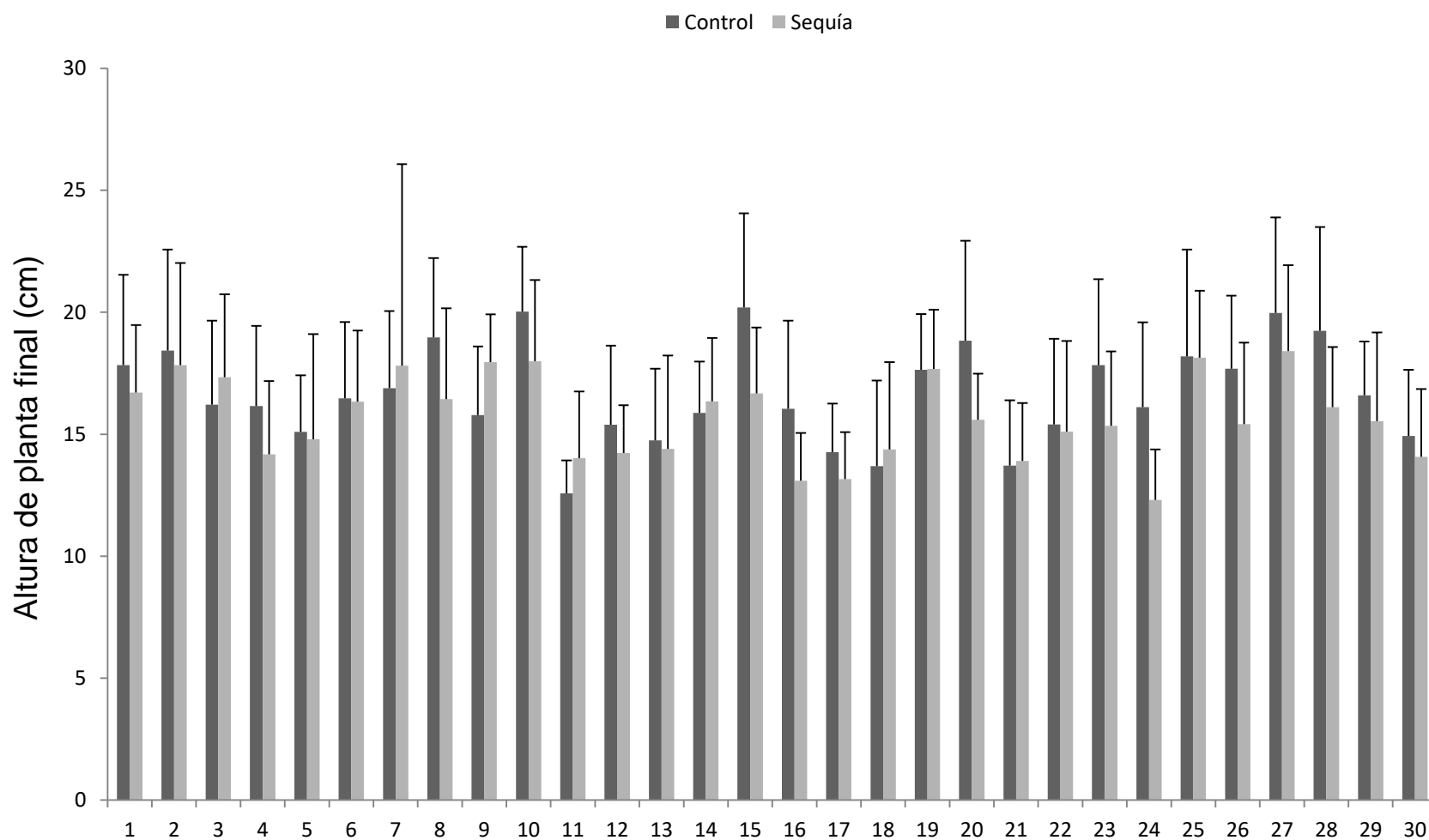


Figura 4.13. Altura de planta final de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

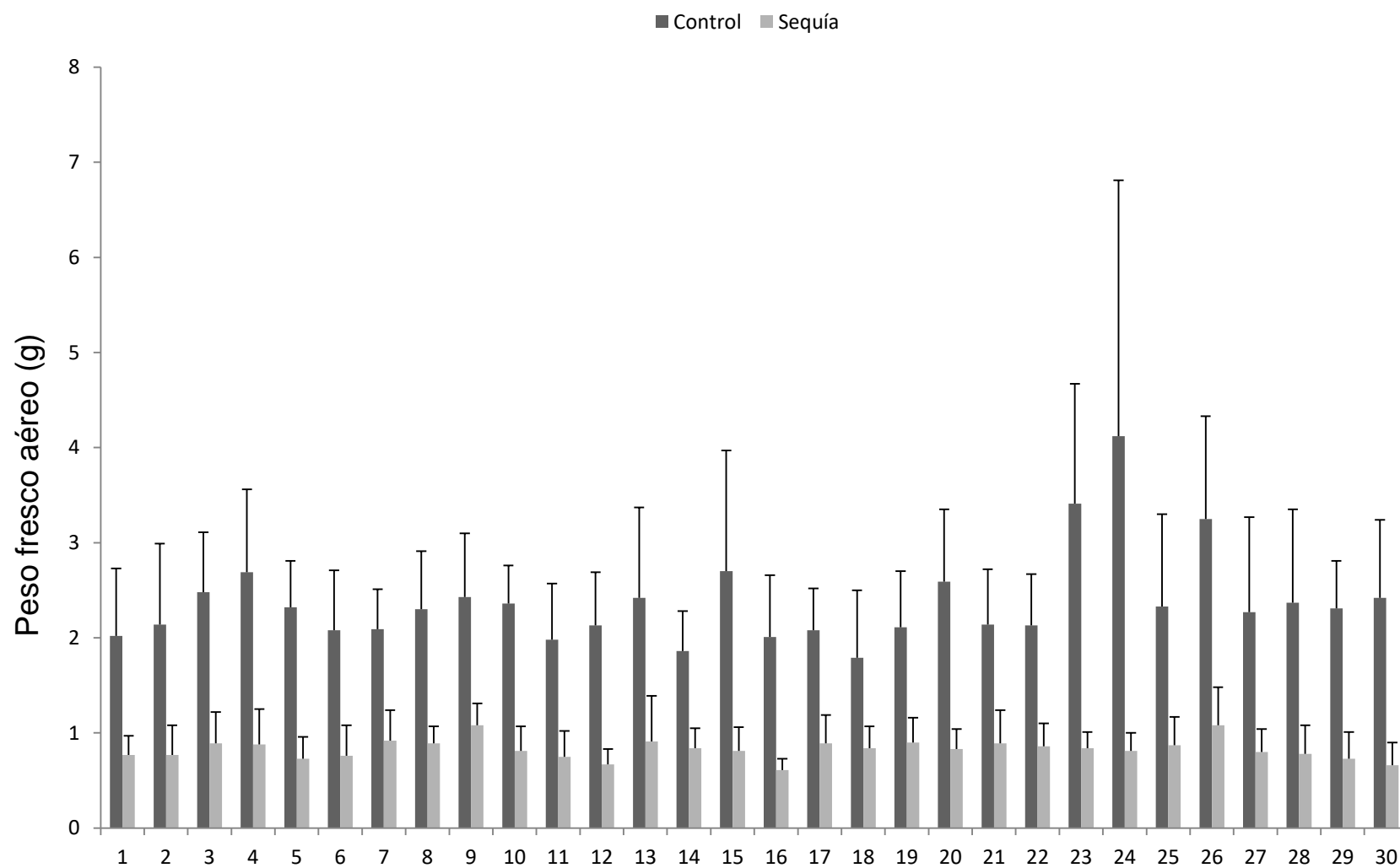


Figura 4.14. Peso fresco aéreo de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

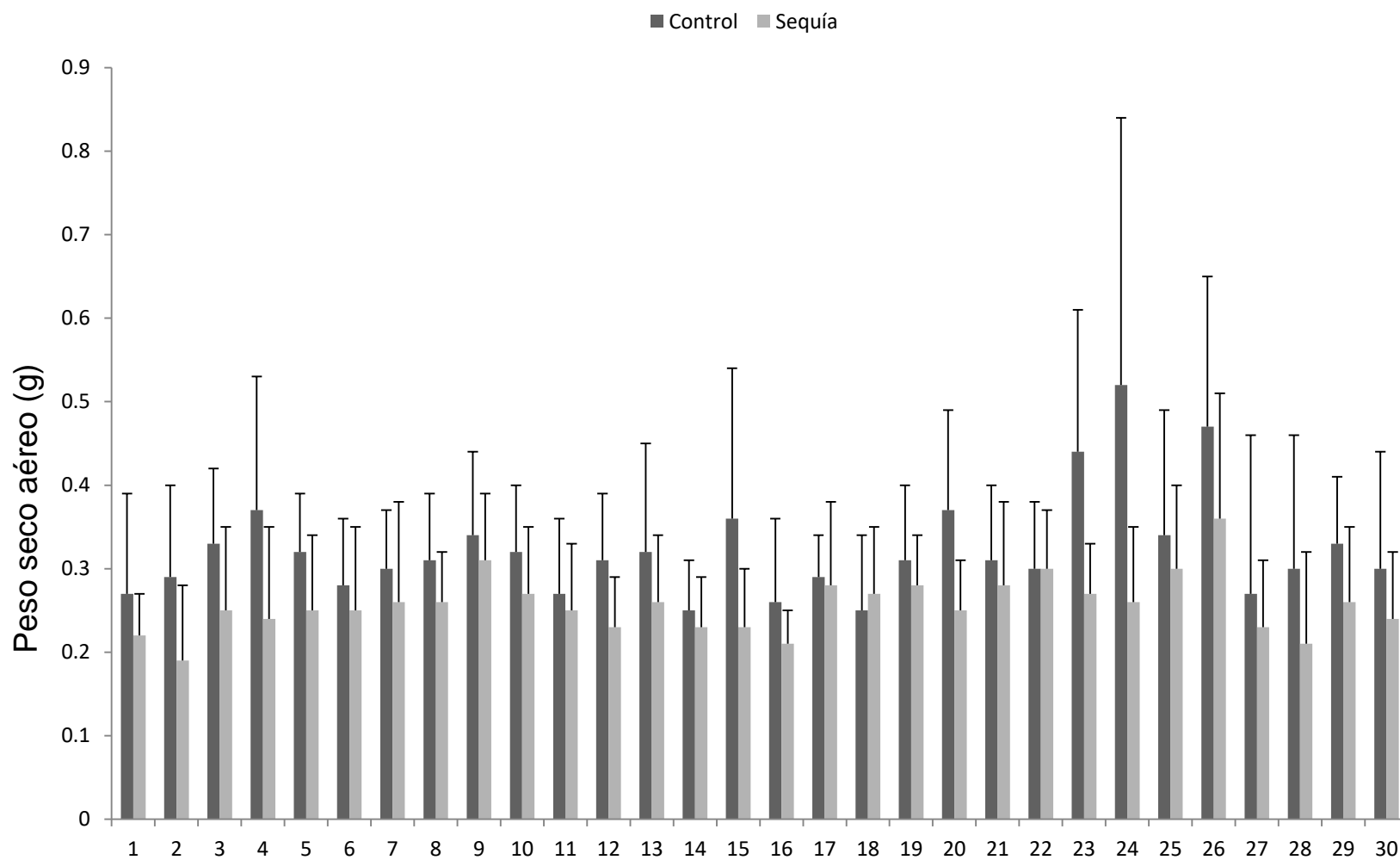


Figura 4.15. Peso seco aéreo de las 30 FMH evaluadas en control y sequía. Las barras indican medias y desvío estándar.

1.2. Correlaciones Fenotípicas

En el tratamiento control se detectó correlación significativa para la mayoría de los caracteres (Tabla 4.4) excepto para los pares de caracteres Nmac2-Alt1, Alt2-Nmac1, Alt2-Nmac2, NmacF-Alt1, NmacF-Alt2, AltF-Nmac2 y AltF-NmacF. Los coeficientes de correlación oscilaron entre -0,13 (Nmac1-Alt1) y 0,95 (PFA-PSA). En el tratamiento sequía se detectó correlación significativa para la mayoría de los caracteres (Tabla 4.5) excepto para Alt1-Nmac1 y NmacF-Alt1. Los coeficientes de correlación oscilaron entre -0,14 (NmacF-AltF) y 0,88 (PFA-PSA).

Tabla 4.4. Coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia para los caracteres evaluados en el tratamiento control. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación entre los caracteres.

	Nmac1	Alt1	Nmac2	Alt2	NmacF	AltF	PFA	PSA
Nmac1	1	**	***	NS	***	***	***	***
Alt1	-0,13	1	NS	***	NS	***	***	***
Nmac2	0,87	-0,10	1	NS	***	NS	***	***
Alt2	-0,10	0,80	-0,05	1	NS	***	***	***
NmacF	0,82	-0,08	0,89	-0,04	1	NS	***	***
AltF	-0,15	0,79	-0,10	0,87	-0,08	1	***	***
PFA	0,53	0,37	0,58	0,42	0,65	0,41	1	***
PSA	0,51	0,34	0,56	0,37	0,62	0,38	0,95	1

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

Tabla 4.5. Coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia para los caracteres evaluados en el tratamiento sequía. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación entre los caracteres.

	Nmac1	Alt1	Nmac2	Alt2	NmacF	AltF	PFA	PSA
Nmac1	1	NS	***	***	***	***	***	***
Alt1	-0,13	1	***	***	NS	***	***	***
Nmac2	0,86	-0,18	1	***	***	***	***	***
Alt2	-0,17	0,79	-0,21	1	**	***	***	***
NmacF	0,78	-0,13	0,86	-0,15	1	**	***	***
AltF	-0,16	0,70	-0,19	0,79	-0,14	1	***	***
PFA	0,40	0,33	0,44	0,37	0,56	0,43	1	***
PSA	0,50	0,32	0,51	0,29	0,61	0,37	0,88	1

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

1.3. Correlaciones Genéticas

En el tratamiento Control se detectó correlación significativa para la mayoría de los caracteres (Tabla 4.6) excepto para PFA y PSA con las alturas (Alt1, Alt2 y AltF). Los coeficientes de correlación significativos oscilaron entre -0,64 (Nmac1-AltF) y 0,99 (Nmac1-Nmac2 y Alt2-AltF). En el tratamiento Sequía se detectó correlación significativa para el 71% de los caracteres (Tabla 4.7). Los coeficientes de correlación significativos oscilaron entre -0,73 (Nmac2-AltF) y 0,99 (Nmac1-Nmac2, Nmac2-NmacF y Alt2-AltF).

Tabla 4.6. Correlaciones genéticas y nivel de significancia para los caracteres evaluados en el tratamiento Control. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación genética entre los caracteres.

	Nmac1	Alt1	Nmac2	Alt2	NmacF	AltF	PFA	PSA
Nmac1		**	***	***	***	***	**	**
Alt1	-0,52		**	***	**	***	NS	NS
Nmac2	0,99	-0,54		**	***	***	**	**
Alt2	-0,58	0,97	-0,56		**	***	NS	NS
NmacF	0,97	-0,54	0,97	-0,51		**	***	***
AltF	-0,64	0,95	-0,62	0,99	-0,54		NS	NS
PFA	0,51	0,23	0,51	0,25	0,61	0,19		***
PSA	0,54	0,26	0,52	0,22	0,59	0,16	0,97	

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

Tabla 4.7. Correlaciones genéticas y nivel de significancia para los caracteres evaluados en el tratamiento Sequía. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas y bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación genética entre los caracteres.

	Nmac1	Alt1	Nmac2	Alt2	NmacF	AltF	PFA	PSA
Nmac1		***	***	***	***	***	NS	***
Alt1	-0,6		**	***	**	***	NS	NS
Nmac2	0,99	-0,56		***	***	***	NS	***
Alt2	-0,69	0,9	-0,64		***	***	NS	NS
NmacF	0,94	-0,56	0,99	-0,66		***	*	***
AltF	-0,8	0,96	-0,73	0,99	-0,71		NS	NS
PFA	0,07	0,2	0,29	0,11	0,41	0,24		***
PSA	0,59	-0,06	0,72	-0,28	0,7	-0,22	0,58	

Nota: valores de significancia *** <0,001, ** <0,005, * <0,05, NS: no significativa.

2. Análisis multivariados

2.1. Análisis de componentes principales

En el tratamiento Control las dos primeras componentes explicaron el 95,3% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 61,7%, mientras que la CP2 explicó el 33,6%. Los caracteres con mayor aporte en la CP1 fueron PFA y PSA, en la CP2 el caracter con mayor peso fue AltF. A través de la CP1 se puede determinar que las FMH 24, 23 y 26 las de mayor crecimiento, mientras que el resto de las FMH tuvieron menor crecimiento (Figura 4.16). En el tratamiento Sequía las dos primeras componentes explicaron el 91,8% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 55,9%, mientras que la CP2 explicó el 35,9%. Los caracteres con mayor aporte en la CP1 fueron PSA y NmacF, en la CP2 el caracter con mayor peso fue AltF. A través de la CP1 se puede determinar que las FMH 9 y 26 fueron las de mayor crecimiento, mientras que el resto de las FMH tuvieron menor crecimiento (Figura 4.17).

Al tener en cuenta los dos tratamientos en forma conjunta se puede observar que las dos primeras componentes explicaron el 75,2% de la variabilidad total. La CP1 explicó el 42,2%, mientras que la CP2 explicó el 33%. Los caracteres con mayor aporte en la CP1 fueron PFA y NmacF, en la CP2 el caracter con mayor peso fue AltF. A través de la CP1 se pueden diferenciar dos grandes grupos, correspondientes cada uno a los tratamientos Control (azul) y Sequía (amarillo). Los puntos (FMH) del tratamiento Control contienen una mayor dispersión, evidenciando así una mayor variabilidad, los puntos del tratamiento Sequía se encuentran más cercanos unos de otros demostrando que la sequía disminuye la variabilidad expresada por las FMH (Figura 4.18).

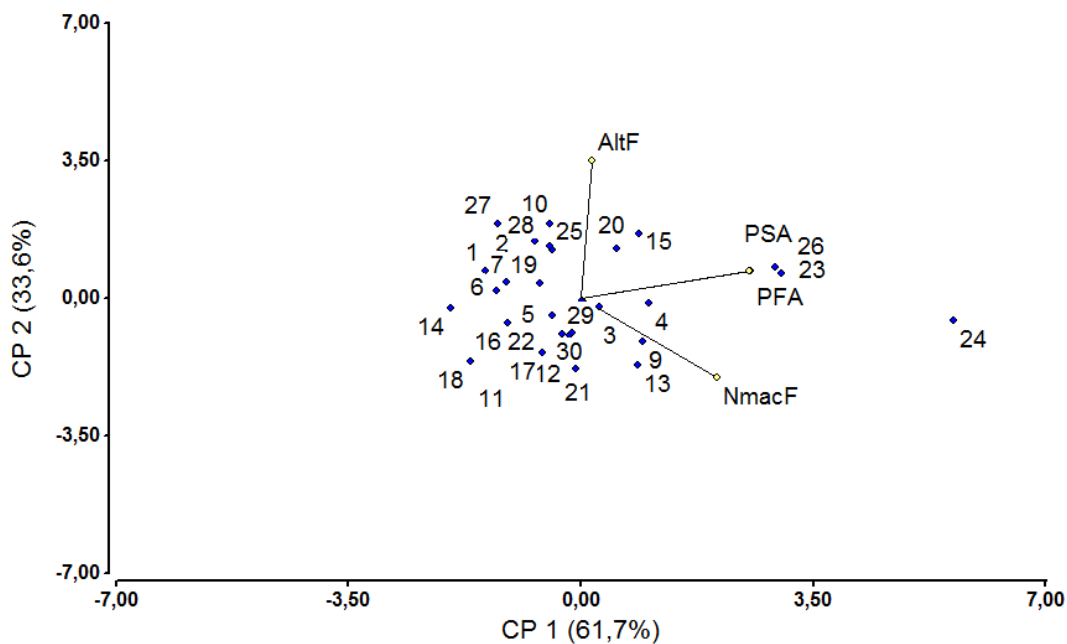


Figura 4.16. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Control.

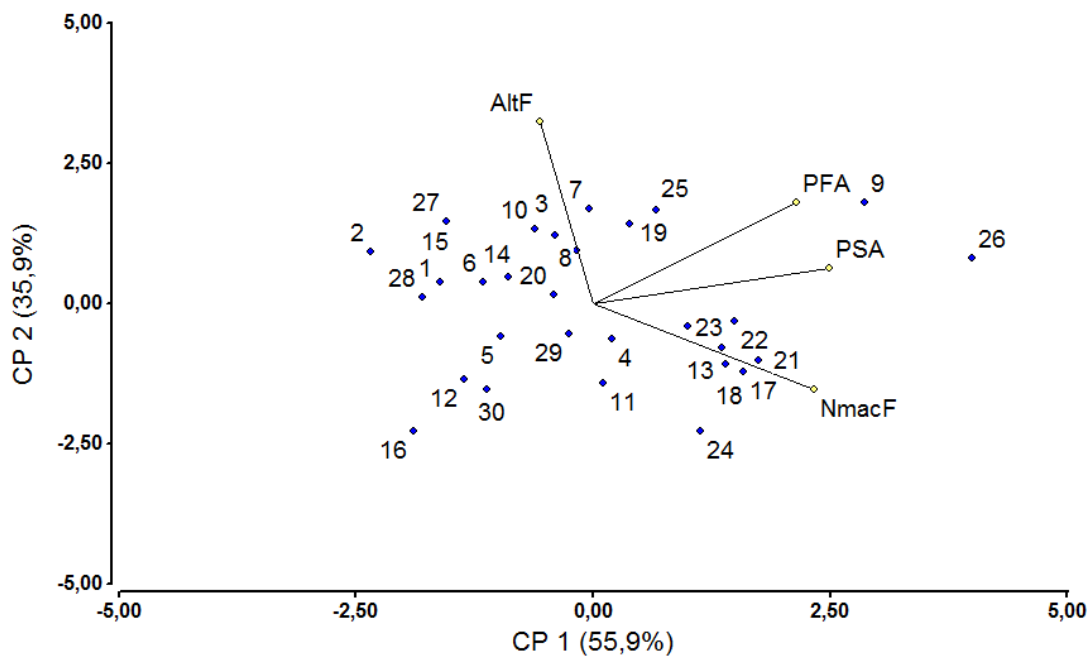


Figura 4.17. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en el tratamiento Sequía.

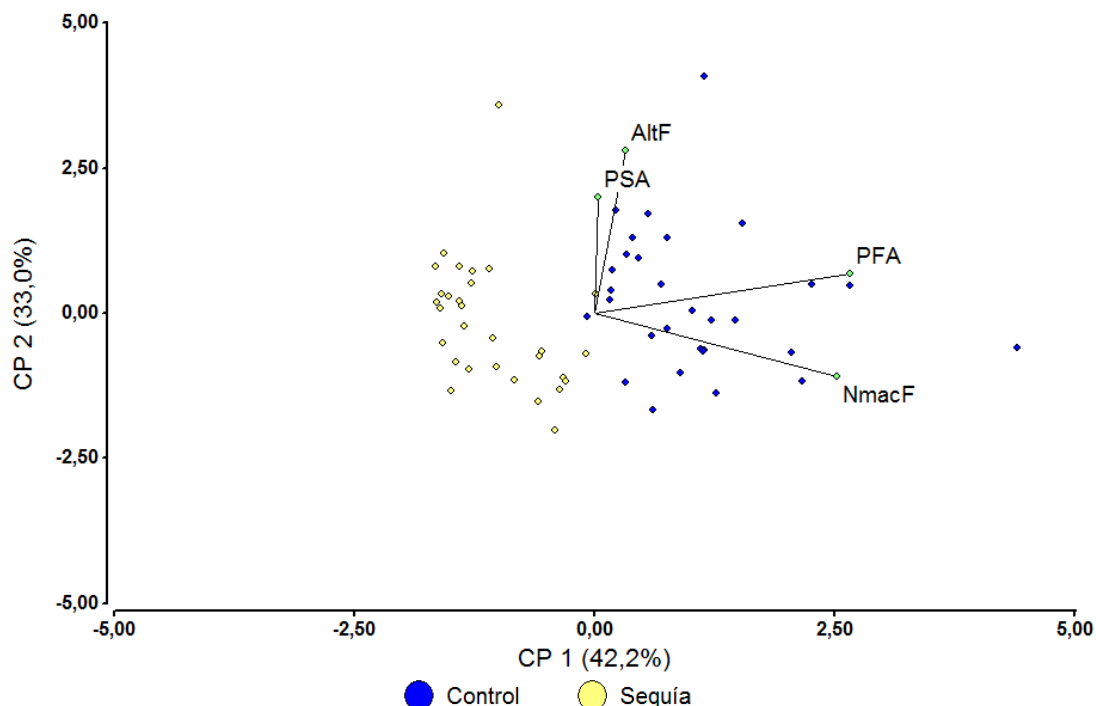


Figura 4.18. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los caracteres morfológicos evaluados en 30 FMH en los tratamiento Control y Sequía.

2.2. Análisis Jerarquizado (Clúster)

En el tratamiento Control se identificaron dos grupos de FMH a una distancia del 75% (Figura 4.19) con una correlación cofenética de 0,809. Un grupo estuvo constituido por las FMH 23, 26 y 24 (pool 3) que en el ACP también se separaron del resto de las FMH por ser las de mayor crecimiento. El segundo grupo estuvo integrado por las FMH restantes, las cuales presentaron un crecimiento menor.

En el tratamiento Sequía también se identificaron dos grupos de FMH a una distancia del 75% (Figura 4.20) con una correlación cofenética de 0,793. El primer grupo estuvo constituido por las FMH 9 (pool 1) y 26 (pool 3) que en el ACP se ubicaron en el sector superior derecho y que por lo tanto tuvieron crecimiento elevado. El segundo grupo estuvo conformado con el resto de las FMH evaluadas, las cuales presentaron un crecimiento menor.

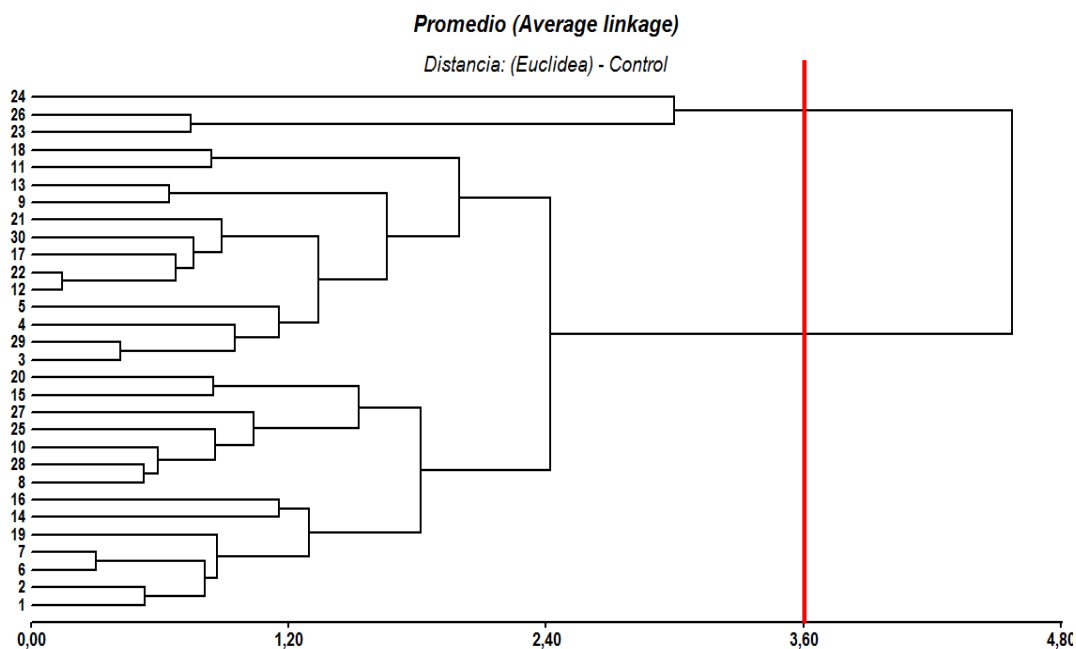


Figura 4.19. Dendrograma obtenido mediante Análisis de Conglomerados con los cuatro caracteres morfológicos evaluados al final del ensayo en 30 FMH en el tratamiento Control.

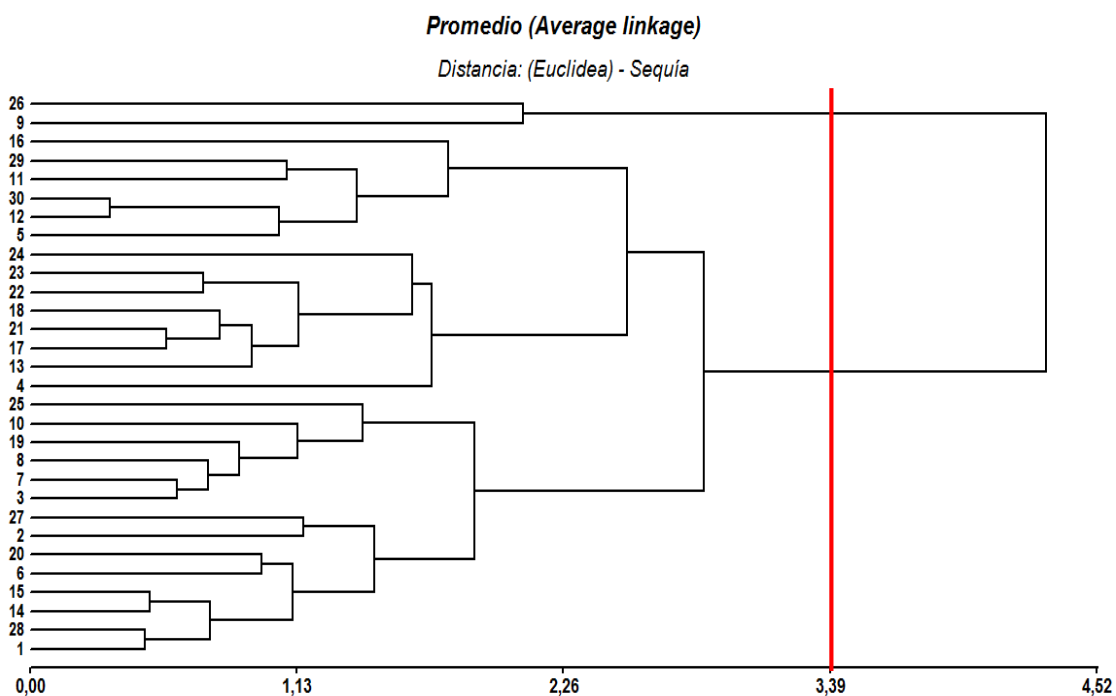


Figura 4.20. Dendrograma obtenido mediante Análisis de Conglomerados con los cuatro caracteres morfológicos evaluados al final del ensayo en 30 FMH en el tratamiento Sequía.

3. Estimación de parámetros genéticos

Las heredabilidades en sentido estricto (h^2) (Nguyen y Sleper, 1983 a) calculadas para todos los caracteres de los tres pools de familias de medio hermanos en condición de sequía y control fueron bajas y similares (Tabla 4.8), con excepción de los valores alcanzados en PSA y PFA. En particular se destacaron los elevados valores obtenidos del PSA en ambas condiciones hídricas.

Tabla 4.8. Heredabilidad en sentido estricto para ocho caracteres morfológicos en tres pools (1, 2, 3) de familias de medio hermanos en los dos tratamientos hídricos (Control - Sequía).

Variable	Tratamiento	heredabilidad		
		Pool 1	Pool 2	Pool 3
Nmac1	C	0,1	0,03	0,14
	S	0,07	0,15	0,12
Nmac2	C	0,06	0,02	0,08
	S	0,05	0,08	0,12
NmacF	C	0,05	0,01	0,07
	S	0,05	0,08	0,08
Alt1	C	0,1	0,18	0,09
	S	0,04	0,06	0,07
Alt2	C	0,04	0,11	0,07
	S	0,06	0,08	0,1
AltF	C	0,06	0,16	0,09
	S	0,01	0,1	0,1
PFA	C	0,22	0,38	0,42
	S	0,78	0,78	0,81
PSA	C	0,88	0,97	0,97
	S	0,97	0,96	0,98

4. Índice de tolerancia

Se calcularon los índices de tolerancia para los caracteres PSA, PFA, AltF y NmacF. En la Tabla 4.9 se muestran las medias de cada índice para las 30 FMH y la media del IT de cada caracter.

Tabla 4.9. Valores de medias para cada índice calculado y media por FMH para las 30 FMH de *Festuca arundinacea* creciendo en condición de Sequía.

FMH	ITNmac	ITAlt	ITPFA	ITPSA
1	0,77	0,93	0,39	0,84
2	0,67	0,97	0,38	0,7
3	0,64	1,1	0,36	0,74
4	0,75	0,88	0,32	0,66
5	0,72	0,99	0,32	0,81
6	0,75	1	0,39	0,89
7	0,81	1,12	0,44	0,86
8	0,81	0,89	0,39	0,83
9	0,77	1,14	0,44	0,91
10	0,78	0,9	0,34	0,84
11	0,87	1,11	0,39	0,97
12	0,64	0,94	0,33	0,76
13	0,73	0,99	0,41	0,84
14	0,83	1,03	0,45	0,95
15	0,61	0,85	0,35	0,73
16	0,75	0,83	0,32	0,92
17	0,87	0,92	0,43	0,96
18	1,04	1,05	0,49	1,19
19	0,77	1,01	0,42	0,91
20	0,72	0,84	0,33	0,68
21	0,86	1,02	0,42	0,92
22	0,82	0,98	0,4	0,99
23	0,76	0,86	0,25	0,62
24	0,65	0,78	0,24	0,57
25	0,94	1,04	0,38	0,91
26	0,91	0,87	0,33	0,73
27	0,82	0,92	0,37	1
28	0,7	0,86	0,35	0,69
29	0,8	0,94	0,32	0,81
30	0,75	0,94	0,28	0,82
Media general	0,78	0,96	0,37	0,83

4.1. Relación entre productividad y tolerancia a la sequía

Debido a que en el mejoramiento genético de especies forrajeras no solo es importante la tolerancia a la sequía, sino que se debe tener en cuenta también la productividad en dichas condiciones, se procedió a realizar dos gráficos de dispersión donde uno de los ejes representa el carácter PFA o PSA respectivamente (en el tratamiento sequía) y el otro eje representa el promedio del ITPFA o ITPSA respectivamente. Las líneas de corte en el eje x e y representan las medias del ITPFA y PFA o ITPSA y PSA, respectivamente, y permiten identificar cuatro cuadrantes.

En el caso del PFA, en el cuadrante superior derecho se encuentran las FMH con mejor comportamiento (9 y 13) ya que presentan una productividad ligeramente superior al promedio y un elevado ITPFA. En el cuadrante inferior derecho se encuentran las FMH que se caracterizan por elevada tolerancia, pero baja productividad. En el cuadrante superior izquierdo se encuentran las FMH que se caracteriza por elevada productividad pero bajo ITPFA. El resto de las FMH se caracterizaron por presentar baja productividad e ITPFA (Figura 4.21).

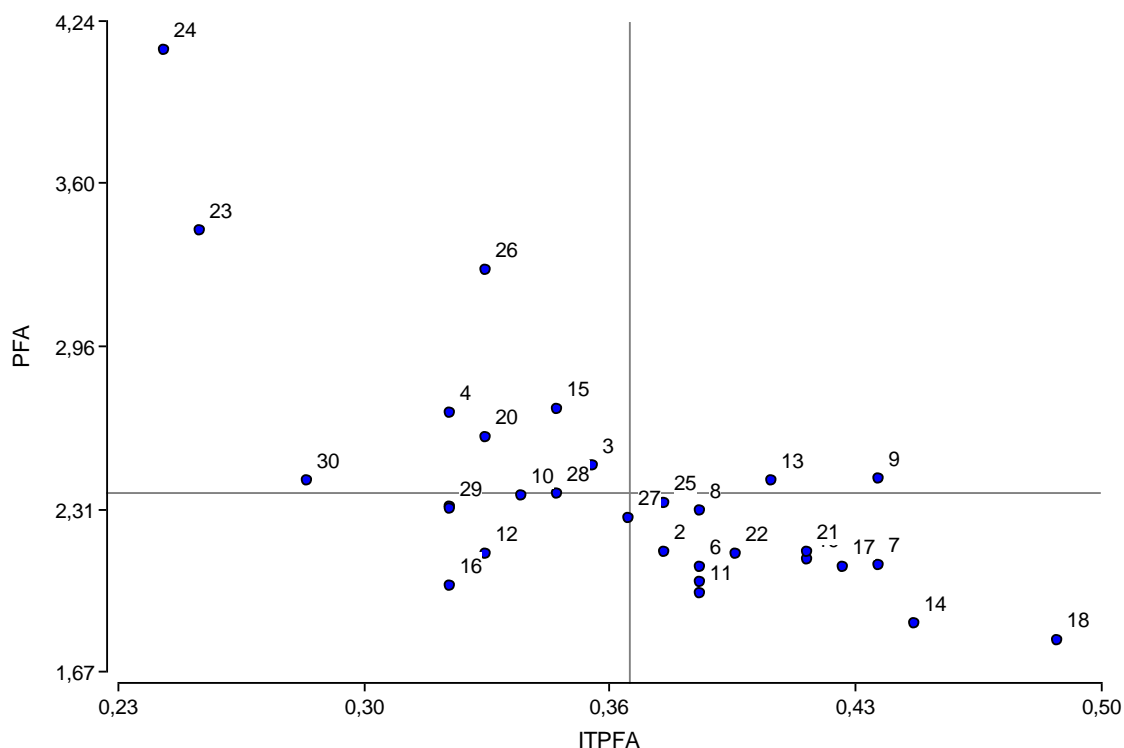


Figura 4.21. Gráfico de dispersión del comportamiento de las 30 FMH según la productividad (PFA) y el ITPFA en el tratamiento sequía.

En el caso del carácter PSA, el gráfico permite distinguir en el cuadrante superior derecho a las FMH con mejor comportamiento (9, 25, 21, 17 y 22) por presentar elevada productividad e ITPSA. En el cuadrante superior izquierdo se encuentra la FMH 26 con elevada productividad pero bajo ITPSA. En el cuadrante inferior derecho se encuentran las FMH que se caracterizan por elevada tolerancia, pero baja productividad. El resto de las FMH se caracterizaron por presentar baja productividad e ITPSA (Figura 4.22).

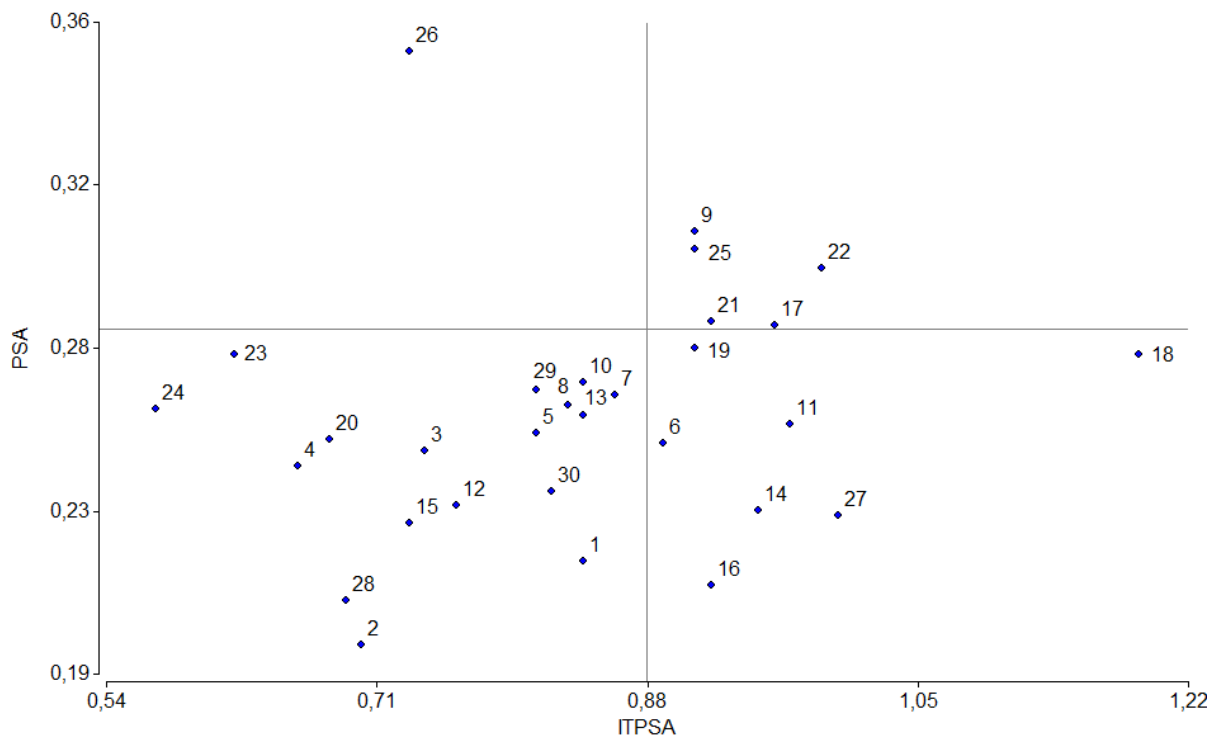


Figura 4.22. Gráfico de dispersión del comportamiento de las 30 FMH según la productividad (PSA) y el ITPSA en el tratamiento sequía.

DISCUSIÓN

La festuca alta es considerada una especie medianamente tolerante a la sequía (Reheul *et al.*, 2012) respecto a otras especies del mismo género; sin embargo, existe escaso desarrollo de cultivares seleccionados por tolerancia a sequía a nivel mundial, y en particular en Argentina. La comprensión de las respuestas genéticas de las plantas sometidas a sequía es de gran importancia y fundamental para la obtención de nuevos cultivares (Reddy *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta la gran diversidad genética de la especie y la importancia de seleccionar genotipos tolerantes, el presente capítulo estudió el comportamiento de 30 familias de medio hermanos ante dos condiciones hídricas, una denominada tratamiento control donde las plantas recibieron riegos periódicos y otra denominada tratamiento sequía donde las plantas solo recibieron un riego a saturación al inicio del ensayo y suspensión total del mismo durante 41 días.

En condición de sequía, las plantas responden con cambios morfológicos y fisiológicos que les permiten disminuir la pérdida de agua y mejorar el consumo. A nivel de genotipo estos cambios se miden a menudo en función de la reducción del rendimiento bajo dicho estrés (Fernandez, 1992; Blum, 2011). Numerosos estudios han indicado que el estrés hídrico afecta la morfología y fisiología de las plantas. Entre los caracteres morfogenéticos más afectados en gramíneas, se menciona la afectación de la expansión y elongación del área foliar, que determina un menor tamaño de hojas; similarmente el estrés hídrico afecta la tasa de macollaje, el número de macollos y produce un aumento del número de hojas muertas por macollo (aumento de la senescencia), como también un acortamiento de entrenudos que afecta la altura de la planta (Colabelli *et al.*, 1998).

En el presente estudio los resultados indicaron una reducción del crecimiento inicial de las plántulas de las 30 FMH de festuca en condición de sequía moderada. La respuesta de las FMH, para el total de las variables analizadas, dependió del tratamiento impuesto, o sea existió una Interacción FMH*TRAT significativa. Esta interacción expresó respuestas genéticas diferenciales de las familias en cada condición hídrica.

El conjunto de efectos del déficit hídrico sobre las variables morfogenéticas medidas en el presente estudio determinó alguna incidencia del estrés en el crecimiento de las plantas. Si bien, no se midió el Índice de área foliar, una reducción del crecimiento podría ser explicado por la menor cantidad de energía lumínica interceptada por las plantas carenciadas en agua en comparación con el tratamiento control. Adicionalmente estos resultados estarían explicados porque el estudio se condujo en un invernáculo sin control de temperatura en meses invernales, donde la evapotranspiración de las plantas se redujo significativamente. En general el contenido

volumétrico del agua promedio por tratamiento mostró escasa diferencia; en el control el contenido volumétrico se mantuvo en un valor constante de 14,6% hasta finalizar el estudio; mientras que en sequía la reducción fue gradual hasta alcanzar un valor de 2,2% a los 41 días. Se observó que el tratamiento de sequía impuesto fue leve, ya que no se registró mortandad de plantas.

En el caso del número de macollos, las FMH no mostraron diferencias significativas entre tratamientos en el primer conteo, probablemente porque la humedad del sustrato en sequía fue suficiente para que continuaran creciendo. En general la producción de macollos entre el segundo conteo y el final en la condición sequía, mostró una reducción del 23,77% respecto al control. Las FMH 9, 13, 18, 21, 24 y 26 fueron las de mayor densidad de macollos en el conteo final, y consideradas las más tolerantes. Esto indica que la sequía no afectó significativamente la variable número de macollos, pero pudo afectar el tamaño de los mismos. Estudios en la especie en condiciones de estrés por defoliación han demostrado que la disminución de la densidad de macollos puede ser compensada por el mayor peso de los mismos (Scheniter, 2005).

Para la altura de planta se detectó interacción FMH*TRAT significativa en los tres momentos. La mayoría de las familias aumentó la altura a lo largo del tiempo, aunque en sequía se registró una disminución leve, del 5,87% respecto del control. La mayor altura registrada en la primera medición en sequía, pudo ser efecto de la humedad del sustrato, al igual que en el número de macollos. Las familias que alcanzaron la mayor altura fueron FMH 2, 9, 10, 25 y 27, y se consideraron como las más tolerantes. Estos resultados son parcialmente compartidos con los de otras investigaciones (Ebrahimiyan *et al.*, 2013) que detectaron leve a nula afectación por sequía en los caracteres número de macollos y altura de la planta en condiciones de campo.

Numerosos investigadores han informado que la producción de forraje se reduce debido al estrés provocado por sequía (Karcher *et al.*, 2007; Ebrahimiyan *et al.*, 2013; Pirnajmedin *et al.*, 2015) en cualquier estado de desarrollo de los cultivos. Esto se debe, entre otros factores, a una disminución de la asimilación neta por las hojas y un aumento de la senescencia foliar (Sarker *et al.*, 1999; Merewitz *et al.*, 2010), en algunos casos mediado por una estrategia propia del genotipo como mecanismo de tolerancia y supervivencia (Karcher *et al.*, 2007).

En el presente estudio, se detectó una elevada correlación fenotípica y genética entre las variables medidas en sequía. La condición de sequía permitió la expresión de mayor variabilidad en la respuesta de los pools y de las familias respecto a la concentración control. Esto se vio reflejado en las elevadas heredabilidades en sentido estricto obtenidas en los Peso fresco y Peso seco aéreo, indistintamente del tratamiento y del pool considerado. Si bien estas variables no mostraron correlación genética significativa, los resultados indicarían que ambas variables

podrían ser de interés para utilizar en un programa de selección por sequía, debido a que expresaron heredabilidades elevadas. Ambas variables registradas al finalizar el estudio fueron indicadores confiables del efecto del estrés sobre las familias estudiadas, evidenciando una reducción promedio del 18,75% del peso seco de los genotipos en condiciones de sequía respecto de la condición control, comparativamente con el resto de los caracteres. Resultados contrastantes en cuanto a las heredabilidades obtenidas para los caracteres Peso fresco y Peso seco aéreo fueron encontrados por Maciel (2018) evaluando FMH de agropiro alargado.

Al nivel familiar, las FMH 9, 22, 25 y 26 fueron consideradas las más tolerantes, al prolongarse la sequía en el tiempo. Resultados similares fueron reportados por otros autores, con una disminución de la biomasa aérea y en algunos casos de la biomasa radicular (Rucker *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2006; Manivannan *et al.*, 2007). Pirnajmedin *et al.* (2015) evaluaron en condición de campo 25 genotipos de festuca alta bajo dos condiciones de sequía denominadas leve e intensa, y detectaron que el estrés por sequía leve produjo una reducción del 15,56% del peso seco aéreo y el de sequía intensa una reducción del 50,31% respectivamente, permitiendo ambos tratamientos diferenciar los genotipos tolerantes de los susceptibles.

Generalmente la identificación de los genotipos tolerantes se realiza a través de índices de selección en función del rendimiento en condiciones de estrés y sin estrés (Ebrahimiyan *et al.*, 2012). En este trabajo, el índice de tolerancia del peso seco aéreo (ITPSA) en condición de sequía permitió discriminar las FMH en tolerantes y susceptibles a través de la menor o mayor reducción del crecimiento con respecto al control. Coincidente con los resultados expresados anteriormente, las familias 9, 17, 21, 22 y 25 fueron las que presentaron mayor tolerancia y productividad. La FMH 18 fue la que presentó mayor índice de tolerancia, pero su productividad fue menor al promedio de todas las familias. La familia 26 fue de tolerancia intermedia a baja pero con una gran producción de forraje.

Los resultados obtenidos permitirían seleccionar familias de medio hermanos de festuca para ser incorporados a programas de mejoramiento genético considerando la tolerancia a sequía. En tal caso, las FMH promisorias serían las 9 y 13 teniendo en cuenta su productividad media y elevado ITPFA; como así también, las FMH 9, 25, 21, 17 y 22 que se destacaron por presentar elevada productividad e ITPSA. Indiscutiblemente, teniendo en cuenta ambas variables, la FMH 9 sería la indicada para incorporar en un plan de mejora para obtención de cultivares con elevada tolerancia. Por otro lado, el carácter a seleccionar, en función de los resultados obtenidos, sería el peso seco por planta debido a su elevada heredabilidad en sentido estricto, muy factible de seleccionar, en las condiciones de evaluación utilizadas.

Esta información es preliminar y probablemente debieran considerarse mayor cantidad de

variables fisiológicas y mayor control de las condiciones experimentales impuestas.

CONCLUSIONES

- El sistema de evaluación y las variables utilizadas, fueron efectivos para detectar variabilidad fenotípica y genética en la tolerancia a sequía en estado de plántula.
- La sequía produjo una reducción significativa del crecimiento inicial respecto de la condición control en la mayoría de las FMH de festuca alta, y esto se manifestó al finalizar el ensayo, sin afectar la sobrevivencia de las mismas.
- La respuesta de las FMH en sequía fue variable, y esto se evidenció en el Índice de Tolerancia (ITPSA). Se destacaron las FMH 9, 17, 21, 22 y 25 como tolerantes y las FMH 10, 12, 23, 24, 28 y 29 como susceptibles a la sequía.
- La heredabilidad en sentido estricto detectada en el material en estudio dependió principalmente del carácter analizado.

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FMH DE FESTUCA ALTA TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES A SALINIDAD Y SEQUÍA

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento de rasgos cuantitativos es uno de los principales objetivos en los programas de mejoramiento genético. Aunque la complejidad genética y la baja heredabilidad de este tipo de caracteres dificultan el proceso de mejoramiento haciendo que se requiera mucho tiempo, especialmente en cultivos perennes (Saha, 2013). Debido a que el estudio de la diversidad genotípica en el germoplasma disponible es fundamental para el mejoramiento de las plantas en respuesta al estrés abiótico (Sharma *et al.*, 2010) la utilización conjunta de marcadores morfológicos y moleculares bajo condiciones de estrés permite la implementación de nuevos métodos de selección (Cravero, 2006).

La Selección Asistida por Marcadores (MAS) requiere un conjunto robusto de marcadores informativos y un fenotipado preciso de los rasgos objetivo en una población, ya que se basa en la selección indirecta de un carácter fenotípico asociado a un marcador molecular (Cravero, 2006). En festuca alta los mapas de asociación genéticos se ven afectados por la complejidad del genoma, la heterocigosidad y el alto nivel de autoincompatibilidad (Xu *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2006). Aun así, el primer mapa genético en la especie fue realizado por Xu *et al.* (1995) utilizando 108 marcadores RFLP. El mapa desarrollado por Saha *et al.* (2005) mejoró significativamente los mapas de ligamiento genético anteriores en festuca alta ya que utilizaron marcadores basados en PCR mejorando la cobertura del genoma y su precisión. Lou *et al.* (2015) detectó la asociación de nueve marcadores moleculares propios de festuca con diferentes caracteres agronómicos. Saha *et al.* (2009) generó miles de EST-SSR específicos de festuca alta en condiciones de estrés abiótico, lo que permitió posteriormente, realizar mapeos de asociación con marcadores moleculares asociados con la tolerancia a sequía (Saha, 2013; Zhao *et al.*, 2007) y salinidad. Amombo *et al.* (2018) evaluaron una población de festuca alta bajo condición de salinidad mediante la evaluación de cinco rasgos fisiológicos y 99 marcadores SSR. Los mismos detectaron asociaciones significativas entre algunos marcadores y los rasgos evaluados.

Aunque los estudios de tolerancia al estrés en festuca alta han sido abordados desde hace mucho tiempo (Spangenberg *et al.*, 1998) se espera que la utilización de las tecnologías de genotipado y fenotipado en condiciones de estrés aporten al mejoramiento genético de la especie (Saha, 2013). Este trabajo propone estudiar la variabilidad molecular en FMH de festuca alta seleccionadas por tolerancia o susceptibilidad bajo condiciones de estrés por salinidad o sequía.

Hipótesis

- Es posible asociar variaciones genéticas de los marcadores moleculares con expresión fenotípica de caracteres de tolerancia y susceptibilidad a estreses provocados por salinidad y sequía.

Objetivos

- Caracterización molecular de FMH seleccionadas por tolerancia o susceptibilidad a salinidad o sequía.
- Análisis y asociación de las diferencias genéticas de las FMH bajo condiciones de estrés por salinidad o sequía.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. El germoplasma estudiado

A partir de los resultados obtenidos en los capítulos 3 y 4 se seleccionaron ocho FMH por ser tolerantes y susceptibles a salinidad y sequía (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Selección de ocho FMH por tolerancia y susceptibilidad a salinidad y sequía.

FMH	Comportamiento	Estrés
15	Tolerante	Salinidad
29		
26	Susceptible	
27		
17	Tolerante	Sequía
22		
23	Susceptible	
24		

2. Extracción, cuantificación y dilución de ADN genómico

La extracción, cuantificación y dilución del ADN se realizó utilizando los mismos métodos que se utilizaron para la caracterización de las poblaciones (Capítulo 2).

3. SSR utilizados

Para la caracterización molecular de las ocho FMH de festuca alta se utilizaron los mismos 15 SSR utilizados para caracterizar a las poblaciones (Capítulo 2) y se agregaron 19 SSR propios de festuca diseñados por la *Samuel Roberts Noble Foundation* (Tabla 5.2) (Saha *et al.*, 2004-2005). En total se utilizaron 34 SSR para caracterizar molecularmente a las ocho FMH seleccionadas por tolerancia y susceptibilidad a salinidad y sequía.

Tabla 5.2. 19 SSR utilizados para caracterizar las ocho FMH de festuca alta seleccionadas por tolerancia y susceptibilidad a salinidad y sequía, abreviatura, autor, secuencia forward, secuencia reverse, temperatura de melting calculada y temperatura de melting ajustada.

SSR	SSR abreviado	Autor	Secuencia forward	Secuencia reverse	Temperatura calculada (°C)	Temperatura ajustada (°C)
NFA001	a-01	Saha <i>et al.</i> , 2004-2005	CTGCTGCTGCCAAGAAAGT	TAAGGGGAGCGAGCTACACAGA	60	56
NFA012	a-12		TTGCCAGGAAATTTTGCTCT	ATGGTATTGGCAGCAAGAGG	58	54
NFA013	a-13		TCATTGTGTTTCGCTCTCCTG	CCTTCGTCGCCATGGTAG	59	55
NFA017	a-17		GATGGACGAAGGCTTCTTTG	AGCCGAACCTGAACTCAGAC	61	57
NFA020	a-20		GCACGAGGCTCTTTCCTCTA	GGTGCTTGGCCTTCTTCC	60	56
NFA022	a-22		ATGATGTCCGAGGAGGAGAA	CATCATGATCCAGTGCCTTG	60	56
NFA027	a-27		CGAGGTCTCAATCCTCCATT	GACAGAGACGACGACGACAT	61	57
NFA030	a-30		AGTCGGTGGTGAAGCTGAAG	ACAAGTGGGGGCTGGTCA	61	57
NFA035	a-35		TGCTAGCAGGGGTCTAAGGA	CACACGTACCACGTCTCCAT	62	58
NFA036	a-36		AGAGGAAGAGCGAAAGAGCA	CCCTGGTACTCGTGGATGTT	61	57
NFA040	a-40		TCATTGTGTTTCGCTCTCCTG	CCTTCTTTGTCGCCATGGTA	60	56
NFA070	a-70		TCCAGTTCAACTTCCAGCAA	CCCGTATTTTATCCTCGATCTG	61	57
NFA073	a-73		TTCCTTCCTCTTTCCCGAAC	ATGGTCTCCCTCTGCTCGTA	61	57
NFA087	a-87		GATCTTGCTCCACTCGATCTG	GCTCCAGTCATCTGAAATCTCC	65	61
NFA088	a-88		ATTTAGAATGGAGACGCAGGAG	TAGTGTCTCTGTTGGGGATGTG	65	61
NFA090	a-90		CCGTTTTGTTCTTCCCTTCTC	GCGAGAGAGTTTGGTGAGGATA	64	60
NFA112	a-112		ATCATTTCCGTTTCAGGTCATC	AGGTAGCGACGAGGAGGAAC	63	59
NFA129	a-129		AACCTTGATGGGGCGTAAG	GCCGGAHTAGGAGGATTTTC	60	56
NFA135	a-135		AGAGGGAGATACGTCAAGAGGA	CCGGTGAGTTGATAGTGGAGTC	67	63

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y resolución de los productos de amplificación

Las técnicas utilizadas son las mismas que se detallaron en el Capítulo 2.

4. Análisis estadístico

Los análisis de AMOVA, matriz de distancia genética y análisis multivariados (Coordenadas Principales y Conglomerados) se realizaron de forma similar al Capítulo 2.

4.1. Análisis de regresión lineal

Se calcularon las frecuencias alélicas en cada una de las FMH y se procedió a pre-seleccionar aquellos alelos que presentaron diferencias en las frecuencias en los grupos tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía. El criterio aplicado fue que las diferencias en frecuencias absolutas debía ser de al menos 4 veces entre FMH que exhibieran ITPSA (índice de tolerancia del peso seco aéreo) extremos en ambos estreses. Se realizaron regresiones lineales de los ITPSA calculados bajo condición de salinidad o sequía de las ocho FMH sobre la frecuencia de los alelos pre seleccionados en cada FMH. Las pendientes de las rectas significativamente distintas de cero indicaron los alelos que se asociaron con la tolerancia o susceptibilidad a salinidad o sequía.

4.2. Análisis de componentes principales

La información de los alelos seleccionados a partir de las regresiones lineales y los índices de tolerancia a salinidad y sequía se condensó en un Análisis de Componentes Principales con el paquete estadístico InfoStat/P.

RESULTADOS

1. Extracción y cuantificación de ADN genómico

El protocolo utilizado permitió obtener ADN en cantidad y calidad suficiente. En la Figura 5.1 se observa la cuantificación de ADN de 24 individuos. Las concentraciones de ADN obtenidas en las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía oscilaron entre 20-400 ng/ μ l por individuo.



Figura 5.1. Cuantificación de ADN de 24 individuos. T1: 1 μ l ADN testigo [30 ng/ μ l]; T2: 1 μ l ADN testigo [100 ng/ μ l]; T3: 1 μ l ADN testigo [250 ng/ μ l].

2. Amplificación del ADN genómico y selección de SSR informativos

De los 34 SSR utilizados para la caracterización molecular de las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía, 30 SSR presentaron productos de amplificación. Los SSR NFA002, LPSSRK10H05, NFA020 y NFA070 no presentaron productos de amplificación, o su amplificación fue difusa. En la Figura 5.2 se observan los distintos patrones de bandas de algunos de los SSR utilizados.

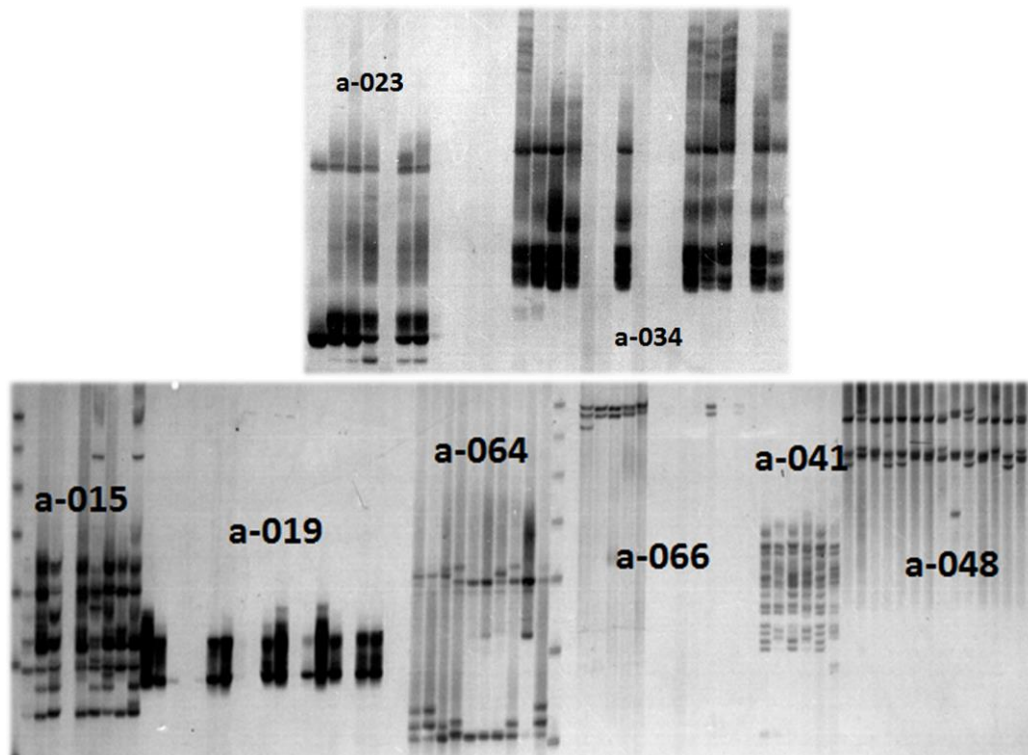


Figura 5.2. Patrones de bandas de los SSR NFFa023, NFFa034, NFFa015, NFFa019, NFFa064, NFFa066, NFFa041 y NFFa048 en geles de poliacrilamida al 6%.

3. Análisis y cuantificación de la variabilidad genética

Los 30 marcadores SSR que presentaron productos de amplificación de buena calidad mostraron un total de 251 alelos (bandas) en las ocho FMH estudiadas. Se detectó una variación de entre 4 y 17 alelos por locus. Los SSR NFFa017 y NFFa087 presentaron cuatro alelos, siendo los menos polimórficos. El SSR NFFa040, con 17 alelos, fue el que mayor número de alelos presentó (Tabla 5.3).

El índice de contenido de información polimórfica (PIC) varió entre 0,200 y 0,373 (Tabla 5.3). Los SSR más informativos y con mayor capacidad discriminante entre las FMH fueron NFFa041, LPSSRK02E08, NFFa030 y NFFa129, mientras que el de menor poder discriminante fue el NFFa090.

Tabla 5.3. Número de bandas totales y contenido de información del polimorfismo (PIC) de los 30 SSR utilizados en la caracterización molecular de las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía.

SSR	N° bandas totales	PIC
a-01	6	0,325
a-12	9	0,310
a-13	8	0,245
a-15	10	0,352
a-17	4	0,354
a-19	9	0,347
a-22	7	0,342
a-23	11	0,355
a-24	5	0,317
a-27	13	0,252
a-30	5	0,370
a-31	13	0,339
a-34	6	0,344
a-35	5	0,325
a-36	6	0,367
a-40	17	0,216
a-41	11	0,373
a-48	9	0,342
a-58	10	0,263
a-64	15	0,333
a-66	9	0,273
a-73	6	0,340
a-87	4	0,368
a-88	9	0,342
a-90	7	0,200
a-112	10	0,352
a-129	6	0,370
a-135	5	0,336
B03	9	0,299
E08	7	0,371
total	251	

3.1. Análisis de la variancia molecular (AMOVA)

El AMOVA demostró la existencia de variabilidad genética entre y dentro de las FMH evaluadas ($p < 0,05$). Además detectó que un 98,56% de la variación genética se encuentra dentro de las FMH y el 1,44% restante se encuentra entre las FMH (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Análisis de la variancia molecular entre y dentro de las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía.

F.V.	SC	gl	CM	p-valor	Iter	Var. estimada	% Var. estimada
FMH	0,06	7	0,01	0,0450	400	9,9E ⁻⁰⁵	1,44
Dentro	0,76	112	0,01	0,0450	400	0,01	98,56
Total	0,82	119	0,01			0,01	100

3.2. Matriz de distancia genética

El promedio de los valores de distancias genéticas entre los pares de FMH fue 0,018, con valores extremos de 0,0076 y 0,0347. Los pares de FMH que presentan menor distancia a través de todos los loci son las FMH 24 y 26 y las FMH 26 y 27. Los pares de FMH que presentan mayor distancia son las FMH 15 y 29 y las FMH 17 y 29 (Tabla 5.5)

Tabla 5.5. Distancias genéticas entre las ocho FMH de festuca alta.

	15	17	22	23	24	26	27	29
15	0	0,0157	0,0211	0,0115	0,0289	0,0268	0,0292	0,0347
17		0	0,0152	0,0105	0,0232	0,0215	0,0204	0,0342
22			0	0,0126	0,0185	0,0146	0,0234	0,0262
23				0	0,015	0,0105	0,0101	0,0223
24					0	0,0076	0,0131	0,0151
26						0	0,0077	0,0121
27							0	0,014
29								0

3.3. Análisis de Coordenadas Principales (AcoorP)

El AcoorP muestra que las dos primeras CP explican el 45,2% de la variación molecular total de las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía, mientras que con la tercera CP se explica un 61% de la variabilidad total (Tabla 5.6).

La primera coordenada explico el 24,8%, separando a las ocho FMH en tres grupos, uno conformado con las FMH 26, 27 y 29, el segundo grupo se conformó con la FMH 24 y el tercer grupo estuvo formado por las FMH 15, 17, 22 y 23. La segunda coordenada explicó el 20,4% de la variabilidad y separó a las ocho FMH en dos grupos, uno formado por la FMH 24 y el segundo formado por el resto de las FMH (Figura 5.3).

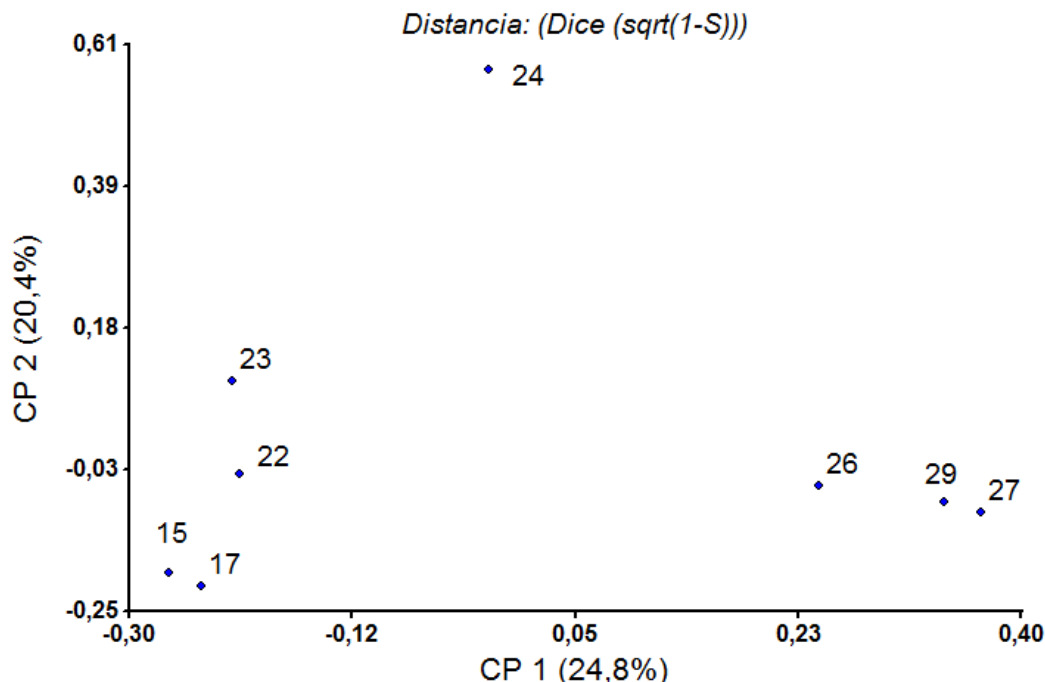


Figura 5.3. Análisis de Coordenadas Principales de las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía basado en la distancia genética de Dice. CP1 y CP2 son la primera y segunda coordenadas principales, respectivamente.

Tabla 5.6. Proporción de la variancia molecular total de las ocho FMH de festuca alta.

Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum
1	0,53	0,25	0,25
2	0,43	0,20	0,45
3	0,34	0,16	0,61
4	0,26	0,12	0,73
5	0,21	0,10	0,83
6	0,21	0,10	0,93
7	0,15	0,07	1,00
7 autovalores no mostrados			

3.4. Análisis de conglomerados

El análisis de Cluster de las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía realizado a través del método UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice, se muestra en el dendrograma de la Figura 5.4 (Correlación cofenética = 0,917). La distancia genética entre las FMH osciló entre 0,60 y 0,86, no observándose agrupamiento de las mismas hasta el 70% de la distancia presentada (0,60).

Si se toma como referencia al 75% de la distancia total se puede observar la formación de seis grupos. El primer grupo formado por las FMH 15 y 17, el segundo grupo se formó con las FMH 22 y 23, y el resto de las FMH formaron grupos independientes.

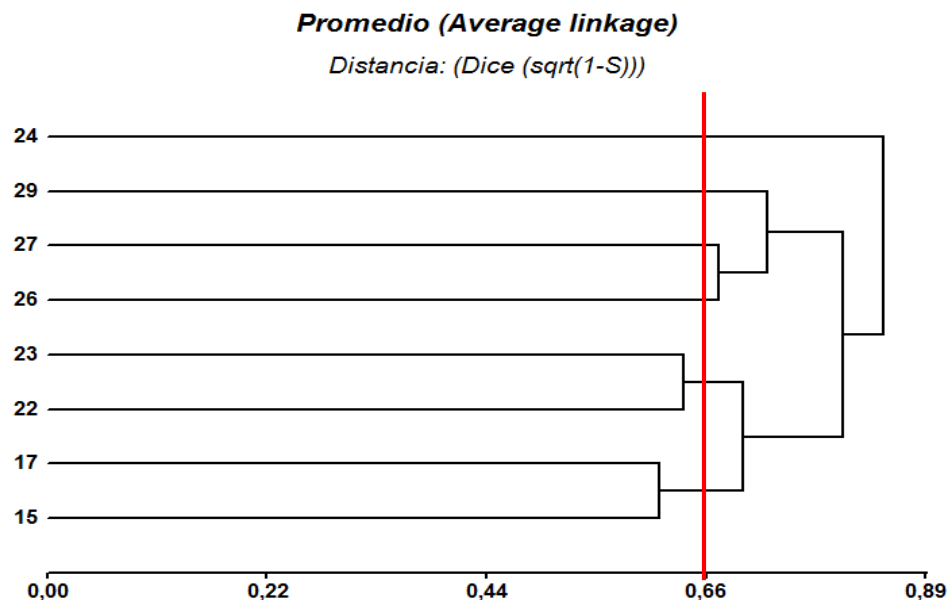


Figura 5.4. Dendrograma de las ocho FMH seleccionadas por ser tolerantes y susceptibles a salinidad o sequía obtenido con 30 SSR, a través del método UPGMA y el coeficiente de similitud de Dice.

4. Análisis de regresión lineal

En base a las diferencias en las frecuencias alélicas entre las FMH tolerantes y susceptibles, se pre-seleccionaron 51 alelos para proseguir con el análisis de regresión de los ITPSA en condición de salinidad y sequía. Los 51 alelos fueron analizados para ambos estreses, considerando como control negativo aquel estrés para el cual el alelo específico no había sido preseleccionado (Tabla 5.7). El análisis de regresión lineal sobre la frecuencia de cada uno de los alelos pre seleccionados permitió detectar que 10 alelos efectivamente estuvieron en estas poblaciones relacionados a la tolerancia o susceptibilidad a la salinidad (13.2, 13.4, 15.6, 31.4, 31.12, 40.1, 58.9, 73.4, B03.3, B03.4) y tres alelos, con relaciona a la tolerancia o susceptibilidad a la sequía (12.6, 19.7, 73.4) ($p < 0,05$). Los alelos que presentaron pendiente negativa (salinidad: 15.6, 31.12; sequía: 19.7, 73.4) estarían asociados a la susceptibilidad al estrés, mientras que el resto de los alelos (pendientes positivas) estarían asociados a la tolerancia del estrés. Se pudo observar que el alelo 73.4 estaría asociado a la tolerancia a la salinidad (pendiente= 0,02) y a la susceptibilidad a la

sequía (pendiente= -0,03).

Tabla 5.7. Coeficiente de determinación, pendiente y valor de probabilidad de las regresiones de los ITPSA en condición de salinidad y sequía sobre la frecuencia de los alelos preseleccionados en las FMH.

ITPSA salinidad				ITPSA sequía			
Alelos	R ²	Pendiente	Valor p*	Alelos	R ²	Pendiente	Valor p*
12.2	0,13	0,02	0,3881	12.2	0,00058	0,0023	0,955
12.3	0,14	0,03	0,3596	12.3	0,004	0,01	0,8824
12.4	0,06	-0,02	0,5696	12.4	0,2	0,05	0,2641
12.6	0,04	0,01	0,6301	12.6	0,67	0,03	0,0125
13.1	0,48	0,05	0,0564	13.1	0,25	-0,05	0,2071
13.2	0,79	0,02	0,0031	13.2	0,09	-0,01	0,4732
13.3	0,17	-0,01	0,3027	13.3	0,36	0,03	0,1184
13.4	0,66	0,05	0,0139	13.4	0,02	-0,01	0,7189
13.5	0,31	0,05	0,1499	13.5	0,14	0,05	0,3551
15.6	0,63	-0,04	0,0192	15.6	0,14	0,03	0,3551
15.7	0,01	-0,0033	0,8359	15.7	0,48	-0,04	0,0575
15.8	0,31	-0,03	0,1536	15.8	0,16	0,04	0,3214
15.9	0,08	0,02	0,5004	15.9	0,27	0,05	0,1917
19.6	0,01	0,0021	0,7875	19.6	0,02	0,0038	0,7506
19.7	0,01	0,01	0,7727	19.7	0,96	-0,09	<0,0001
19.8	0,05	0,01	0,5778	19.8	0,01	0,01	0,8262
22.1	0,02	0,0043	0,7327	22.1	0,28	0,02	0,18
23.3	0,03	0,0031	0,6931	23.3	0,03	0,0049	0,6913
24.5	0,13	-0,01	0,3726	24.5	0,15	-0,02	0,3495
27.4	0,07	-0,02	0,5181	27.4	0,39	-0,07	0,1
31.1	0,46	0,04	0,0641	31.1	0,00018	-0,0013	0,9749
31.4	0,62	0,02	0,0209	31.4	0,01	0,0025	0,8676
31.7	0,27	-0,01	0,1827	31.7	0,00073	0,0012	0,9492
31.12	0,85	-0,02	0,0011	31.12	0,16	0,01	0,3278
34.4	0,16	-0,02	0,3254	34.4	0,33	0,04	0,138
34.6	0,2	-0,05	0,2601	34.6	0,02	-0,03	0,7189
35.2	0,16	-0,03	0,3279	35.2	0,14	-0,04	0,3622
40.1	0,69	0,02	0,011	40.1	0,07	-0,01	0,5147
40.2	0,08	-0,01	0,4919	40.2	0,2	0,03	0,2726
40.3	0,07	-0,01	0,5181	40.3	0,18	0,02	0,2901
40.7	0,16	0,01	0,3255	40.7	0,00061	0,00081	0,9535
40.8	0,13	0,01	0,3785	40.8	0,19	0,02	0,2845
40.11	0,03	-0,01	0,7074	40.11	0,2	0,05	0,2687
41.10	0,02	-0,01	0,7342	41.10	0,31	-0,04	0,1514
48.1	0,02	-0,01	0,7507	48.1	0,06	0,03	0,576
48.5	0,08	0,01	0,4919	48.5	0,000088	0,00069	0,9824
48.6	0,1	-0,02	0,4431	48.6	0,32	0,05	0,1424
58.1	0,24	0,04	0,2212	58.1	0,03	-0,02	0,6844
58.9	0,51	0,06	0,0479	58.9	0,23	0,06	0,2335
58.10	0,16	0,01	0,3269	58.10	0,0011	-0,0019	0,9377
64.14	0,04	0,0042	0,6284	64.14	0,22	0,01	0,2436
66.3	0,13	-0,03	0,3723	66.3	0,06	-0,03	0,5575
73.1	0,23	0,02	0,2287	73.1	0,45	-0,05	0,0675
73.4	0,55	0,02	0,0352	73.4	0,58	-0,03	0,0287
87.1	0,05	0,01	0,6032	87.1	0,02	0,02	0,7303
88.1	0,1	0,01	0,4487	88.1	0,00019	-0,00095	0,9744
112.9	0,02	0,01	0,7639	112.9	0,08	0,02	0,5037
129.6	0,003	0,0014	0,897	129.6	0,19	0,02	0,2734
B03.3	0,51	0,08	0,0472	B03.3	0,19	0,07	0,2866
B03.4	0,55	0,02	0,0358	B03.4	0,0014	0,002	0,9288
E08.7	0,000077	0,00034	0,9835	E08.7	0,15	0,02	0,3408

*Significación al 0,05

5. Análisis de componentes principales

El ACP realizado con el ITPSA en condición de salinidad y las pendientes de los 12 alelos relacionados a la tolerancia o susceptibilidad a los estreses, permite observar que las dos primeras componentes explican el 86,4% de la variabilidad fenotípica en relación a las pendientes de cada alelo (Figura 5.5). La CP1 explica el 61,9% de la variabilidad detectada, mientras que la CP2 explica el 24,5% restante. Las variables con mayor aporte a la CP1 fueron los alelos 13.2 y 40.1, junto con el ITPSA. Las variables con mayor aporte a la CP2 fueron los alelos 19.7 y 12.6. Puede observarse también que con las dos primeras componentes es posible diferenciar a los individuos clasificados como tolerantes (Verde: 15-29) y susceptibles (Rojo: 26-27) a la salinidad.

En cuanto a los alelos, se puede observar que los alelos 40.1 y 13.2 se encuentran altamente asociados al ITPSA. En la dirección contraria se encuentran los alelos 15.6 y 31.12 que estarían asociados a la susceptibilidad en condiciones salinas.

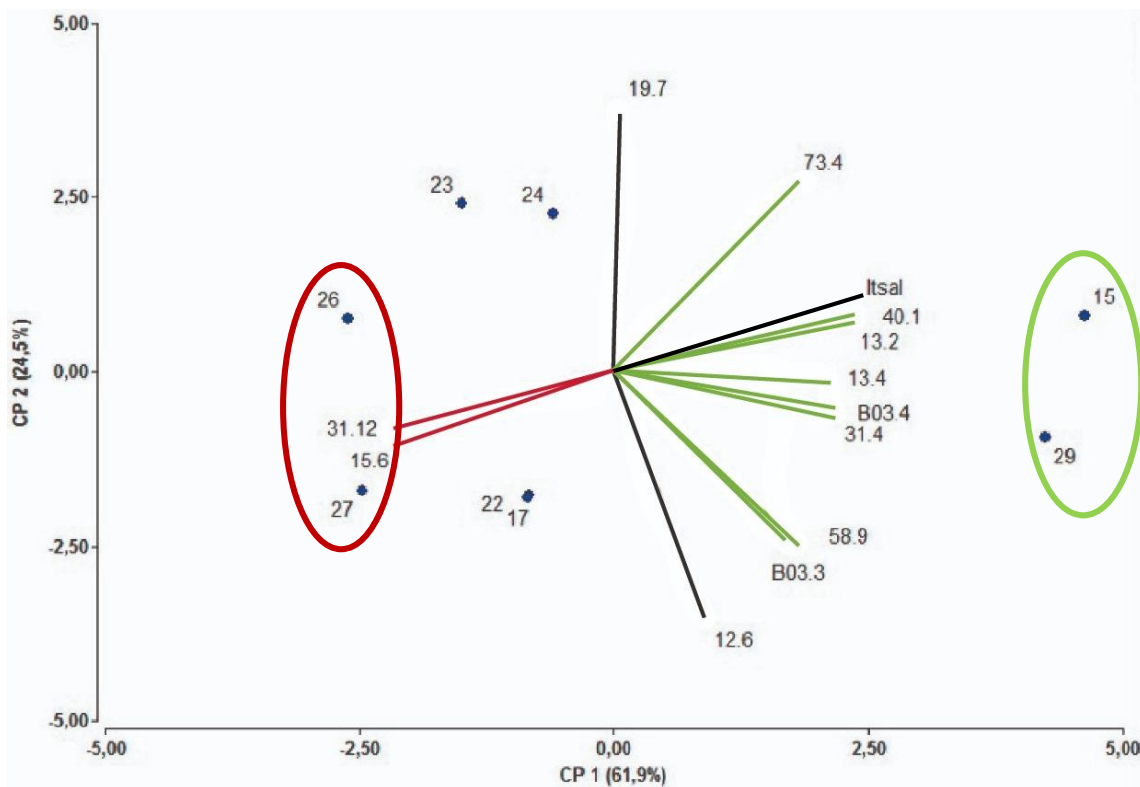


Figura 5.5. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los coeficientes de regresión de los 12 alelos significativos y el ITPSA en condición de salinidad en ocho FMH de festuca alta.

El ACP realizado con el ITPSA en condición de sequía y los 12 alelos relacionados a la tolerancia o susceptibilidad a los estreses, permite observar que las dos primeras componentes explican el 87% de la variabilidad fenotípica en relación a las pendientes de cada alelo (Figura 5.6). La CP1 explica el 55,4% de la variabilidad detectada, mientras que la CP2 explica el 31,6% restante. Las variables con mayor aporte a la CP1 fueron los alelos 13.2, 31.12 y 40.1. Las variables con mayor aporte a la CP2 fueron el ITPSA y los alelos 12.6 y 19.7. Puede observarse también que con las dos primeras componentes es posible diferenciar a los individuos clasificados como tolerantes (Verde: 17-22) y susceptibles (Rojo: 23-24) a la sequía.

En cuanto a los alelos, se puede observar que el alelo 12.6 se encuentra asociado al ITPSA en condición de sequía. En la dirección contraria se encuentran los alelos 19.7 y 73.4 que estarían asociados a la susceptibilidad en condiciones de sequía.

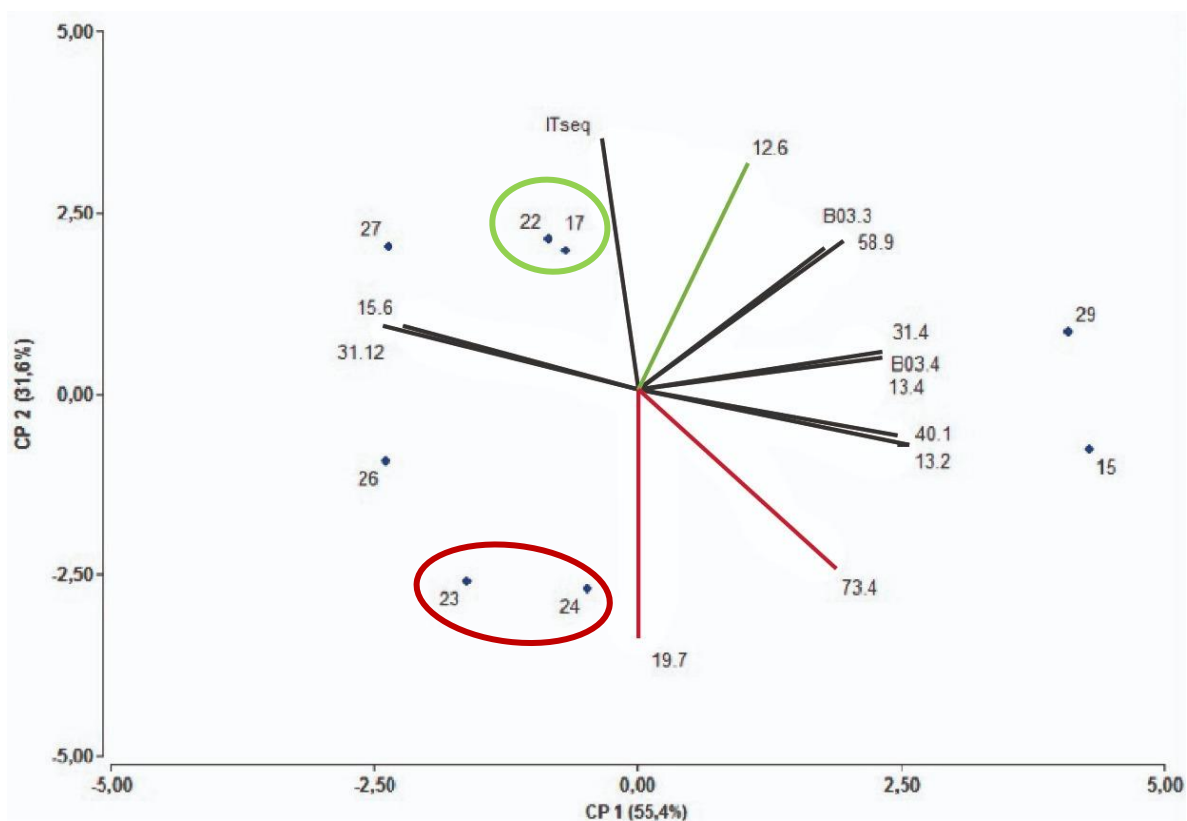


Figura 5.6. Biplot obtenido mediante Análisis de Componentes Principales sobre los coeficientes de regresión de los 12 alelos y el ITPSA en condición de sequía en ocho FMH de festuca alta.

DISCUSIÓN

Los estreses abióticos, entre ellos la salinidad y la sequía, provocan una serie de respuestas tanto moleculares, como celulares y fisiológicas (Bray, 1993; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Shinozaki *et al.*, 2003; Thomashow, 1999). En especial, las respuestas moleculares asociadas con la aclimatación al estrés hídrico y salino son multigénicas y a menudo están relacionadas entre sí. Se han detectado numerosos factores de transcripción intervinientes en la respuesta y la tolerancia a diferentes estreses (Agarwal *et al.*, 2006; Bray, 1993; Ingram y Bartels, 1996; Kizis *et al.*, 2001; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; 2000; Thomashow, 1999).

La comprensión de la base genética de los rasgos cuantitativos es un objetivo principal en cualquier programa de mejoramiento molecular (Saha, 2013) y mejorar el rendimiento de festuca alta bajo condiciones de estrés requiere el acceso a técnicas eficientes para la detección de variabilidad genética presente en la población (Amombo *et al.*, 2018). En este contexto cobra relevancia la caracterización molecular y su posterior asociación a la tolerancia o susceptibilidad a los estreses causados por salinidad y sequía.

La totalidad de los SSR amplificados fueron polimórficos presentado un total de 251 alelos, con una variación de entre 4 y 17 alelos por locus. El número de alelos por locus obtenidos en la evaluación de las ocho FMH fue menor a los obtenidos en las poblaciones que les dieron origen (Capítulo 2) y a los obtenidos en la evaluación de accesiones de festuca alta (Sun *et al.*, 2015 a-b; Lou *et al.*, 2015; Amombo *et al.*, 2018). Lo mismo podría explicarse debido a que la selección de FMH reduce la variabilidad genética con respecto a las poblaciones. Aun así, estos resultados fueron similares a los obtenidos por Cuyeu *et al.* (2013) al evaluar poblaciones de festuca alta.

El índice de contenido polimórfico (PIC) de los marcadores en las ocho familias de medio hermanos seleccionados por la tolerancia a salinidad o sequía, varió entre 0,200 y 0,373, siendo más informativos los SSR NFFa041, LPSSRK02E08, NFFa030 y NFFa129, y menos informativo el SSR NFFa090. Los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos en las poblaciones que les dieron origen (Capítulo 2) y a los obtenidos por otros autores (Cuyeu, 2008; Sun *et al.*, 2015 a-b; Lou *et al.*, 2015) demostrando que los SSR utilizados en la caracterización de las ocho FMH de festuca alta se consideran informativos. El AMOVA detectó que el 98,56% de la variabilidad total se encontraba dentro de las FMH y el 1,44% restante entre las FMH. Resultados similares fueron encontrados al evaluar las poblaciones que les dieron origen a dichas FMH y otros estudios realizados en la especie (Cuyeu *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015 b). Al estudiar las distancias genéticas entre los pares

de FMH se pudo observar que la distancia promedio fue 0,018, con valores extremos que fueron desde 0,0076 a 0,0347. Los pares de FMH que presentaron mayor similitud fueron las FMH (24 y 26) y (26 y 27), mientras que las FMH que presentaron menor similitud fueron las FMH (15 y 29) y (17 y 29). Se observa que los pares de FMH con mayor similitud fueron susceptibles tanto a salinidad como a sequía, y los pares de FMH con menor similitud fueron tolerantes a los estreses impuestos. Esto podría estar demostrando una divergencia en las familias tolerantes a los estreses con respecto al resto de las familias. Las distancias detectadas entre los pares de FMH fueron mayores a las detectadas entre los pares de poblaciones que les dieron origen (Capítulo 2), lo que es de esperar en poblaciones sujetas a selección divergente. Los análisis multivariados de Coordenadas Principales y Cluster agruparon a las FMH de forma similar. El ACoorP diferenció cuatro grupos de familias (15-17, 22-23, 24 y 26-27-29) mientras que en el análisis de Cluster las familias 26, 27 y 29 formaron grupos independientes.

Las diferencias en las frecuencias absolutas en las FMH de comportamiento extremo frente a condición de salinidad y sequía permitieron preseleccionar 51 alelos. Luego, el análisis de regresión lineal de dichos alelos sobre los índices de tolerancia del peso seco aéreo (ITPSA) calculados bajo condición de salinidad o sequía permitió detectar 12 alelos con efectos significativos ($p < 0,05$) lo que indicaría la relación con la tolerancia o susceptibilidad a salinidad o sequía. De los 12 alelos con efectos significativos, 10 alelos se relacionaron a la tolerancia o susceptibilidad a la salinidad y tres a la tolerancia o susceptibilidad a la sequía. Los alelos 15.6, 31.12 estarían asociados a la susceptibilidad a la salinidad, mientras que el resto estarían asociados a la tolerancia. En el caso del estrés por sequía, la susceptibilidad estaría relacionada a los alelos 19.7 y 73.4, mientras que el alelo 12.6 estaría relacionado a la tolerancia al estrés. Cabe destacar que el alelo 73.4 estaría relacionado a la tolerancia a la salinidad mientras que para la sequía estaría relacionado a la susceptibilidad.

El ACP realizado con los 12 alelos con efectos significativos y el ITPSA en condición de salinidad, permite visualizar más fácilmente los resultados obtenidos, entre ellos, que las FMH 15 y 29 se asociaron a mayores valores del ITPSA y que los alelos 40.1 y 13.2 se encuentran asociados al mismo. El ACP realizado con los 12 alelos con efectos significativos y el ITPSA en condición de sequía permite visualizar que las FMH 17 y 22 se asociaron a mayores valores del ITPSA y que el alelo 12.6 se encuentra altamente asociado al mismo.

La detección de una amplia variabilidad genética en las familias de festuca alta

evaluadas facilitaría la asociación de rasgos fisiológicos con marcadores moleculares (Saha *et al.*, 2006). Hasta la actualidad se han realizado tres mapas de ligamiento en festuca alta (Xu, *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 2005; Dierking *et al.*, 2015). El último se realizó utilizando la tecnología de matrices de diversidad (DArT) mediante el cruzamiento de morfotipos mediterráneos y continentales. Estos mapas ayudarían en la búsqueda de loci de rasgos cuantitativos, así como también a definir y distinguir las diferencias genéticas entre los dos morfotipos. Aun así, la constitución genómica de la especie no pudo ser definida correctamente y el incremento de la densidad de marcadores en los mapas de ligamiento supone un gran desafío.

Varios autores (Lou *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015 a, b) realizaron estudios de asociación mediante marcadores SSR en condiciones no estresantes. Amombo *et al.* (2018) realizaron estudios de asociación mediante marcadores SSR en 114 accesiones de festuca alta para mejorar la tolerancia a salinidad en festuca alta detectando 68 marcadores asociados significativamente a rasgos relacionados a la calidad del forraje, contenido relativo de agua, tasa de evapotranspiración, tasa de crecimiento y contenido de clorofila. En esta tesis se realizó la asociación de marcadores moleculares del tipo SSR a la tolerancia o susceptibilidad a estreses causados por salinidad o sequía. Este tipo de trabajo permitiría aumentar la eficiencia para la identificación, selección y reproducción de genotipos tolerantes a los estreses en las progenies cercanas y la propia población.

La identificación de marcadores o genes más efectivos mediante análisis de asociación debería centrarse en la selección de genes candidatos que regulen la tolerancia a los estreses abióticos o desarrollar una gran cantidad de marcadores para genotipar con mayor uniformidad y densidad poblaciones más grandes.

CONCLUSIONES

- Se corroboró la existencia de una amplia variabilidad genética entre y dentro de las ocho FMH de festuca alta seleccionadas por tolerancia o susceptibilidad a salinidad o sequía.
- La variabilidad genética fue mayor dentro de las FMH que entre FMH.
- Las distancias genéticas detectadas entre los pares de FMH fueron mayores a las detectadas entre los pares de poblaciones que les dieron origen.
- Se detectaron 10 alelos relacionados a la tolerancia o susceptibilidad a la salinidad.
- Se detectaron tres alelos relacionados a la tolerancia o susceptibilidad a la sequía.
- Se detectó un alelo relacionado a la tolerancia a la salinidad y susceptibilidad a sequía.

CONSIDERACIONES GENERALES

La colecta y caracterización agronómica y molecular de las nueve poblaciones de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb. var *arundinacea*) provenientes del borde del nicho ecológico realizado, determinó una importante variabilidad genética intra e inter-poblacional. A través de la caracterización agronómica se destacaron las poblaciones 2, 6, 8 y 9 por su elevada producción de forraje y semillas; y las poblaciones 1, 3 y 6 por mostrar la mayor variabilidad intra-poblacional. El grado de determinación genética logro valores bajos para los caracteres vegetativos y medios a elevados para los caracteres reproductivos. La caracterización molecular confirmó la mayor variación genética intra-poblacional y determinó que la población 1 (Juncal) forma un grupo aislado del resto de las poblaciones. El análisis de Procrustes Generalizado reveló un alto consenso en el ordenamiento de las poblaciones confirmando la utilidad de la evaluación morfológica y molecular en la caracterización de poblaciones. El análisis de estructura poblacional permitió generar tres pools de policruzamiento que dieron origen a 30 familias de medio hermanos (FMH) estudiadas como se detalla en los sucesivos capítulos.

El estudio del crecimiento inicial de 30 FMH en condición de salinidad en hidroponia detectó una respuesta diferencial de las familias a los tratamientos impuestos. El tratamiento salino intermedio permitió detectar familias tolerantes y susceptibles mediante la utilización de la relación del ITPSA y la producción de materia seca. Las familias 29, 15, 10, 30 y 12 se consideraron tolerantes, mientras que las familias 4, 5, 8, 9, 11, 17, 18, 21, 22, 26, 27 susceptibles a la salinidad. La heredabilidad en sentido estricto detectada fue variable dependiendo de las concentraciones salinas impuestas y el pool de procedencia de las FMH evaluadas. La condición salina elevada redujo significativamente la variabilidad en la tolerancia, sin afectar la sobrevivencia.

El estudio de las 30 FMH en condición de sequía mostró una reducción del crecimiento inicial y de la variabilidad con respecto a la condición control, sin afectar la sobrevivencia. Aun así, se pudo detectar familias tolerantes y susceptibles mediante la utilización de la relación del ITPSA y la producción de materia seca. Las familias 9, 17, 21, 22 y 25 se consideraron tolerantes, mientras que las familias 10, 12, 23, 24, 28 y 29 se consideraron susceptibles a la sequía.

Las FMH 15, 17, 22, 23, 24, 26, 27 y 29 seleccionadas como tolerantes o susceptibles a salinidad o sequía fueron caracterizadas molecularmente. Este último estudio permitió

detectar una amplia variabilidad genética entre y dentro de las ocho FMH, aunque la mayor variabilidad fue intra-familiar. Se diferenciaron 12 alelos relacionados a la tolerancia o susceptibilidad a los estreses estudiados.

Estos resultados han aportado información necesaria que permitirá iniciar un plan de mejora en la especie de acuerdo al criterio de selección a priorizar. En el caso de un programa que persiga la obtención de un cultivar con tolerancia a ambos estreses, salinidad y sequía, y productividad intermedia, las FMH 6, 10, 13, 14, 29 y 30 serían las indicadas para incorporar.

En el caso de un programa de mejoramiento por tolerancia a salinidad y elevada productividad, los resultados del análisis hidropónico destacaron a las FMH 12, 15 y 29 independientemente del carácter considerado (ITPSA, ITPSR, ITPST).

Si el programa de mejoramiento tiene como objetivo obtener un cultivar con tolerancia a sequía temporal y elevada productividad, las FMH 9, 17, 21, 22 y 25 serían las indicadas para incorporar como base del germoplasma a seleccionar.

En términos generales la presente tesis doctoral generó conocimientos y germoplasma aplicables a futuros programas de selección y obtención de cultivares de festuca alta tolerantes a salinidad y sequía que resulten productivamente útiles en diferentes sistemas ganaderos de la Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, E., Hsiao, T.C. y Henderson, D.W. 1971. Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water status. *Plant Physiology*, 48(5), 631-636.
- Acuña, M. 2008. Variabilidad genética en poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* (Lam.). Tesis Maestría en Genética Vegetal. UNR-INTA. 156 pág.
- Acuña, M., Andrés, A., Varea, I. y Lavandera, J. 2009. Vigor de plántula en poblaciones naturalizadas de agropiro alargado. Primer Congreso de la Red Argentina de Salinidad. Pág 40.
- Acuña, M., Gandolfi, D.E., Lavandera, J., Fioravanti, N., Novarese, C. y Andrés, A. 2015. Rendimiento de semilla de *Thinopyrum ponticum* en dos ambientes: suelo sódico y suelo no sódico. 38º Congreso Argentino de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal, Vol 35 Supl. 1:168.
- Affinito, A. 2014. Caracterización de la variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular de Familias de Medio-Hermanos de *Lotus tenuis* tolerantes a salinidad. Trabajo final de grado para optar al título de Ingeniero agrónomo. UNNOBA. 96 pág.
- Affinito, A. 2020. Participación del antiporter vacuolar NHX1 de *Lotus tenuis* en la tolerancia a salinidad. Tesis Doctorado en Ciencias Agrarias. UNR. 223 pág.
- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Reddy, M.K., and Sopory, S.K. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25(12), 1263-1274.
- Agnusdei, M y Di Marco, O. 2010. Ganadería en suelos bajos. El potencial productivo de las pasturas perennes en la región templado-húmeda bonaerense. *Revista Hereford*, Bs.As., 75(652):76-82. En página web: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/suelos_salinos/00_pasturas_suelos_salinos.htm.
- Agnusdei, M.G. y Castaño, C. 2012. Manejo de pasturas templadas para suelos no agrícolas. En 7ma Jornada demostrativa para productores y profesionales. Laprida, 27 de Octubre. 11 p.
- Agnusdei, M., Castaño, J. y Marino, A. 2011. Recuperando a un viejo aliado. *Visión Rural*, 17(86), 18-24.
- Agnusdei, M.G., Di Marco, O.N., Insúa, J. 2014. Calidad nutritiva de festuca alta. INTA, EEA Balcarce.
- Ahmad, I., Larher, F. and Stewart, G.R. 1981 a. The accumulation of A'-acetylornithine and other solutes in the salt marsh grass *Puccinellia maritima*. *Phytochemistry*, 20 (7): 1501-1504.
- Ahmad I., Wainright S. J. and Stewart G. R. 1981 b. The solute and water relations of *Agrostis stolonifera* ecotypes differing in their salt tolerance. *New Phytologist*, 87 (3): 615-629.
- Albert, R. and Popp, M. 1977. Chemical composition of halophytes from the Neusiedler Lake region in Austria. *Oecologia*, 27 (2): 157-170.
- Ali, Z., Khan, A.S., and Asad, M.A. 2002. Salt tolerance in bread wheat: Genetic variation and heritability for growth and ion relation. *Asian Journal of Plant Science*, 1, 420-422.

- Alonso, S.I. y Suárez, J.C., 1993. Variabilidad genética en poblaciones de *Lolium multiflorum* naturalizadas en la Provincia de Bs.As. Sociedad Argentina de Genética. Buenos Aires. AR. p. 63.
- Alshammary, S.F., Qian, Y.L. and Wallner, S.J. 2004: Growth response of four turfgrass species to salinity. *Agric Water Manage.* 66, 97–111.
- Alvarado, G., Rodríguez, F.M., Pacheco, A., Burgueño, J., Crossa, J., Vargas, M., Perez, P., Lopez-Cruz, M.A. 2020. META-R: a software to analyze data from multi-environment plant breeding trials. *Crop J.*, 8, pp. 745-756.
- Amini, F., Masoumi, P., Ramshini, H., and Norouzian, M.A. 2018. Genetic diversity among tall fescue ecotypes using agromorphological traits, nutritional values and AFLP molecular markers. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, Vol. 7, No. 2
- Amira M.S. Abdul Qados. 2011. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Vol. 10: 7-15
- Amombo, E., Li, X., Wang, G., Fan, S., Shao, A., Zhang, Y., Fu, J., 2018. Screening of diverse tall fescue population for salinity tolerance based on SSR marker-physiological trait association. *Euphytica* 214:220. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2281-5>
- Amorena, J.I. 2014. Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada en la calidad y producción de materia seca y semilla en *Panicum Coloratum* Klein. Trabajo Final del Área de Consolidación Métodos Cuantitativos para la Investigación Agropecuaria. Fac. Cs. Agropecuarias. Universidad Nacional Córdoba.
- Andrés, A. 1987. Variabilidad genética en poblaciones naturales de *Agropyron scabrifolium* (Doell.) Parodi. Tesis de Master of Science. Pergamino INTA-UNR. 93 pág.
- Andrés, A. 2014. El mejoramiento de especies forrajeras. Núcleos revista científica-CEDI-UNNOBA. 50 p.
- 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 Rosso, B. 2007. Characterization of *Lotus glaber* germoplasm from Buenos Aires province – Argentina. *Lotus Newsletter*. 37(1): 24 p.
- Annicchiarico, P. y Romani, M. 2005. Genetic variation, heritability and genetic correlations for forage quality and yield traits of Mediterranean tall fescue germoplasm. *Plant Breeding*. 124, 99-101.
- Antuña, J.C. 2011. Mapa agroalimentario mundial 2011. ISBN N° 978-987-679-078-9. INTA Buenos Aires
- Argentel, L., López, R. C., Fonseca, I., Girón, R., Gómez, E., González, L. M., y López Aguilar, D. R. 2009. Contenido de clorofila e iones en la variedad de trigo harinero Cuba-C-204 en condiciones de estrés salino. *Cultivos Tropicales*, 30(4), p 32-37.
- Arzani, A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. *In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant*, 44, 373–383.
- Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199: 361-376.
- Ashraf, M. and McNeilly, T. 1988. Variability in salt tolerance of nine spring wheat cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Sci*, 160:14-21.
- Ashraf, M., McNeilly, T., and Bradshaw, A.D. 1986. Tolerance of sodium chloride and its genetic basis in natural populations of four grass species. *New Phytologist*, 103(4), 725-734.
- Ashraf, M.Y., Wahed, R.A., Bhatti, A.S., Sarwar, G. and Aslam, Z. 1999. Salt tolerance potential in different Brassica species. *Growth studies*. In: *Halophytes Uses in*

Different Climates – II. (Eds.): H. Hamdy, H. Lieth, M. Todorovic and M. Moschenko. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherland. pp.119-125.

- Assuero, S.G., Tognetti, J.A., Colabelli, M.R., Agnusdei, M.G., Petroni, E.C. y Posse, M.A. 2006. Endophyte infection accelerates morpho-physiological responses to water deficit in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 49:4, 359-370. DOI: 10.1080/00288233.2006.9513726

- Atlin, G.N. y Frey, K.J. 1990. Selection oat for yield in low productivity environments. *Crop Sci* 30:556–561

- Bacetty, A.A., Snook, M.E., Glenn, A.E., Noe, J.P., Hill, N., Culbreath, A., Timper, P., Nagabhyru, P., Bacon, C.W. 2009. Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology* 99 (12):1336-1345.

- Bacon, C. y Siegel, M. 1988. Endophyte Parasitism of Tall Fescue. *Journal of Production Agriculture*. Volume 1, Issue 1. Pages 45-55. <https://doi.org/10.2134/jpa1988.0045>

- Balzarini, M.G. y Di Rienzo, J.A. InfoGen versión 2016. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.

- Barnes, R.F. y Marten, G.C. 1979. Recent development in predicting forage quality. *Journal Animal Science*. 48, 1554-1561.

- Barufaldi, M. 1999. Variabilidad genética en poblaciones adaptadas de *Dactylis glomerata* L. Tesis de Maestría. Curso de posgrado de mejoramiento genético vegetal. INTA-UNR. 87 p.

- Bazzigalupi, O. y Pistorale, S., 2009. Variabilidad de la tolerancia a la germinación en soluciones salinas de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) producidas en el mismo ambiente. 1er Congreso de la Red Argentina de Salinidad. P7, pp: 29.

- Bazzigalupi, O., Pistorale, S.M. y Andrés, A.N. 2008. Tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(3):277-285.

- Bean, E. 1972. Clonal evaluation for increased seed production in two species of forage grasses: *Festuca arundinacea* Schreb and *Phleum pratense* L. *Euphytica* 21: 377-383

- Beard, J.B. 1973. *Turfgrass: Science and Culture*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

- Beard, J.B. 1985. Turfgrass physiology research: 1981–85 (1). In: Lemaire, F. (ed.): *Proceedings of the 5th international turfgrass research conference*, Avignon, France. 1–5 July. 1985. Institut National de la Recherche Agronomique, Avignon, France. p. 81–104.

- Beard, J.B. 1989. Turfgrass water stress: Drought resistance components, physiological mechanisms, and species-genotype diversity. H. Takaoh (ed.) *Proc. Of the Inter. Turf. Res. Conf.*, 6th, Tokio.

- Beard, J.B. and Sifers, S.I. 1997. Genetic diversity in dehydration avoidance and drought resistance within the *Cynodon* and *Zoysia* species. *Intl. Turfgrass Soc. Res. J.* 8:603- 610.

- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 10(2), 77-81.

- Bennett, E. 1970. Adaptation in wild and cultivated plant populations. In *Genetic Resources in Plants - Their Exploration and Conservation*. O. H. Frankel and E. Bennett, eds. Oxford: International Biological Programme Handbook No, 11. Blackwell Scientific Publications. Pages 115-129.

- Bernstein, L., Hayward, H.E. 1958. Physiology of salt tolerance. Annual Review of Plant Physiology.9: 25-46.
- Bertín, O.D. 1988. Características agronómicas de los principales grupos de cultivares de festuca alta. Carpeta sobre forrajeras y producción bovina. EEA Pergamino. Inf. General n 145. 3.
- Bertín, O.D. 2010. Adaptación de la Festuca Alta para forraje al ambiente edafoclimático. En: XII Reunión anual sobre forrajeras. "Pastura base Festuca: Producción y Manejo". 3 noviembre. Pergamino. INTA EEA Pergamino. p. 50-51.
- Bertín, O. 2019. Festucosis: estado actual del conocimiento de la enfermedad en animales pastoreando festuca alta. Inforrajes n.18.
- Bertín, O.D., Borrás, F., Carrete, J.R. 1990. Digestibilidad in vitro, pared celular y nitrógeno en cultivares de *Festuca arundinacea* Shreb, *Medicago sativa* L. y *Dactylis glomerata* L. Revista Argentina de Producción Animal. 10 (5): 317-329.
- Bertram, N. Y Chiacchiera, S. 2011. Los ambientes no agrícolas de la región centro y la potencialidad forrajera. Informe de actualización técnica. EEA Marcos Juárez. N° 22 AR. p. 18-27.
- Betrán, F.J., Ribaut, J.M., Beck, D. y Gonzalez León, D. 2003. Genetic Diversity, Specific Combining Ability, and Heterosis in Tropical Maize under Stress and Nonstress Environments, Crop Sci., 10.2135/cropsci2003.7970, 43, 3, (797-806)
- Binek A., 1996. Osobnicza zmienność cech warunkujących produktywność nasienną odmian kupkówki pospolitej, *Dactylis glomerata* L. Biul. IHAR 199, 81–87 (in Polish).
- Biran, I., Bravdo, B., Bushkin-Harav, I., & Rawitz, E. 1981. Water Consumption and Growth Rate of 11 Turfgrasses as Affected by Mowing Height, Irrigation Frequency, and Soil Moisture. Agronomy Journal, 73(1), 85. doi:10.2134/agronj1981.00021962007300010020x
- Blum, A. 2011. Drought resistance—is it really a complex trait? Functional Plant Biology, 38(10), 753-757.
- Bolaric, S., Barth, S., Melchinger, A. y Posselt, U., 2005. Molecular characterization of genetic diversity in european germplasm of perennial ryegrass. Euphytica, 146, 39.
- Borrajo, C.I., y Reigosa Roger, R. 2008. Efecto de la salinidad en poblaciones de agropiro alargado. In Congreso Argentino de Producción Animal. 31° Congreso Argentino de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal, Vol 28 Supl. 1: 456.
- Borril, M., Tyler, B. y Lloyd-Jones, M. 1971. Studies in *Festuca*. 1. A chromosome atlas of *Bovinae* and *Scariosae*. Cytologia 36:1-14.
- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 101-115.
- Bowman, D.C., Cramer, G.R. and Devitt, D.A. 2006. Effect of salinity and nitrogen status on nitrogen uptake by tall fescue turf. J. Plant Nutr. 29, 1481–1490.
- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. Science 218:443–448
- Bradford, K. 1995. Water relations in seed germination. In Seed Development and Germination. Jaime Kigel y Gad Galili (Ed). Editorial Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp 351-396.
- Bradshaw, A.D., 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. Advances in Genetics 13: 115-155.
- Bradshaw, A. 1984. Ecological significance of genetic variation between populations. In: Perspectives on plant population ecology, Dirzo, R y Saukhán J.(eds). Sinaver 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.
- Brar, G.S., y Palazzo, A.J. 1995. Tall and Hard Fescue Responses to Periodic Soil Water Deficits. *Journal of Agronomy and Crop Sci*, 175(4), 221-229. doi:10.1111/j.1439-037x.1995.tb00216.x
- Bray, E.A. 1993. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol.* 1993 Dec; 103(4): 1035–1040. doi: 10.1104/pp.103.4.1035
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stress. *Biochemistry & molecular biology of plants*. In: Gruissem, W. and Jones, R., Eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1158-1203.
- Briens, M. and Larher, F. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant, Cell and Environment*, 5 (4): 287-292.
- Brigss, D. and Walters, S. 1984. *Plant variation and evolution*. Second Edition Cambridge University Press, Cambridge, pp. 412.
- Buckner, R.C., Powell, J.B. y Frakes, R.V. 1979. Historical development. In: Bush LP, Buckner RC (eds) *Tall fescue Agronomy Monograph*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, pp 1–8.
- Bughrara, S.S., Sleper, D.A., Krause, G.F. 1991. Genetic variation in tall fescue digestibility estimated using a prepared cellulose solution. *Crop Sci.* 31, 883-889.
- Burke, E.J., Brown, S.J. y Christidis, N. 2006. Modeling the Recent Evolution of Global Drought and Projections for the Twenty-First Century with the Hadley Centre Climate Model. *J. Hydrometeor.* (2006) 7 (5): 1113–1125. <https://doi.org/10.1175/JHM544.1>
- Burns, J.C. 2005. Tall fescue on line monograph. Nutritive value. <http://forages.oregonstate.edu/is/tfis/book/tf21c/nutritive-value.pdf>
- Burns, J.C., Chamblee, D.S., Giesbrecht, F.G. 2002. Defoliation intensity effects on season long dry matter distribution and nutritive value of tall fescue. *Crop Sci*, 42, 1274–1284.
- Burton, G.W. y De Vane, E.H. 1953. Estimating heritability in Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) from replicated clonal material. *Agronomy Journal* 45, 478-481.
- Buxton, D. 1990. Cell wall component in divergent germplasm of four perennial forage grasses species. *Crop Sci.* 30: 402-408
- Buxton, D.R. y Marten, G.C. 1989. Forage quality of plant parts of perennial grasses and relationship to phenology. *Crop Sci.* 29, 429-435.
- Byrne, P.F., Bolaños, J., Edmeades, G.O., Eaton, D.L. 1995. Gains from selection under drought versus multilocation testing in related tropical maize populations. *Crop Sci.* 35, 63-69.
- Callow, M.N., Lowe, K.F., Bowdler, T.M., Lowe, S.A., Gobius, N.R. 2003. Dry matter yield, forage quality and persistence of tall fescue (*Festuca arundinacea*) cultivars compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in a subtropical environment. *Aust. J. Exp. Agric.* 43:1093–1099.
- Cardamone, L., Cuatrín, A., Grunberg, K., Tomás, M.A., 2018. Variability for salt tolerance in a collection of *Panicum coloratum* var. makarikariense during early growth stages. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*. Vol. 6(3): 134–147.
- Carrow, R.N. 1996. Drought Avoidance Characteristics of Diverse Tall Fescue Cultivars. *Crop Sci.* 36(2).
- Carson, D.L. and Botha, F.C. 2000. Preliminary Analysis of Expressed Sequence Tags for Sugarcane. *Crop Sci.*, 40: 1769-1779. doi:10.2135/cropsci2000.4061769x

- Casas, R.R. 2013. Recuperación de suelos salino-sódicos en áreas de secano. ACAECER. 38 (447):10-19,
- Castaño, J. 2005. Producción de semilla de gramíneas forrajeras en el sudeste bonaerense. 2da.ed.- Balcarce: EEA Balcarce. Materiales Didácticos nº10, 77p.
- Casu, R., Dimmock, C., Thomas, M., Bower, N., Knight, D., Grof, C., McIntyre, L., Jackson, P., Jordan, D., Whan, V., Drenth, J., Tao, Y. and Manners, J. 2001. Genetic and expression profiling in sugarcane. *Proc. Int. Soc. Sugarcane. Technol.* 24: 626-627
- Cattoni, M.I. 2010. Variabilidad genética de parámetros de calidad en germoplasma contrastante de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.). Tesis de Maestría. Área de Producción Animal. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Cerono, J. 1993. Variabilidad genética e identificación varietal en *Festuca arundinacea* Schreb. cultivar El Palenque MAG. Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR, pp. 78.
- Charmet, G., Ravel, C. y Balfourier, F. 1997. Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theor. Appl. Genet.* 94, 1038-1046.
- Chaturvedi, G.S., Aggarwal, P.K., Singh, A.K., Joshi, M.G., and Sinha, S.K. 1981. Effect of date of sowing irrigation on tillering in wheat, triticale and barley in water—limited environment. *Irrig. Sci.* 2, 225-235.
- Chen, C., Sleper, D.A., Johal, G.S. 1998. Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. *Theor. Appl. Genet.* 97:255–260
- Chen, C., Sleper, D.A. and West, C.P. 1995. RFLP and Cytogenetic Analyses of Hybrids between *Festuca mairei* and *Lolium perenne*. *Crop Sci.* 35: 720-725 doi:10.2135/cropsci1995.0011183X003500030012x
- Cheplick, G.P. and Clay, K. 1988. Acquired chemical defenses of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos* 52:309–318
- Chloupek, O., Skacel, M., Ehrenbergerova, J. 1999. Effect of divergent selection for root size in field-grown alfalfa. *Can J. Plant. Sci.* 79:93–95
- Chtourou-Ghorbel, N., Chakroun, M., Elazreg, H. and Trifi-Farah, N. 2011. Agronomic Evaluation and Genetic Variation of Tunisian Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *International Journal of Agronomy*, vol. 2011, 6 pages.
- Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S. 2010. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theor. Appl. Genet.* 121:1569–85.
- Clarke, J.M., DePauw, R.M. and Townley-Smith, T.F. 1992. Evaluation of Methods for Quantification of Drought Tolerance in Wheat. *Crop Sci.* 32: 723-728 cropsci1992.0011183X003200030029x.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69 (1):10-16.
- Clay, K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:275-297.
- Colabelli, M., Agnusdei, M., Mazzanti, A. y Lavreveux, M. 1998. El proceso de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras como base para el manejo de la defoliación. Boletín Técnico N° 148. EEA INTA Balcarce. 21 pag.
- Collins, M. y Fritz, J.O. 2007. Forage quality. In “Forages an introduction to grassland agriculture” Volume I (Eds. Barnes, R.F., Nelson, C.J., Moore, K.J., Collind, M.) pp. 363-390.
- Cowan, R. 1956. Tall Fescue. *Adv. Agron.* 8: 283-320.

- Cravero, V. 2006. Incorporación de metodologías no convencionales en un plan de mejora vegetal. Tesis Doctorado en Ciencias Agrarias. UNR.
- Crisci, V., Lopez Armengol, S. 1983. Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Sec. Gral. O.E.A. Washington D.C. 132 pp
- Cross, J.W., Bonos, S.A., Huang, B. and Meyer, W.A. 2013. Evaluation of heat and drought as components of summer stress on tall fescue genotypes. *HortScience* 48:1562–1567.
- CSSA. 1992. Glossary of crop science terms. CSSA, Madison, WI.
- Cuyeu, R. 2008. Aplicación de marcadores moleculares a estudios de variabilidad genética en poáceas forrajeras templadas. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Aplicadas, UNLu. 154 pág.
- Cuyeu, R., Rosso, B., Pagano, E., Soto, G., Fox, R., Ayub, N.D. 2013. Genetic diversity in a world germplasm collection of tall fescue. *Genet Mol Biol.* 36(2):237-242. doi:10.1590/S1415-47572013005000021
- Davidson, D.J., y Chevalier, P.M. 1987. Influence of Polyethylene Glycol-Induced Water Deficits on Tiller Production in Spring Wheat 1. *Crop Sci.* 27(6), 1185-1187.
- De Araujo, M., Coulman, B., Faris, M., Wrobel, C. 1983. Genetic variation and correlation of agronomic traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) germplasm. *Can. J. Plant Sci.* 63: 453-460
- De Battista, J.P. Fernández Osuna, M., Medvescigh, J. y Costa, M. 2006. Efecto del endófito fúngico *Neotyphodium occultans* sobre la producción de semilla de *Lolium multiflorum*. *Revista Argentina de Producción Animal* 26 (1):140-1
- De la Peña, R. y Hughes, J. 2007. Improving vegetable productivity in a variable and changing climate. *Journal of SAT Agricultural Research.* 4.
- Dhanda, S. y Sethi, G. 1998. Inheritance of excised-leaf water loss and relative water content in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica* 104, 39–47. <https://doi.org/10.1023/A:1018644113378>
- Di Marco, O. 2011. Estimación de calidad de los forrajes. *Producir XXI*, 20 (240), 24-30.
- Di Marco, O.N. y Agnusdei, M.G. 2010. Plant Morphogenetical plasticity in response to sward height can modify fibre digestibility in C3 (*Thinopyrum ponticum*) and C4 grass species (*Chloris gayana*). En: MACHADO, C.F. (Eds.) An overview of research on pastoral-based systems in the southern part of South America. Tandil. Editorial Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. pp 18-27.
- Di Marco, O.N., Harkes, H., Agnusdei, M.G. 2013. Calidad de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) en estado vegetativo en relación a la edad y longitud de las hojas. *Rev. Investigación Agropecuaria (RIA)*. 39:105-110.
- Di Santo, H., Vega, D., Grassi, E., Ferreira, A., Castillo, E., Ferreira, V. 2014. Vº Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal 2014. Genética, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar
- Diab, A.A., Teulat-Merah, B., This, D., Ozturk, N.Z., Benscher, D., Sorrells, M.E. 2004. Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theor. Appl. Genet.* 109 (7): 1417-1425. doi:10.1007/s00122-004-1755-0
- Diaz, M.L., Echenique, V., Schrauf, G.E., Cardone, S., Polci, P., Lutz, E. y Spangerberg, G. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras. *RIA.* 33 (3): 77-104.
- Dierking, R., Azhaguvel, P., Kallenbach, R., Saha, M., Bouton, J., Chekhovskiy, K., Kopecký, D. y Hopkins, A. 2015. Linkage Maps of a Mediterranean ´ Continental Tall

Fescue Population and their Comparative Analysis with Other Poaceae Species. The Plant Genome. 8. 10.3835/plantgenome2014.07.0032.

- Dodd, G. y Donovan, L. 1999. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of cold desert shrubs. *American Journal of Botany*. 86(8): 1146-1153.
- Dudeck, A.E. and Peacock, C.H. 1985. Effects of salinity on seashore *Paspalum* turf grasses. *Agronomy Journal*, 11 (1): 47-50.
- Dudeck, A.E., Peacock, C.H. y Wildmon, J.C. 1993. Physiological and growth responses of St. Augustinegrass cultivars to salinity. *HortScience* 28: 46– 48.
- Dudley, J. y Moll, R. 1969. Interpretation and use of estimates of heritability and genetic variances to plant breeding. *Crop Sci.* 9: 257-262.
- Duru, M. y Ducrocq, H. 2002. A model of lamina digestibility of orchardgrass as influenced by nitrogen and defoliation. *Crop Sci.* 42: 214 – 223.
- Earl, D.A. y Von Holdt, B.M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4 (2), 359-361
- Ebrahimiyan, M., Majidi, M.M., Aghafakhr, M., Gheysari, M. 2012. Drought-tolerance indices in a tall fescue population and its polycross progenies. *Crop & Pasture Science* 63, 360–369
- Ebrahimiyan, M., Majidi, M.M., Aghafakhr, M., Noroozi, A. 2013. Physiological traits related to drought tolerance in tall fescue. *Euphytica* 190: 401-414
- Eizenga, G.C., Schardl, C.L., Phillips, T.D. and Sleper, D.A. 1998. Differentiation of Tall Fescue Monosomic Lines Using RFLP Markers and Double Monosomic Analysis. *Crop Sci.* 38: 221-225
- Ekanayake, I.J., O'Toole, J.C., Garrity, D.P., Masajo, T.M. 1985. Inheritance of root characteristics and their relations to drought resistance in rice. *Crop Sci.* 26(6):927-933.
- Elazreg, H., Ghariani, S., Chtourou-Ghorbel, N., Chakroun, M. y Trifi-Farah, N. 2011. SSRs transferability and genetic diversity of Tunisian *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 39: 79-87.
- Epstein, E. 1979. Responses of plants to saline environments. *Basic Life Sci.* 14: 7-21.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14 (8), 2611-2620c
- Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Fairey, D.T., & Lefkovitch, L.P. 1993. Arrangement of new and used nesting materials in leafcutting bee, *Megachile rotundata* (F.) (Hym., Megachilidae), shelters to maximise cell production. *Journal of Applied Entomology*, 115(1-5), 62–65.
- Falconer, D.S. y Mackay, T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics, 4th edn. Longman Group Ltd.
- FAO, 2000. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>
- FAO. 2004. (Online). Disponible en <http://faostat.fao.org>
- FAO. 2005. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt affected soils. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutr. Manag. Service. Publicado en internet, disponible en: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A., Cheema, Z.A., Cheema, M.A. and Khaliq, A. 2008. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agron. Crop Sci.*, 194: 325–333

- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S.M.A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.*, 29: 185–212
- Fernandez, G.C.J. 1991. Analysis of cultivar x environment interaction by stability estimates, *HortScience* 26, 947–950.
- Fernandez, G.C.J. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: Kuo CC (ed), Proceedings of an international symposium on adaptation of food crops to temperature and water stress. AVRDC, Shanhua. 257–270
- Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA, 220pp.
- Ferreras, L., Toresani, S., Faggioli, V. y Galarza, C. 2015. Sensibilidad de indicadores biológicos edáficos en un Argiudol de la Región Pampeana Argentina. *Spanish Journal of Soil Science*, v. 5, n. 3, p. 220-235. <https://doi.org/10.3232/SJSS.2015.V5.N3.04>.
- Fischer, R. and Maurer, R. 1978. Drought Resistance in Spring Wheat Cultivars. I. Grain Yield Responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29, 897-912. <http://dx.doi.org/10.1071/AR9780897>
- Fjellheim, S. y Rognli, 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.
- Fleury, D., Jefferies, S., Kuchel, H., and Langridge, P. 2010. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of experimental botany*, 61(12), 3211-3222.
- Flowers T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396): 307-319.
- Flowers, T.J. y Hajibagheri, M.A. 2001. Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. *Plant and Soil* 231, 1–9.
- Flowers, T.J., Koyama, M.L., Flowers, S.A., Sudhajar, C., Singh, K.P. y Yeo, A.R. 2000. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *Journal of Experimental Botany* 51: 1- 9.
- Fontdevila, A. y Moya, A. 2000. Introducción a la genética de poblaciones. Ed. Síntesis.
- 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. and 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.
- Franco, J., Crossa, J., Ribaut, J., Bertran, J., Warburton, M.L. y Khairallah, M. 2001. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 103, 944–952. <https://doi.org/10.1007/s001220100641>
- Franco, J., Crossa, J., Warburton, M.L. & Taba, S. 2006. Sampling strategies for conserving maize diversity when forming core subsets using genetic markers. *Crop Sci.* 46, 854–864.
- Francois, L.E. 1988. Salinity effects on three turf bermuda grasses. *Hortscience*. 23: 706-708
- Frensch, J. 1997. Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *Journal of Experimental Botany*, 48(5), 985-999.
- Fribourg, H. A., D. B. Hannaway, and C. P. West (ed.) 2009. Tall Fescue for the Twenty-first Century. *Agron. Monog.* 53. ASA, CSSA, SSSA. Madison, WI. 540 pp. Also (<http://forages.oregonstate.edu/tallfescuemonograph>).

- Fry, J. and Huang, B. 2004. Applied turfgrass science and physiology. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Fu, J. y Huang, B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45: 105–114.
- Fu, J.M., Huang, B.R. 2003. Effects of foliar application of nutrients on heat tolerance of creeping Bentgrass. *J. Plant Nutr.* 26:81–96
- Fu, Y.B., Qiu, J., Peterson, G.W., Willms, W.D., and Wilmshurst, J.F. 2006. Characterization of microsatellite markers for rough fescue species (*Festuca* spp.). *Molecular Ecology notes*, 6(3), 894-896.
- Gao, Y. y Li, D. 2012. Detecting salinity stress in tall fescue based on single leaf spectrum. *Scientia Horticulturae* 138: 159–164.
- Gao, Y. y Li, D. 2014. Growth Responses of Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) to Salinity Stress. *Europ. J. Hort. Sci.* 79 (3). S. 123–128
- García, M., Balatti, P. y Arturi, M.J. 2007. Genetic variability in natural populations of *Paspalum dilatatum* Poir. Analyzed by means of morphological traits and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (5): 935-946.
- Gardner, C.O. 1963. Estimates of genetics parameters in cross fertilizing plants and their implication in plant breeding. *NAS/NRC Publications* 982: 225- 252.
- Gardner, F.P., Pearce, R.B., Mitchell, R.I. 1985. *Physiology of Crop Plant*. Iowa State University Press, Ames
- Gavuzzi, P., Rizza, F., Palumbo, M., Campanile, R.G., Ricciardi, G.L., Borghi, B. 1997. Evaluation of field and laboratory predictors of drought and heat tolerance in winter cereals. *Can. J. Plant Sci.*
- Gazanchian, A., Hajheidari, M., Sima, N.K., and Salekdeh, G.H. 2007. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 291-300.
- Genc, Y., McDonald, G.K. y Tester, M. 2007. Reassessment of tissue Na+ concentration as a criterion for salinity tolerance in bread wheat. *Plant, Cell and Environment* 30, 1486–1498.
- Ghesquière, M., Emile, J.C., Jadas-Hécart, J., Moussetm, C., Traineau, R., Poisson, C. 1996. *Firs in vivo* assessment of feeding value of festulolium hybrids derived from *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* and selection palatability. *Plant Breeding*. 115, 238-244.
- Githinji, L.J.M., Dane, J.H. y Walker, R.H. 2009. Water-use patterns of tall fescue and hybrid bluegrass cultivars subjected to ET-based irrigation scheduling. *Irrig Sci* 27, 377–391. <https://doi.org/10.1007/s00271-009-0153-4>
- Glenn, E.P. 1987. Relationship between cation accumulation and water content of salt-tolerant grasses and sedge. *Plant, Cell and Environment*, 10 (3): 205-212.
- Goering, H. y Van Soest, P. 1970. Forage fiber analysis. *Agric. Handb.* 379, USDA. Washington. 20 pp
- González, L.M., González, M.C. y Ramirez, R. 2002. Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. *Cultivos Tropicales*, Vol. 23, no. 2, p. 27-37.
- Gorgas, J. y Bustos, M. 2008. Dinámica y evaluación de los suelos de Córdoba con problemas de drenaje, salinidad y alcalinidad sódica. En: *La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria*. 47-62 pp.
- Gorham, J., Hughes, L. and Wyn Jones, R. 1980. Chemical composition of salt-marsh plants from Ynys Môn (Anglesey): the concept of physiotypes. *Plant, Cell and Environment*, 3 (5): 309-318.

- Gorham, J., Mc. Donnell, E.M. and Wyn Jones, R.G. 1984. Salt tolerance in the Triticeae: growth and solute accumulation in leaves of *Leymus sabulosus*. *Journal of Experimental Botany*, 35 (7): 1200-1209.
- Gowda, S.J.M., Randhawa, G.J., Bisht, I.S., Firke, P.K., Singh, A.K., Abraham, Z. and Dhillon, B.S. 2012. Morpho-agronomic and simple sequence repeat-based diversity in colored rice (*Oryza sativa* L.) germplasm from peninsular India. *Genet. Resour. Crop Ev.* 59:179–189.
- Gower, J.C. 1967. A Comparison of Some Methods of Cluster Analysis *Biometrics*. Vol. 23, No. 4, pp. 623-637. Published by: International Biometric Society. DOI: 10.2307/2528417
- Gower, J.C. 1975. Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40, 33–51. <https://doi.org/10.1007/BF02291478>
- Griffa, S., Ribotta, A., López Colomba, E., Tommasino, E., Carloni, E., Luna, C., and Grunberg, K. 2010. Evaluation seedling biomass and its components as selection criteria for improving salt tolerance in Buffel grass genotypes. *Grass and Forage Science*, 65(3), 358-361.
- Groot, J.C. y Neuteboom, J.H. 1997. Composition and digestibility during ageing of Italian ryegrass leaves of consecutive insertion the same levels. *J. Sci. Food Agric.* 75: 227–236.
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C. y Ramesh, B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr Sci* 70: 45–54
- Ha, S.B., Wu, F.S. and Thorne, T.K. 1992. Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Rpt.* 11: 601–604.
- Hallauer, A. 1988. Breeding systems. In: K. Frey ed. "Plant Breeding II" Iowa State Un. Press. Iowa.
- Hallauer, A.R., Carena, M.J., Miranda, J.B. 2010. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa state university press, Oxford
- Hamada, H.M., Petrino, M.G., Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6465-6469.
- Hand, M.L., Cogan, N.O.I., Stewart, A.V. y Forster, J.W. 2010. Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetic of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evol. Biol.* 10:303.
- Hand, M.L., Cogan, N.O. & Forster, J.W. 2012 a. Molecular characterisation and interpretation of genetic diversity within globally distributed germplasm collections of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and meadow fescue (*F.pratensis* Huds.). *En: Theor. Appl. Genet.* 124(6):1127–1137.
- Hand, M.L., Cogan, N.O. & Forster, J.W. 2012 b. Genome-wide SNP identification in multiple morphotypes of allohexaploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *BMC Genomics* 13, 219.
- Hannaway, D., Fransen, S., Cropper, J., Teel, M., Chaney, M., Griggs, T., Halse, R., Hart, J., Cheeke, P., Hansen, D., Klinger, R., Lane, W. 1999. Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Oregon State University. PNW 504.
- Hannon, N. and Bradshaw, A.D. 1968. Evolution of salt tolerance in two coexisting species of grass. *Nature*, 220(5174), 1342.
- Hanselin, M.H. y Eggen, T. 2005. Salinity tolerance during germination of seashore halophytes and salt tolerance grass cultivars. *Seed Sci. Res.* 15: 43-50.
- Harlan, J.R. 1983. The scope for collection and improvement of forages plants. In: Mc Ivor, J. G. and Bray, R. A. Eds. Genetic Resources of Forage Plants. CSIRO Australia.

- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. y Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review Plant Physiology Plan Molecular Biology*. 51:453-499.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricult. Exptl. Station Circular*, 347, 1–32.
- Hoffman, P.C., Lundberg, K.M., Bauman, L.M. and Shaver, R.D. 2003. In vitro NDF Digestibility of Forages: The 30 vs. 48 hour debate. *Focus on Forage*. 5: 1-3.
- Holder, T.L., West, C.P., Turner, K.E., Mc. Connell, M.E. and Piper, E.L. 1994. Incidence and viability of *Acremonium* endophytes in tall fescue and meadow fescue plant introductions. *Crop Sci*. 34: 252–254.
- Hopkins, A.A., Saha, M.C y Wang, Z.Y. 2007. Tall fescue on line monograph. Breeding, genetics and cultivars. <http://forages.oregonstate.edu/is/book/tf21c/Tall-fescue-breeding.pdf>
- Horst, G.L. y Taylor, R.M. 1983. Germination and initial growth of Kentucky bluegrass in soluble salts. *Agronomy Journal* 75, 679–681.
- Horst, G.L. y Beadle, N.B. 1984. Salinity affects germination and growth of Tall Fescue cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 109, 419–422.
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 519-570.
- Huang, B. y Fry, J.D. 1998. Root Anatomical, Physiological, and Morphological Responses to Drought Stress for Tall Fescue Cultivars. *Crop Sci*. 38 (4): 1017-1022.
- Huang, B.R. y Gao, H.W. 2000a. Growth and carbohydrate metabolism of creeping beetgrass cultivars in response to increasing temperatures. *Crop Sci*. 40:1115–1120
- Huang, B. y Gao, H. 2000b. Root physiological characteristic associated with drought resistance in tall fescue cultivars. *Crop Sci*. 40: 196-203.
- Huang, B., Fry, J.D. y Wang, B. 1998. Water relations and canopy characteristics of tall fescue cultivars during and after drought stress. *HortScience* 33:837–840.
- Huff, D.R. 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Sci*. 37:557-564.
- Hunt, O.J. 1965. Salt Tolerance in Intermediate Wheatgrass. *Crop Sci*. 5 (5).
- Iannone, L.J., Pinget, A.D., Nagabhyru, P., Schardl, C.L., De Battista, J.P. 2012. Beneficial effects of *Neotyphodium tembladerae* and *Neotyphodium pampeanum* on a wild forage grass. *Grass and Forage Science* 67 (3):382-390.
- Ibañez, M.A. 1997. Plasticidad fenotípica en *Festuca arundinacea* cv. El Palenque MAG. Tesis Magister Scientiae. INTA-UNR.
- Igras, J. y Jankowiak, J. 1998. Effect of nitrogen fertilization on water use by plants growing feld. *Fragm. Agronomica* 2/98: 72-86. (In Polish).
- Ilahi, I. 1982. Plant behaviour under water stress. *Pakistan Journal of Botany* 14, 40-44.
- Imbellone, P.A., Gimenez, J.E. y Panigatti, J.L. 2010. Suelos de la Región Pampeana: Procesos de formación. Ed. INTA. Buenos Aires. 320 pp.
- Instituto Nacional de Semillas (INASE). 1995. Resolución 067/95. Ministerio de Economía, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA). Febrero 1995, 4 pp.
- Instituto Nacional de Semillas (INASE). 2020. Catálogo de cultivares. Instituto Nacional de Semillas, Registro Nacional de Cultivares. www.inase.gov.ar 2020
- InfoStat, 2015. InfoStat/Profesional, Versión 2015. Software Estadístico. Grupo Infostat/FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

- Ingram, J. y Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47:377–403
- Insua, J.R., Agnusdei, M.G. y Di Marco, O.N. 2012. Calidad nutritiva de láminas de dos cultivares de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb). *RIA*. Vol 38, N°2.
- Insua, J.R., Di Marco, O.N. y Agnusdei, M.G. 2013. Calidad nutritiva de láminas de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) en rebrotes de verano y otoño. *RIA* Vol. 39 N°3 pp. 267- 272.
- Ixtaina, V.Y. y Mujica, M.M. 2004. Variability in the salt tolerance in *Lotus glaber* Mill. genotypes selected in situ in a saline basin of the Flooding Pampas (Province of Buenos Aires, Argentina). *Revista Pastos*. 34.
- 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.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Murali, P.V., Gomathinayagam, M., Lakshmanan, G.M.A. and Panneerselvam, R. 2008. Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 62: 105–111
- James, R.A., Caemmerer, S.V., Condon, A.G.T., Zwart, A.B y Munns, R. 2008. Genetic variation in tolerance to the osmotic stress component of salinity stress in durum wheat. *Functional Plant Biology* 35, 111–123.
- Jernstedt, J.A. y Bouton, J.H. 1985. Anatomy, morphology and growth of tall fescue rhizomes. *Crop Sci.* 25:539–542.
- Jones, J.B. 1991. Kjeldahl Method for Nitrogen Determination. Athens, GA: Micro-Macro Publishing, pp:79
- Jones, E.S., Dupla, M.P., Kölliker, R., Drayton, M.C. y 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.
- Karcher, D., Richardson, M., Landreth, J. 2007. Drought tolerance of tall fescue and bluegrass cultivars. *Ag. Exp. Stn. Res. Ser.* 557:17–20
- Karcher, D.E., Richardson, M.D., Hignight, K., Rush, D. 2008. Drought tolerance of tall fescue populations selected for high root/shoot ratios and summer survival. *Crop Sci.* 48:771–777
- Kaushik, A., Saini, N., Jain, S., Rana, P., Singh, R.K. and Jain, R.K. 2003. Genetic analysis of a CSR10 (indica) × Taraori Basmati F3 population segregating for salt tolerance using ISSR markers. *Euphytica*, 134 (2): 231-238.
- Kearsey, M.J. y Pooni, H.S. 1996. *The genetical analysis of quantitative traits* (Chapman & Hall).
- Khan, M.B., Hussain, N. and Iqbal, M. 2001. Effect of water stress on growth and yield components of maize variety YHS 202. *Journal of Research in Science*, 12(1), 15-18.
- Khedim, A., Khelifi, H.E., Nabi, M., Hadj-Omar, K., Mefti, M., Maouche, S., Bellague, D., M’Hammedi Bouzina, M., Laouar, M., Merabey, M.A., Bouzerzou, H. y Abdelguerfi, A. 2008. Etude du comportement vis-à-vis de la Sécheresse estivale de trois graminées fourragères: *Dactylis glomerata* L., *Festuca arundinacea* Schreb., *Phalaris acuática* Desf. *Options Méditerranéennes Series A*, No 79, Pp: 319-322.
- 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. Molecular breeding for the genetic improvement of forage crop 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*, pp.275.

- Kizis, D., Lumberras, V., Page`s, M. 2001. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett* 498:187–189
- 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., Lui, B., Sorrells, M., Heun, M., Franckowiak, Hoffman, D., Skadsen, R. y Steffenson, B.J. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet*, 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.
- Kopitke, P.M., Blamey, F.P.C., Kinraide, T.B., Wang, P., Reichman, S.M. y Menzies, N.M. 2011. Separating multiple, short-term, deleterious effects of saline solutions on the growth of cowpea seedlings. *New Phytologist* 189, 1110–1121.
- Kramer, P. and Boyer, J. 1995. *Water Relations of Plants and Soils* (Book). <http://udspace.udel.edu/handle/19716/2830>
- Kuai, B., Dalton, S.J. y Bettany, A.J. 1999. Regeneration of fertile transgenic tall fescue plants with stable highly expressed foreign gene. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 58:149–154
- Kuldau, G.A. y Bacon, C.W. 2008. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control* 46 (1):57-71.
- Lacerda, C.F., Cambraia, J., Oliva, M.A., Ruiz, H.A. and Prisco, J.T. 2003: Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stresses. *Environ. Exp. Bot.* 49, 107–120.
- Langer, R.H.M. 1979. *How grasses grow*. Institute of Biology. Studies in biology no. 34. Edward Arnold (publishers) Ltd. Southampton. p. 64
- Lanzillota, J.J. 2017. Caracterización y evaluación de diferentes morfotipos de festuca alta (*Schenodorus phoenix* Scop. Holub) por atributos de producción de forraje y semillas. Tesis de grado Ingeniería Agronómica. UNNOBA.
- Láuchi, A. 1984. Mechanisms of salt tolerance in plants. *California Agriculture*. 38(10): 1820.
- Lauvergeat, V., Barre, P. & Bonnet, M. 2005. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca–Lolium* complex of grasses. *Mol. Ecol. Notes* 5, 401–405.
- Lavado, R. 2008. Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. En: *La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria*. 11-15 pp.
- Lavado, R.S. 2016. *Cómo mejorar la producción forrajera en suelos afectados por sales. Resúmenes expandidos. Características de los suelos salinos-sódicos y su relación con los cultivos*. ISBN 978-987-46433-0-8, p. 03-08.
- Leidi, E.O. y Pardo, J.M. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino, que hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*. UNR. N°2. 069-090.
- Leidi, E.O. y Pardo, J.M., 2008. Bases moleculares de la resistencia a estreses abióticos. *La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal* 1: 199-230. <http://hdl.handle.net/10261/57134>
- Lemaire, G. y Agnusdei, M. 2000. Leaf tissue turnover and efficiency of herbage utilization. En: Lemaire, G.; Hodgson, J.; de Moraes, A.; Carvalho, P.C. de F.; Nabinger, C. (Eds.) *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. CAB International. pp. 265-287.
- Li, Y.C., Roder, M.S., Fahima, T., Kirzhner, V.M., Beiles, A., Korol, A.B., y Nevo, E. 2002. Climatic effect on microsatellite diversity in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) at Yehudiyya microsite, Israel. *Heredity*, 89: 127-132.

- Lopes da Silva Santos Simões, N.M. 2015. Eficiencia del uso del agua y persistencia de gramíneas perennes en las condiciones de secano en el Mediterráneo. *Revista Pastos* 45(1): 59-62.
- Lopez Gay, E.M. 1998. Competencia, defoliación y evaluación genética en *Festuca arundinacea* cv. "El Palenque MAG". Tesis Tesis Magister Scientiae. INTA-UNR.
- Loss, B.P. 1994. Morphological variation in Dutch perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations, in relation to environmental factors. *Euphytica*, 74: 97-107.
- Lou, Y., Hu, L., Chen, L., Sun, X., Yang, Y., Liu, H., Xu, Q. 2015. Association Analysis of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers with Agronomic Traits in Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *PLoS ONE* 10 (7): e0133054. doi:10.1371/journal.pone.0133054
- Loveless, M. y Hamrick, J. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, (15), pp. 65-95.
- Lübberstedt, T. 2005. Objectives and benefits of molecular breeding in forage species. XX International Grassland Congress.
- Lunt, O.R., Youngner, V.B. and Oertli, J.J. 1961. Salinity Tolerance of Five Turfgrass Varieties. *Agron. J.*, 53: 247-249. doi:10.2134/agronj1961.00021962005300040012x
- Luo, H., Xie, L., Zeng, J., Xie, J. 2015. Biosynthesis and Regulation of Bioprotective Alkaloids in the Gramineae Endophytic Fungi with Implications for Herbivores Deterrents. *Curr Microbiol.* 71(6):719-724. doi:10.1007/s00284-015-0906-7
- Maas, E.V. 1986. Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research*, 1: 12-26.
- Maas, E.V. and Hoffman, G.J. 1977. Crop salt tolerance. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*, 102: 115-134.
- Maciel, M. 2018. Análisis fenotípico y genético del crecimiento inicial de familias de medio-hermanos de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth et Dewey) en condiciones de salinidad y sequía. Tesis Doctorado en Ciencias Agrarias. UNR.
- Maddaloni, J. y Ferrari, L. 2001. *Festuca alta*. En: "Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina". (Eds. Maddaloni, J. y Ferrari, L.) pp. 165-182 (INTA, Universidad Nacional de Lomas de Zamora).
- Maddaloni, J. y Ferrari, L. 2005. *Festuca Alta*. En: Madaloni J, Ferrari L. (eds.) Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. 2º ed. Bs.As.: UNLZ-INTA, p.165-182.
- Majidi, M.M., Mirlohi, A. y Amini, F. 2009. Genetic variation, heritability and correlations of agro- morphological traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Euphytica* 167: 323- 331.
- Malinowski, D. y Belesky, D. 2000. Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses. *Crop Sci.* 40. 10.2135/cropsci2000.404923x.
- Malinowski, D.P., Alloush, G.A. y Belesky, D.P. 1998. Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophilum*. *Plant Soil* 295, 1-12.
- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Kishorekumar, A., Sankar, B., Somasundaram, R., Sridharan, R. and Panneerselvam, R. 2007. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. By propiconazole under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57(1), 69-74.
- Mantel, N.A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Marcum, K.B. y Kopec, D.M. 1997. Salinity tolerance of turfgrasses and alternative species in the subfamily chloridodeae (Poaceae). *International Turfgrass Society Research Journal* 8, 735–742.

- Marcum, K.B., Anderson, S.J. y Engelke, M.C. 1998. Salt gland ion secretion: a salinity tolerance mechanism among five Zoysiagrass species. *Crop. Sci.* 38, 806–810.
- Maricle, B.R., Cobos, D.R., Campbell, C.S. 2007. Biophysical and morphological leaf adaptations to drought and salinity in salt marsh grasses. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 60, Issue 3, July 2007, Pages 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.01.001>
- Mariotti, J.A. y Collavino, N.G. 2014. Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Plants, Ed 2. Academic Press, Boston
- Martín, B., Sosa, O., Magra, G., Zerpa, G., y Besson, P. 2012. Emergencia de forrajeras en un suelo salino-alcalino tratado con yeso. *Revista Argentina de Producción Animal*, 32(2), 157-164.
- Martínez, E. 2020. Respuesta a la selección en festuca alta para suelos salino-sódico. Tesis Maestría en Genética Vegetal. UNR
- Matches, A. 1979. Management. In: R. Buckner and L. Bush Ed. "Tall Fescue". Agronomy Monograph N° 20. A.S.A., C.S.S.A., S.S.S.A. Wisconsin. USA.
- Matsukura, K., Shiba, T., Sasaki, T., Yoshida, K., Matsumura, M. 2014. Dynamics of *Neotyphodium uncinatum* and N-formylololine in Italian ryegrass, and their relation to insect resistance in the field. *Journal of Applied Microbiology* 116, 400e407.
- Meneguzzo, S., Navari-Izzo, F. and Izzo, R. 2000. NaCl effects on water relations and accumulation of minerals in shoots, roots and cell sap of wheat seedling. *Journal of Plant Physiology* 156: 711–716
- Merewitz, E., Meyer, W., Bonos, S. y Huang, B.R. 2010. Drought stress responses and recovery of Texas Kentucky hybrids and Kentucky bluegrass genotypes in temperate climate conditions. *Agron. J.* 102:258–268
- Mian, M., Hopkins, A. y Zwonitzer, J. 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Sci.* 42, 944-950.
- Mian, M.A.R., Saha, M.C., Hopkins, A.A. and Wang, Z.Y. 2005. Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses. *Genome*, 48(4), 637-647.
- Mieres, L., Campos, R., Oprandi, G., Colombo, F., Rotella, F., Parodi, M.I. y Gambaudo, S. 2012. Diagnóstico y rehabilitación de suelos halomórficos. *Voces y Ecos*, año XIV, N° 29. ISSN 0328-1582.
- Miñón, D.P. 2013. Festuca alta. Producción de Forraje y Carne en los Valles Regados Patagónicos. EEA Valle Inferior-Convenio Provincia de Río Negro-INTA.
- Mitra, J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*. Vol. 80, No. 6, pp. 758-763
- Monteoliva, M.I., Bustos, D. y Luna, C. 2019. Abordajes fisiológicos para el estudio del estrés abiótico en plantas: disertaciones y protocolos. Buenos Aires. Ediciones INTA. 87 p. ISBN 978-987-521-986-1
- Morgante, M. and Olivieri, M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3: 175-182.
- Moy, M., Li, H.M., Sullivan, R., White, Jr. J.F. y Belanger, F.C. 2002. Endophytic fungal β -1, 6-glucanase expression in the infected host grass. *Plant Physiology* 130 (3):1298-1308.
- Muhammad, A. y Nudrat, A.A. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnology Advances*. 27. 744–752.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25 (2): 239-250.

- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R. 2010. Approaches to identifying genes for salinity tolerance and the importance of time scale. En: *Plant stress tolerance. Methods and protocols*. Ramanjulu S. (ed). Oklahoma- EEUU, pp. 25-38.
- Munns, R. y Gilliam, M. 2015. Salinity tolerance of crops – what is the cost? *New Phytologist* 208: 668–673.
- Munns, R. and James, R.A. 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil*, 253:201-218.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59:651-681.
- Munns, R., Husain, S., Rivelli, A.R., James, R.A., Condon, A.G.T., Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Schachtman, D.P., Hare, R.A. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. In: Horst W.J. et al. (eds) *Progress in Plant Nutrition: Plenary Lectures of the XIV International Plant Nutrition Colloquium. Developments in Plant and Soil Sciences*, vol 98. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2789-1_7
- Naylor, A.W. 1972. Water deficits and nitrogen metabolism. *Water Deficits and Plant Growth*. T.T. Kozlowski, ed., vol. 3, pp: 241-254. Academic Press, New York.
- Nguyen, H.T and Sleper, D.A. 1983a. Theory and application of half-sibs matings in forage grass breeding. *Theor. Appl. Genet.* 64: 187-196.
- Nguyen, H. y Sleper, D. 1983b. Genetic variability for seed yield and reproductive characters in tall fescue. *Crop Sci.* 23, 621-626.
- Nguyen, H. y Sleper, D. 1985. Diallel analysis of seed yield and reproductive characters in two populations of tall fescue. *Z. Pflanzenzuchtg.* 94: 111-127
- Nguyen, H., Sleper, D.A. y Matches, A.G. 1982. Inheritance of forage quality and its relationship to leaf tensile strength in tall fescue. *Crop Sci.* 22, 67-72.
- Niazkhani, S.M., Zanjani, B.M., Zeynali, M., Ahmadpour, S. y Eivazi, A.R. 2014. Assessing of morph-physiological traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* schreb.) germplasms. *Basic Research Journal of Agricultural Science and Review* ISSN 2315-6880 Vol. 3(1) pp. 01-05
- Norton, M.R., Volaire, F., Lelievre, F. 2006. Summer dormancy in *Festuca arundinacea* Schreb: the influence of season of sowing and a simulated mid-summer storm on two contrasting cultivars. *Aust. J. Agric. Res* 57:1267–1277
- Oba, M. and Allen, M. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 589-596.
- Oba, M. and Allen, M. 2005. In vitro digestibility of forages. *Proc. Tri-State Dairy Nutr. Conf. Ft. Wayne, IN.* Pages: 81-91
- Oberhofer, M., Güsewell, S. y Leuchtmann, A. 2013. Effects of natural hybrid and non hybrid *Epichloë* endophytes on the response of *Hordelymus europaeus* to drought stress. *New Phytologist* 201 (1):242-253.
- Oliveira, J. y Castro, V. 1997. Incidence and viability of *Acremonium* endophytes in tall fescue accessions from North Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44, 519–522. <https://doi.org/10.1023/A:1008620725857>
- Oliveira, M.M., Carmona, M.A., Santos, M.J. 2008. Saline effects on forage growth and quality. *Sustainable Mediterranean grasslands and their multifunctions. Options Méditerranéens: serie A. Séminaires Méditerranéens* n. 79.89-92.
- Oliveira, K.M., Pinto, L.R., Marconi, T.G., Mollinari, M., Ulian, E.C., Chabregas, S.M., Falco, M.C., Burnquist, W., Garcia, A.A.F. y Souza, A.P. 2009. Characterization of

new polymorphic functional markers for sugarcane. *Genome*, Vol. 52, No. 2 : pp. 191-209
<https://doi.org/10.1139/G08-105>

- Pagano, E.M. 1995. Variabilidad genética en la población de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) El Lucero MAG. Tesis Magister Scientiae. INTA-UNR.
- Pagano, E. y Rimieri, P. 2001. Genética y mejoramiento de especies forrajeras. Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. José Maddaloni y Liliana Ferrari. INTA. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Facultad de Cs. Agrarias. Pp 357-388.
- Palacios, N.S. 2015. Estudios genéticos de genotipos de *Lolium multiflorum* creciendo en suelo halomórfico y no halomórfico. Tesis final de grado para optar al título de Licenciado en Genética, UNNOBA. 93 pág.
- Palacios, N.S., Lavandera, J., Fioravanti, N. y Acuña, M. 2013. Análisis multivariado para la evaluación de raigrás anual diploide en condiciones salino-sódicas. *Journal of Basic & Applied Genetics*. Volumen 24. Issue 1, pp: 163.
- Palacios, N.S., Maciel, M.A., Andrés, A.N. y Pistorale, S.M. 2015. Comportamiento de familias de agropiro alargado en un suelo sódico. *Revista Argentina de Producción Animal*, Vol 35, Supl. 1, pp: 169.
- Pallardy, S.G y Rhoads, J.L. 1993. Morphological adaptations to drought in seedlings of deciduous angiosperms. *Canadian Journal of Forest Research*, 23(9): 1766-1774, <https://doi.org/10.1139/x93-223>
- Panaccione, D.G. 2005. Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 251 (1):9-17.
- Pardo, J.M. 2010. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology*. Volume 21, Issue 2, Pages 185-196. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.005>
- Parida, A.K. y Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Parish, J.A., McCann, M.A., Watson, R.H., Paiva, N.N., Hoveland, C.S., Parks, A.H., Bouton, J.H. 2003. Use of nonergot alkaloid-producing endophytes for alleviating tall fescue toxicosis in stocker cattle. *Journal of Animal Science*, 81(11), 2856-2868. doi:10.2527/2003.81112856x
- Parodi, L.R. 1958. Descripción de las plantas cultivadas. *Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería*. 1. 116.
- Parthiban, S., Govindaraj, P., Senthilkumar, S. 2018. Comparison of relative efficiency of genomic SSR and EST-SSR markers in estimating genetic diversity in sugarcane. *3 Biotech*, 8:144
- Pasternak, D., Sagih, M., DeMalach, Y., Keren, Y. y Shaffer, A. 1995. Irrigation with brackish water under desert conditions XI. Salt tolerance in sweet-corn cultivars. *Agricultural Water Management*. Volume 28, Issue 4, Pages 325-334 [https://doi.org/10.1016/0378-3774\(95\)01170-6](https://doi.org/10.1016/0378-3774(95)01170-6)
- Paterson, J., Forcherio, C., Larson, B., Samford, M., and Kerley, M. 1995. The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. *J. Anim. Sci.* 73:889-898.
- Pavetti, D.R., Sleper, D.A., Craig, A.R. y Krause, G.F. 1994. Genetic variation and relationship of quality traits between herbage and seed of tall fescue. *Crop Sci.* 34, 427-431.
- Pecio, A., Wach, D., Kocoń, A. y Józefaciuk, G. 2014. A method for precision irrigation control in greenhouse experiment and its use to study drought stress effect on spring barley. *Methodology of system approach to study drought tolerance in barley*. Institute of Plant Genetics PAS, Poznań, pp: 29-46.

- Pesqueira, J. 2008. Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pessaraki, M.P. y Kopec, D.M. 2008. Comparing growth responses of selected cool-season turfgrasses under salinity and drought stresses. *Turfgrass, landscape and urban IPM research summary*. 55-60.
- Pirnajmedin, F., Majidi, M.M., Gheysari, M. 2015. Root and physiological characteristics associated with drought tolerance in Iranian tall fescue. *Euphytica* 202:141-155
- Pistorale, S., Bazzigalupi, O. y Andrés, A. 2009. Germinación de agropiro alargado en condiciones de salinidad: estimación de parámetros genéticos. In *Actas 1º Congreso de la Red Argentina de Salinidad*. Córdoba (Vol. 11).
- Pitman, W.D. 1999. Response of a 'Georgia 5' tall fescue common bermudagrass mixture to season of nitrogen fertilization on the coastal plain. *J. Plant. Nutr.* 22, 1509–1517.
- Pittaro, G. 2014. Caracterización fenotípica y genotípica de germoplasma de *Panicum coloratum* L var. *coloratum* para la tolerancia a la salinidad. Tesis Para optar al Grado Académico Magister en Ciencias Agropecuarias Mención en Producción Vegetal. 90 pág.
- Popay, A.J., Tapper, B.A., and Podmore, C. 2009. Endophyte-infected meadow fescue and loline alkaloids affect Argentine stem weevil larvae. *N. Z. Plant Prot.* 62: 19-27.
- Poppi, D.P., Hughes, T.P. y Huiller, P.J. 1987. Intake of pasture by grazing ruminants. In: "Livestock feeding on pasture". (Eds. Nicol A.M.) Occasional publication N° 10 pp. 55-63. (New Zealand Society of Animal Production).
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2(3), 225-238.
- Praat, J.P. 1995. Row spacing and seeding rate interactions in perennial ryegrass and tall fescue swards established by direct drilling (no tillage). Tesis Ph.D. Massey University. Palmerston North. New Zealand. 278p
- Priano, L.J. y Pilatti, M.A. 1989. Tolerancia a la salinidad de forrajeras cultivadas. *Ciencia del Suel.*, 7, 113-116.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus
- Qadir, M., Quillerou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R.J., Drechsel, P. y Noble, A.D. 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum* 38, 282–295.
- Qian, Y.L., Engelke, M.C., Foster, M.J.V. 2000. Salinity effects on Zoysigrass cultivars and experimental lines. *Crop Sci.* 40, 488–492.
- Qian, Y.L., Wilhelm, S.J., Marcum, K.B. 2001. Comparative responses of two Kentucky bluegrass cultivars to salinity stress. *Crop. Sci.* 41, 1890–1895.
- Rafalski, A., Tingey, S., Williams, J.G.K. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In: Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds) *Plant Molecular Biology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-6951-8_3
- Rajendran, K., Tester, M., and Roy, S.J. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 32 (3): 237-249.
- Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Rio, C., Martín, A., Tous, J. y Trujillo, I. 2005. Variedades de olivo en España. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi. Madrid.

- Ramenda, S. 1996. Ocena zdolności reprodukcyjnej odmian kupkowki pospolitej [*Dactylis glomerata* L.]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 199: pp.71-79. (In Polish).
- Ramírez-Suárez, W.M. y Hernández-Olivera, L.A. 2016. Tolerancia a la salinidad en especies cespitosas. Pastos y Forrajes. 39 (4). 235-245.
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G. and Perrotta, C. 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant, Cell & Environment, 29: 2143-2152. doi:[10.1111/j.1365-3040.2006.01588.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01588.x)
- Rebetzke, G.J., Richards, R.A., Condon, A.G., and Farquhar, G.D. 2006. Inheritance of carbon isotope discrimination in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 150, 97–106. doi: 10.1007/s10681-006-9097-9094
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. y Vivekanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology Volume 161, Issue 11, Pages 1189-1202 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>
- Redmann, R. 1985. Adaptation of Grasses to Water Stress-Leaf Rolling and Stomate Distribution. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 72(4), 833-842. doi:10.2307/2399225
- Reeder, L.R., Nguyen, H.T., Sleper, D.A. y Brown, J.R. 1986. Genetic variability of mineral concentrations in tall fescue grown under controlled conditions. *Crop Sci.* 26, 514-518.
- Reheul, D., De Cauwer, B., Cougnon, M. and Aper, J. 2012. What global and/or European agriculture will need from grasslands and grassland breeding over the next 10–15 years for a sustainable agriculture. In: Barth S. and Milbourne D. (eds) *Breeding Strategies for Sustainable Forage and Turf Grass Improvement*, Springer, pp 3-20.
- Rice, J., Pinkerton, B., Stringer, W., Undersander, D. 1990. Seed production in tall fescue as affected by fungal endophyte. *Crop Sci.* 30: 1303-1305
- Richards, A.J. 1996. Breeding systems in flowering plants and the control of variability. *Folia Geobot* 31, 283–293. <https://doi.org/10.1007/BF02815373>
- Richardson, D.M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D. and West, C.J. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and 10 definitions. *Diversity and Distributions*, 6, 93-107.
- Richardson, M.D., Karcher, D.E., Hignight, K. and Rush, D. 2008. Drought Tolerance and Rooting Capacity of Kentucky Bluegrass Cultivars. *Crop Sci.*, 48: 2429-2436. doi:10.2135/cropsci2008.01.0034
- Rimieri, P. 2006. Análisis genético de la resistencia al stress hídrico en festulolium y sus implicancias y perspectivas en *Digitaria Eriantha* steud. *Journal of Basic and Applied Genetics*. Revista de la Sociedad Argentina de Genética. v. 17, supplement II
- Rimieri, P. y Wolff, R. 2010. La genética y el estado actual de la obtención y adopción de cultivares forrajeros en Argentina. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 21(2).
- Rimieri, P., Scheneiter, O.J., Carrete, J.R. 2002. Pasturas cultivadas en la Región Pampeana húmeda. *IDIA XXI* N° 2: 19-22.
- Rimieri, P., Rosso, B., Carrete, J., Pagano, E.M., Cattoni, M.I., Biagioli, C., Cuyeu, A.R. y Rios, R.D. 2006. Características agronómicas, nutricionales y moleculares de una colección de germoplasma de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.). 29º Congreso argentino de producción animal. *Revista Argentina de Producción Animal*. Vol 26, Supl. 1: 121- 262.

- Roca, W.M. y Ramirez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Coordinador de la Producción de Documentos Originales: Vicente Zapata S., Ed. D., Cali, Colombia. 174p.
- Rosso, B. y Andrés, A. 2009. Caracterización preliminar de germoplasma de agropiro alargado para el mejoramiento genético. Revista Argentina de Producción Animal. Vol 29. Supl.1: 468.
- Rowell, D.L. 1992. Acidez y alcalinidad del suelo. In: Wild, A. ed. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Traducción de la 11a. ed. inglesa por Urbano Terrón, P. y Rojo Hernández, C. Mundi-Prensa, Madrid, 1045. 885-940.
- Rucker, K.S., Kvien, C.K., Holbrook, C.C. and Hook, J.E. 1995. Identification of peanut genotypes with improved drought avoidance traits. Peanut Science, 22(1), 14-18.
- Ruiz, S.C. 2011. Recomendación de Praderas para Sistemas Silvopastorales en la Zona Centro Sur de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile. Serie Actas N° 46. 59.
- 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>
- Saha, M.C. 2013. Tall Fescue. In Cai, H., Yamada, T., Kole, C. (eds), *Genetics, Genomics and Breeding of Forage Crops*. (pp. 58). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Saha, M.C., Mian, M.R., Eujayl, I., Zwonitzer, J.C., Wang, L., and May, G.D. 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. Theoretical and Applied Genetics, 109(4), 783-791.
- Saha, M.C., Mian, R., Zwonitzer, J.C. 2005. An SSR-and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Theor. Appl. Genet. 110(2):323–36.
- Saha, M.C., Cooper, J.D., Mian, M.A., Chekhovskiy, K. and May, G.D. 2006. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. Theor. Appl. Genet. 113(8):1449-58.
- Saha, M.C., Hopkins, A.A. and Wang, Z. 2009. Genomic tools for improvement. p. 377-394. In H.A. Fribourg, D.B. Hannaway, and C.P. West (ed.) Tall fescue for the twenty-first century. Agron. Monogr. 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Saikkonen, K., Mikola, J. y Helander, M. 2015. Endophytic phyllosphere fungi and nutrient cycling in terrestrial ecosystems. *Current Science*, 109(1), 121-126.
- Salekdeh, G.H., Reynolds, M., Bennett, J. y Boyer, J. 2009. Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. Trends in Plant Science; 14:488-496.
- Sandhu, D., Cornacchione, M.V., Ferreira, J.F.S y Suarez, D.L. 2017. Variable salinity responses of 12 alfalfa genotypes and comparative expression analyses of salt response genes. Scientific Repo Rts. 7:42958. DOI: 10.1038/srep42958.
- Sarker, A.M., Rahman, M.S., Paul, N.K. 1999. Effect of soil moisture on relative leaf water content chlorophyll, proline and sugar accumulation in wheat. J. Agrono. Crop Sci. 183:225–229
- Schardl, C.L., Leuchtman, A. y Spiering, M.J. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. Annual Review of Plant Biology 55:315-340.
- Schardl, C.L., Grossman, R.B., Nagabhyru, P., Faulkner, J.R. y Mallik, U.P. 2007. Loline alkaloids: Currencies of mutualism. Phytochemistry 68 (7):980-996.
- Scheneiter, J.O. 2002. Producción de forraje y de carne en pasturas de *Festuca* alta fertilizadas con nitrógeno o asociadas con trébol blanco. Reunión Anual de forrajeras.
- Scheneiter, J.O. 2005. Manejo de pasturas de festuca alta. Jornada a campo: Avances en producción y manejo de pasturas. E.E.A. INTA Pergamino. Sitio Argentino de Producción Animal. pp. 3

- Scheneiter, J.O. y Agnusdei, M.G. 2011. The role of N in meat production: some experiences in the humid and sub-humid regions of Argentina Pampas. In Scheneiter J.O. and Mendez D.G. (eds). Fertilization of pastures in the north of the province of Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Proyecto Regional Ganadero, Technical Report 2, 50-69. General Villegas, Argentina.
- Scheneiter, J.O., Camarasa, J., Carrete, J. R. y Amendola, C. 2014. Is the nutritive value of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) related to the accumulated forage mass? *Grass and Forage Science* 71(1). DOI:10.1111/gfs.12154
- Scheneiter, J.O., Kaufmann, L.L., Ferreyra, A.R. y Llorente, T. 2015. The herbage productivity of tall fescue in the Pampas region of Argentina is correlated to its ecological niche. *Grass and Forage Science*. 71. 403–412
- Schiller, J.M.A. and Lazenby, A. 1975. Yield performance of tall fescue (*Festuca arundinacea*) populations on the Northern Tableland of New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 15(74), 391-399.
- 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*.
- Schmid, S. y Christensen, M. 1999. Ryegrass endophyte: host/fungus interaction. Vol 7 (1999): *Ryegrass Endophyte: An Essential NZ Symbiosis*
- Seal, A.G. 1983. DNA variation in *Festuca*. *Heredity* 50:225–236.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current opinion in Plant Biology*, 10(3), 296-302.
- Serrano, H. 1953. Report on the collection of forage species coming from England. *Anales de la Sociedad Rural Argentina*, 87, 26-29.
- Setter, T.L., Watersa, I., Stefanova, K., Munns, R. y Barrett-Lennard, E.G. 2016. Salt tolerance, date of flowering and rain affect the productivity of wheat and barley on rainfed saline land. *Field Crops Research*. 194, 31–42.
- Sevilla, G. y Spada, M.D.C. 2014. Avances en festuca alta. Red de ensayos comparativos de producción de materia seca bajo corte de cultivares de festuca alta. INTA, EEA Pergamino.
- Shabala, S. 2017. *Plant stress physiology* (2nd Edition). Boston, USA: CAB International.
- Shabala, S., Bose, J. y Hedrich, R. 2014. Salt bladders: do they matter? *Trends in Plant Science* 19, 687–691.
- Shahabzadeh, Z., Mohammadi, R., Darvishzadeh, R. and Jaffari, M. 2020. Genetic structure and diversity analysis of tall fescue populations by EST-SSR and ISSR markers. *Molecular Biology Reports* vol: 47,pp: 655–669
- Shahzad, A., Ahmad, M., Iqbal, M., Ahmed, I. y Ali, G.M. 2012. Evaluation of wheat landrace genotypes for salinity tolerance at vegetative stage by using morphological and molecular markers. *Genetics and Molecular Research* 11: 679–692. DOI:10.4238/2012.March.19.2.
- Shannon, M.C. 1985. Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant and Soil*, 89, 227-241.
- Shannon, M.C. 1997. Adaptation of plants to salinity. *Advances in Agronomy*, 60: 75-120.
- Sharma, M.K., Kumar, R., Solanke, A.U., Sharma, R., Tyagi, A.K., Sharma, A.K. 2010. Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Mol Genet Genomics*. 284(6):455-475. doi:10.1007/s00438-010-0580-1

- Sheffer, K.M., Dunn, J.H., Minner, D.D. 1987. Summer drought response and rooting depth of three cool-season turfgrasses. *Hort Sci* 22:296–297
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115:327–334
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:217–223
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:410–417
- Sinclair, T.R., Purcell, L.C., Andy King, C., Sneller, C.H., Chen, P., Vadez, V. 2006. Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation. *Field Crops Res.* 101, 68-71.
- Sinclair, T.R., Salado-Navarro, L.R., Salas, G. and Purcell, L.C. 2007. Soybean yields and soil water status in Argentina: Simulation analysis. *Agric. Syst.* 94: 471-477.
- Sleper, D.A. 1985. Breeding tall fescue. *Plant Breeding Reviews*, 313-342.
- Sleper, D. 1987. Forage grasses. In: W. Fehr ed. *Principles of cultivars development*. Part II. Mc Millian Pub. Co. N. Y. pp 370.
- Sleper, D., Nelson, C. y Asay, K. 1977. Diallel and path coefficients analysis of tall fescue (*Festuca arundinacea*) regrowth under controlled conditions. *Can. J. Genet. Cytol.* 19: 557-564
- Smith, J.S.C. and Smith, O.S. 1989. The description and assessment of distances between inbred lines of maize: the utility of morphological, biochemical and genetic description and a scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica* 34:151–161.
- Smith, J.S.C. and Smith, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Adv. Agron.* 47, 85–140.
- Smith, D., Dobrenz, A.K., Schonhorst, M.H. 1981. Response of alfalfa seedling plants to high levels of chloride - salts. *Journal of Plant Nutrition.* 4: 143-174.
- Soh, A.C., Fraker, R.V., Chilcote, D.O. y Sleper, D.A. 1984. Genetic variation in acid detergent fiber, neutral detergent fiber, hemicelluloses, crude protein and their relationship with in vitro dry matter digestibility in tall fescue. *Crop Sci.* 24, 721-727.
- Soleimani, M., Hajabbasi, M.A., Afyuni, M., Mirolohi, A., Borggaard, O.K. y Holm, P.E. 2010. Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *International Journal of Phytoremediation* 12 (6):535-549.
- Song, M., Li, X., Saikkonen, K., Li, C., Nan, Z. 2015. An asexual *Epichloë* endophyte enhances waterlogging tolerance of *Hordeum brevisubulatum*. *Fungal Ecology*. Volume 13, Pages 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.07.004>
- Song, Y., Jiang, X., Zhang, M., Wang, Z., An, X., Zhang, D., Zhang, Z. 2012. Differences of EST-SSR and genomic-SSR markers in assessing genetic diversity in poplar. *For. Stud. China* 14, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11632-012-0106-5>
- Spangenberg, G., Wang, Z.Y., Portykus, I. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Frankel R, Grossman M, Linskens HF, Maliga P, Riley R (eds) *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. Springer, Berlin, pp 127–146
- Sreenivasulu, N., Sopory, S.K., Kavikishor, P.B. 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene.* 388: 113.
- Stanfield, W.D. 1971. *Genética. Teoría y 400 problemas resueltos*. Serie Schaum, McGraw Hill, México. 405 pp.

- Studer, B., Widmer, F., Enkerli, J. and 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.
- Sun, D.F., Ren, W.B., Sun, G.I., Peng, J.H. 2011. Molecular diversity and association mapping of quantitative traits in Tibetan wild and worldwide originated barley. *Euphytica*. Mar 178: 31–43.
- Sun, X.Y., Hu, L.X., Xie, Y., Fu, J.M. 2014. Evaluation of genotypic variation in heat tolerance of tall fescue by functional traits. *Euphytica*.199 (3):247–60.
- Sun, X., Du, Z., Ren, J., Amombo, E., Hu, t., Fu, J. 2015 a. Association of SSR markers with functional traits from heat stress in diverse tall fescue accessions. *BioMed Central Plant Biology* 15:116.
- Sun, X., Xie, Y., Bi, Y., Liu, j., Amombo, E., Hu, t., Fu, J. 2015 b. Comparative study of diversity based on heat tolerante-related morpo-physiological traits and molecular markers in tall fescue accessions. *Sci. Rep.* 5, 18213.
- Szabolcs, I. 1979. Soil Salinization and Alkalinization Processes. Modelling of Soil Salinization and Alkalization. *Agrokemia es Talajtan*. Budapest. Hungrila. 28, 11-26.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. 2nd ed. Sinauer. Sunderland, MA, EEUU. 792 pp.
- Tanksley, S.D. y Mc. Couch, S.R. 1997. Seed Banks and molecular maps: unlocking genetic potencial from the wild. *Science*. Volumen 277: 1063-1066.
- Tavakkoli, E. 2011. Limitations to yield in saline–sodic soils: quantification of the osmotic and ionic regulations that affect the growth of crops under salinity stress. PhD thesis, University of Adelaide.
- Tehrani, M.S., Mardi, M., Sahebi, J., Catalán, P., Díaz-Pérez, A. 2009. Genetic diversity and structure among Iranian tall fescue populations based on genomic-SSR and EST-SSR marker analysis. *Plant Syst. Evol.* 282:57–70.
- Tester, M. and Davenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91 (5): 503-527.
- Thomas, J. y Frakes, V. 1967. Clonal and progeny evaluation in two populations of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Crop Sci.* 7: 55-58.
- Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 50:571–599
- Tian, L., Huang, C., Yu, R., Liang, R., Li, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, X. y Wu, Z. 2006. Overexpression *AtNHX1* confers salt-tolerance of transgenic tall fescue. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (11), pp. 1041-1044
- Tobe, K., Li, X. y Omasa K. 2000. Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Kalidium caspicum* (*Chenopodiaceae*). *Annals of Botany* 85:391–396. DOI: 10.1006/anbo.1999.1077.
- Torello, W.A. y Symington, A.G. 1984. Screening of turfgrass species and cultivars for NaCl tolerance. *Plant and Soil* 82, 155–161.
- Torres Fernandez, F. 2003. Invasive plants of Asturias, *Naturalia Cantabricae*, 2, 18 33-43.
- Traverso, J.E. y Von Der Pahlen, A. 1982. Variabilidad en *Bromus auleticus* (Trin. ex – Nees). INTA. EEA Pergamino. Publicación Técnica 41. 12 p.
- Trujillo, I. y Barranco, D. 1999. Identificación Varietal en Olivo. Consejo Oleícola Internacional. Seminario Internacional sobre innovaciones científicas y su aplicación en la olivicultura y la elaiotecnía. Florencia 1999. 1-10.
- Tuinstra, M.R., Grote, E.M., Goldsbrough, P.B. y Ejeta, G. 1997. Genetic analysis of post-flowering drought tolerance and components of grain development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Mol Breed* 3:439–448

- Turesson, G. 1922. The genotypical response of the plant species to the habitat. *Heredities* (3):211-350.
- Turgeon, A.J. 2005. *Turfgrass management*. 7th Ed. Prentice Hall Englewood Cliffs NJ
- Ubi, B.E., Kölliker, R., Fujimori, M. and Komatsu, T. 2003. Genetic Diversity in Diploid Cultivars of Rhodesgrass Determined on the Basis of Amplified Fragment Length Polymorphism Markers. *Crop Sci.*, 43: 1516-1522. doi:10.2135/cropsci2003.1516
- Van Ginkel, M., Calhoun, D.S., Gebeyehu, G., Miranda, A., Tian-you, C., Pargas Lara, R., Trethowan, R.M., Sayre, K., Crossa, J. y Rajaram, S. 1998. Plant traits related to yield of wheat in early, late, or continuous drought conditions. *Euphytica* 100, 109–121. <https://doi.org/10.1023/A:1018364208370>
- Van Soest, P.J. 1965. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: Voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *Journal Animal Science*. 24, 834-843.
- Van Soest, P.J. 1994. Intake. In “Nutritional ecology of the ruminant”. Pp. 337-353. (Cornell University Press).
- Varea, I. 2013. Estudio de la interacción genético-ambiental en familias de medios hermanos de Trébol Rojo (*Trifolium pratense* L.). Tesis Maestría en Genética Vegetal UNR.
- Vargas Rojas, B. 2005. Agronomical evaluation of six species of forage grass tolerant to salinity in the Tamborada region. All Theses and Dissertations. Paper 5448.
- Varshney, R., Graner, A. and Sorrells, M. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23:48-55.
- Vázquez De Aldana, B.R., Álvarez Martín, A., García Ciudad, A., Zabalgogazcoa, I. y García Criado, B. 2011. El hongo endofítico *Epichloë festucae* y la tolerancia al estrés salino en Festuca rubra. Pastos, paisajes culturales entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI. 183-188.
- Vega, D.J., Di Santo, H., Grassi, E., Castillo, E., Ferreira, V., Bonamico, N. y Ferreira, A. 2018. Diferenciación fenotípica de poblaciones de festuca alta naturalizadas en la región central de Argentina. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus*. 1 (1): 1-8. ISSN: 2618-2734.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agrawal, S., Zhu, J. y Zhu, J. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45: 523-539.
- Vila Aiub, M.M., Gundel, P.E. y Ghera, C.M. 2005. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology*, 30: 49-57. doi:10.1111/j.1442-9993.2005.01423.x
- Vinh, N.T. y Paterson, A.H. 2005. Genome mapping and its implications for improving stress resistance in plants. In “Abiotic stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches”. Eds Ashraf and Harris. Pp 109- 124, Haworth Press, New York.
- Walter, A., Studer, B. and Kölliker, R. 2012. Advanced phenotyping offers opportunities for improved breeding of forage and turf species. *Annals of Botany*, 110 (6): 1271-1279.
- Wang, Z. y Huang, B. 2004. Physiological recovery of kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Sci* 44:1729–1736
- Wang, Z.Y. and Ge, Y.X. 2006. Invited review: recent advances in genetic transformation of forage and turf grasses. *In Vitro Cell Dev-PI*, 42, 1– 18.
- Wang, J.P. and Bughara, S.S. 2008. Evaluation of drought tolerance for Atlas fescue, perennial ryegrass, and their progeny. *Euphytica* 164:113–122.

- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1–14.
- Wang, J., Burgess, P., Bonos, S., Meyer, W.A. y Huang, B. 2017. Differential physiological responses and genetic variations in fine fescue species for heat and drought stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 142 (5): 367–375. 2017. doi: 10.21273/JASHS04121-17
- Watkins, E., Fei, S., Gardner, D., Stier, J., Bughrara, S., Li, D., Bigelow, C., Schleicher, L., Horgan, B. and Diesburg, K. 2011. Low-input turfgrass species for the north central United States. *Applied Turfgrass Sci.* doi: 10.1094/ATS-2011-0126-02-RS.
- Watson, R.H., McCann, M.A., Parish, J.A., Hoveland, C.S., Thompson, F.N. and Bouton, J.H. 2004. Productivity of cow–calf pairs grazing tall fescue pastures infected with either the wild-type endophyte or a nonergot alkaloid-producing endophyte strain, AR542. *J. Anim. Sci.* 82:3388–3393.
- Weising, K., Beyermann, B., Ramser, J. and Kahl, C. 1991. Plant DNA-fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis*, 12: 159-169.
- Welty, R.E., Milbrath, G.M., Faulkenberry, D., Azevedo, M.D., Meek, L. y Hall, K. 1986. Endophyte detection in tall fescue seed by staining and ELISA. *Seed Science and Technology*. 14: 105-116.
- West, C.P., Izekor, E., Turner, K.E. and Elmi, A.A. 1993. Endophyte effects on growth and persistence of Tall Fescue along a water-supply gradient. *Agron. J.*, 85: 264-270. doi:10.2134/agronj1993.00021962008500020019x
- Wheeler, J.L. y Corbett, J.L. 1989. Criteria for breeding forages of improved feeding value: results of a Delphi survey. *Grass and Forage Science*. 44, 77-83.
- White, R.H., Engelke, M.C., Morton, S.J. y Ruemmele, B.A. 1992. Competitive turgor maintenance in tall fescue. *Crop Sci.* 32:251–256.
- White, R.H., Bruneau, A.H. y Cowett, T.J. 1993. Drought resistance of diverse tall fescue cultivars. *Intl. Turf. Soc. Res. J.* 7:607–613.
- White, J.F. and Torres, M.S. 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol. Plant.* 138: 440-446. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01332.x
- Wilman, D., Gao, J. y Altimimi, M.A.K. 1996. Differences between related grasses, times of year and plant parts in digestibility and chemical composition. *J. Agric. Sci. Camb.* 127:311–318
- Wilson, J.R. y Mertens, D.R. 1995. Cell wall accessibility and cell structure simulations to microbial digestion of forage. *Crop Sci.* 35, 251-255.
- Witcombe, J.R., Hollington, P.A., Howarth, C.J., Reader, S. y Steele, K.A., 2008. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1492), 703-716.
- Xiong, L. y Zhu, J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 131-139.
- Xu, W. y Sleper, D.A. 1994. Phylogeny of tall fescue and related species using RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* Vol 88: 6-7, pp: 685-690.
- Xu, W.W., Sleper, D.A. y Hoisington, D.A. 1991. A survey of restriction fragment length polymorphisms in tall fescue and its relatives. *Genome*, Vol. 34, No. 5: pp. 686-692 <https://doi.org/10.1139/g91-106>
- Xu, W., Sleper, D.A. y Krause, G. 1994. Genetic diversity of tall fescue germplasm based on RFLPs. *Crop Sci.* 34: 246-252.

- Xu, W., Sleper, D.A. y Chao, S. 1995. Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* Vol 91: 5-7, pp: 947-955.
- Yadav, R.K., Sigh, S.P., Lal, D. y Kumar, A. 2007. Fodder production and soil health with conjunctive use of saline and good quality water in ustipsammments of a semi-arid region. *Land Degrad Dev* 18:153–161
- Yamaguchi, T. and Blumwald, E. 2005. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Science*, 10, 616–620.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. y Somero, G.N. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214-1222.
- Yeo, A.R. 1983. Salinity resistance: Physiologies and prices. *Plant Physiology*, 58 (2): 214-222.
- Young, C.A., Felitti, S., Shields, K., Spangenberg, G., Johnson, R.D., Bryan, G.T., Saikia, S. y Scott, B. 2006. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genetics and Biology* 43 (10):679-693.
- Zabala, J.M. 2016. Recursos fitogenéticos forrajeros nativos y naturalizados para los Bajos Submeridionales. Cómo mejorar la producción forrajera en suelos afectados por sales. RAS/FAUBA. Páginas 21 -28
- Zamolinski, A.F. 2000. Experiencia de recuperación de suelos salinizados. *Publicación Técnica N°31*. ISSN-0326-5803.
- Zare, M., Azizi, M.H. y Bazrafshan, F. 2011. Effect of drought stress on some agronomic traits in ten barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Tech. J. Engin. & App. Sci.* 1(3): 57-62.
- Zaurov, D.E., Bonos, S., Murphy, J.A., Richardson, M. y Belanger, F.C. 2001. Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. *Crop Sci.* 41 (6):1981-1984.
- Zeid, M., Yu, J., Goldowitz, I., Denton, M.E., Costich, D.E., Jayasuriya, C.T., Saha, M., Elshire, R., Benscher, D., Bressegello, F., Munkvold, J., Varshney, R.K., Belay, G. y Sorrells, M.E. 2010. Cross-amplification of EST-derived markers among sixteen grass species. *Field Crops Res.* doi:10.1016/j.fcr.2010.03.014
- Zhang, Y., Mian, M.A.R. and Bouton, J.H. 2006. Recent molecular and genomic studies on stress tolerance of forage and turf grasses. *Crop Sci.* 46(2), 497-511.
- Zhang, C., Fei, S.Z., Arora, R. y Hannapel, D.J. 2010. Ice recrystallization inhibition proteins of perennial ryegrass enhance freezing tolerance. *Planta* 232:155–164
- Zhang, X.X., Xia, C. y Nan, Z.B. 2015. Effects of symbiotic *Epichloë gansuensis* endophyte on drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) growth and seed production. *New Zealand Journal of Agricultural Research.* 58:2, 234-240, DOI: 10.1080/00288233.2014.978874
- Zhao, T.J., Sun, S., Liu, Y., Liu, J.M., Liu, Q., Yan, Y.B. and Zhou, H.M. 2006. Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 10752-10759.
- Zhao, J., Ren, W., Zhi, D., Wang, L., Xia, G. 2007. Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep.* 26:1521–1528. DOI 10.1007/s00299-007-0362-3
- Zhao, C.X., Ling-Yu, G., Jaleel, C.A., Hong-Bo, S. y Hong-Bing, Y. 2008. Prospectives for applying molecular and genetic methodology to improve wheat cultivars in drought environments. *Comptes Rendus Biologies.* Volume 331, Issue 8, Pages 579-588
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66–71.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 1.1. Número de macollos promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Número de macollos													
Población 1		Población 2		Población 3		Población 5		Población 6		Población 8		Población 9	
Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media
12	116 A	6	84 A	24	67 A	6	102,7 A	6	86,7 A	33	126 A	16	122,7 A
17	116 A	20	102 A	40	117,3 B	28	124 A	4	88 A	1	172 A	20	136 A
36	116 A	38	124 A	30	126 B	4	128 A	20	90 A	4	176 A	13	148 A
19	118,7 A	18	126 A	22	133,3 B	39	142 A	21	100 A	38	177,3 A	39	150,7 A
14	133,3 A	26	128 A	28	133,3 B	29	144 A	28	168 B	26	181,3 A	38	152 A
23	136 A	7	132 A	37	140 B	22	149,3 A	23	169,3 B	17	181,3 A	23	161,3 A
9	136 A	21	138 A	31	140 B	36	157,3 A	14	173,3 B	16	182 A	4	164 A
21	140 A	13	140 A	21	144 B	14	160 A	12	174 B	28	184 A	37	165,3 A
28	141,3 A	35	146,7 A	20	149,3 B	2	161,3 A	7	174,7 B	10	189,3 A	10	166 A
7	154 A	1	150,7 A	12	150,7 B	11	162,7 A	19	178,7 B	31	196 A	18	168 A
40	157,3 A	12	158,7 B	2	154 B	33	166,7 A	18	180 B	8	198 A	22	172 A
1	160 A	23	166,7 B	32	156 B	9	181,3 B	3	188 B	14	200 A	7	178,7 A
26	160 A	9	166,7 B	4	160 B	17	182 B	17	188 B	29	202,7 A	11	188 A
13	162 A	39	174,7 B	38	170,7 B	15	182 B	34	204 B	30	205,3 A	17	194,7 A
27	162,7 A	34	178,7 B	11	172 B	12	182,7 B	25	205,3 B	13	209,3 A	25	202,7 A
37	164 A	11	181,3 B	16	177,3 B	1	182,7 B	11	208 B	18	209,3 A	14	204 A
8	168 A	37	189,3 B	29	186,7 B	16	184 B	26	212 B	21	210,7 A	28	214,7 A
6	170,7 A	8	190,7 B	14	196 B	7	190,7 B	5	218 B	12	216 A	8	216 A
22	176 A	4	196 B	26	201,3 B	5	197,3 B	2	223,8B	32	225,3 A	5	220 A
35	180 A	15	198,7 B	25	204 B	20	200 B	13	226,7 B	23	230,7 A	27	220 A
3	182,7 A	16	201,3 B	13	205,3 B	23	201,3 B	22	228 B	5	237,3 A	9	224 A
2	188 A	10	210,7 B	39	208 B	3	202 B	27	238,7 B	25	240 A	15	230,7 A
24	192 A	2	212 B	33	217,3 B	13	205,3 B	15	245,3 B	36	242,7 A	26	236 A
4	196 A	29	230,7 B	8	222,7 B	24	208 B	9	248 B	34	250,7 A	6	240 A
29	200 A	27	232 B	9	229,3 B	25	208 B	24	254,7 B	22	269,3 A	30	242,7 A
5	202,7 A	36	237,3 B	17	242,7 B	27	217,3 B	35	269,3 B	3	272 A	34	244 A
15	214,7 A	32	240 B	18	246,7 B	19	221,3 B	33	273,3 B	15	294 A	40	246,7 A
11	232 A	17	244 B	27	261,3 B	26	228 B	10	316 B	37	308 A	21	253,3 A
16	253,3 A	25	246,7 B	35	268 B	21	230 B	8	320 B	39	328 A	29	264 A
10	404 B	14	249,3 B	1	361,3 C			16	337,3 B	2	472 B	19	304 B

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Tabla 1.2. Peso seco 1 promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Peso seco 1													
Población 1		Población 2		Población 3		Población 4		Población 5		Población 6		Población 9	
Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media
12	6,5 A	23	9,6 A	13	5A	7	4,7 A	14	9A	21	8,3 A	25	14,3 A
17	10,7 B	6	10A	12	7,3 A	3	5,7 A	17	12A	4	11A	37	15 A
24	11,7 B	20	11,5 A	24	8,7 A	26	7A	2	13,7 A	12	13 A	38	15,3 A
4	12,3 B	26	12,3 A	35	9,3 A	1	9,7 A	28	14,3 A	6	13,3 A	28	16 A
1	13 B	15	12,3 A	30	11A	29	10,3 A	23	14,7 A	5	14,5 A	14	17 A
6	13,7 B	10	12,6 A	4	12,7 A	35	13,3 A	11	15,7 A	20	15,5 A	11	17 A
7	14 B	21	13 A	20	12,7 A	19	13,3 A	19	15,7 A	11	16,3 A	26	18 A
15	15 B	18	14,6 A	14	13 A	11	14,7 A	3	15,7 A	3	16,7 A	4	18 A
2	15,3 B	13	15 A	31	13 A	12	15,7 B	7	16 A	18	17 A	27	18,3 A
19	15,3 B	27	15,6 A	16	13 A	22	16 B	22	16 A	28	17 A	16	20 A
26	15,7 B	39	16 A	32	13,3 A	34	16,7 B	39	16,5 A	27	18,3 A	19	20 A
36	16,3 B	1	16 A	17	13,7 A	17	17 B	13	18,3 A	33	19 A	20	20,3 A
11	16,3 B	35	16,6 A	2	14 A	15	17 B	1	18,7 A	9	19,7 A	30	22 A
8	16,7 B	17	17 A	22	14 A	20	18 B	16	20 A	34	19,7 A	39	23,3 A
14	17 B	8	17 A	18	14,3 A	14	18,7 B	15	20 A	14	20,3 A	17	23,3 A
37	18 B	38	17,5 A	29	14,3 A	37	19,5 B	6	21 A	15	21,7 A	6	23,3 A
35	18,3 B	11	17,6 A	38	15 A	21	19,7 B	25	21,3 A	17	22,7 A	9	26 A
16	18,3 B	9	18 A	33	15,7 A	4	20,3 B	4	22 A	26	22,7 A	7	26 A
10	18,3 B	14	18,5 A	25	16 A	24	20,7 B	29	22,3 A	7	23 A	15	26,3 A
3	18,7 B	34	19,6 A	28	16,7 A	38	21 B	5	23 A	13	25,7 B	8	26,3 A
40	19,4 B	36	19,6 A	1	18 A	6	21,7 B	12	23,3 A	19	26,7 B	29	27 A
27	19,7 B	2	19,6 A	40	18,7 A	31	22,7 B	21	23,7 A	2	26,9 B	5	27,3 A
9	21,3 B	12	20 A	37	20 A	28	22,7 B	9	24 A	35	28,7 B	13	27,7 A
13	21,3 B	25	23 B	21	20 A	23	23 B	36	24 A	10	28,7 B	34	31,7 A
28	23 B	7	23 B	11	21 A	40	25 B	27	26,5 B	24	31 B	23	31,7 A
29	24,7 B	37	24,3 B	8	22,7 A	2	26,7 B	20	26,7 B	25	31,7 B	22	32,3 A
21	25,3 B	16	26,6 B	9	23 A	13	27 B	33	29,3 B	16	33,3 B	10	33 A
23	28,3 B	32	27 B	27	27,3 B	9	28 B	26	30,3 B	8	35 B	40	34 A
5	28,7 B	4	27,3 B	39	30,5 B	25	31,7 B	24	32,5 B	22	51 C	18	35 A
22	29,3 B	29	28,3 B	26	37,5 C	30	31,7 B			23	52 C	21	42 B

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Tabla 1.3. Peso seco 2 promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Peso seco 2									
Población 1		Población 3		Población 4		Población 6		Población 8	
Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media
17	11,5 A	13	9,7 A	12	11,2 A	28	16,5 A	4	15,3 A
27	16,5 A	25	11,7 A	11	11,7 A	11	24,2 A	10	22 A
19	17,3 A	35	13 A	7	13,3 A	20	26,2 A	15	23,5 A
40	20,8 A	22	18 A	19	18,2 A	7	27,8 A	37	23,7 A
2	21,8 A	26	18 A	24	22,3 A	18	33 A	30	24,5 A
24	24,3 A	37	20 A	38	28,8 B	24	33 A	38	25,3 A
15	26 A	14	20,9 A	15	31 B	6	33,5 A	12	28,8 A
28	26,5 A	8	22,7 A	6	31 B	23	33,5 A	21	29 A
8	28,3 A	33	24,5 A	9	31 B	15	39,3 A	32	30,3 A
23	31 B	21	28,5 B	4	32,3 B	35	41,8 A	1	31,2 A
26	32,8 B	11	30 B	2	38 B	27	43,3 A	22	32 A
22	35,3 B	1	30,2 B	40	42,5 B	8	48,2 A	25	32,8 A
3	36 B	29	30,3 B	30	45 B	5	49,5 A	39	35,5 A
29	38,7 B	27	33 B	31	50,7 B	16	54,5 A	23	53 B
5	42,7 B	9	39,2 B	23	54,5 B	22	81 B	31	57 B

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Tabla 1.4. Peso seco 3 promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Peso seco 3			
Población 3		Población 7	
Gen	Media	Gen	Media
13	52,2 A	9	43,2 A
35	59,3 A	31	57 A
22	67,2 A	33	64,5 B
14	69,8 A	22	66 B
9	71,5 A	17	69,5 B
21	77,2 A	28	69,5 B
25	78,2 A	23	70,3 B
29	79,2 A	35	70,7 B
37	80 A	2	74 B
1	84,7 A	38	74,2 B
8	85,5 A	3	74,5 B
33	92,5 B	15	76,2 B
11	96,3 B	14	76,8 B
26	97,2 B	21	79,5 B
27	108 B	19	84,8 B

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Tabla 1.5. Peso seco total promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Peso seco total			
Población 3		Población 7	
Gen	Media	Gen	Media
13	81,7 A	9	77,7 A
35	81,7 A	33	93,5 A
22	99,2 A	22	99,7 A
25	101,8 A	31	103,5 A
14	106 A	38	106,5 A
37	120 B	15	108 A
21	124,7 B	35	109,3 A
29	129,2 B	23	112,8 A
8	130,8 B	3	114,2 A
33	132,7 B	28	117,2 A
1	132,8 B	21	124 A
9	133,7 B	14	131,3 A
11	147,3 B	19	147,3 B
26	154,2 B	17	157,2 B
27	168,3 B	2	157,5 B

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Tabla 1.6. Número de panojas promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Número de panojas									
Población 1		Población 2		Población 4		Población 6		Población 9	
Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media
37	56 A	13	45,5 A	3	42,3 A	4	34 A	13	34,3 A
12	67,7 A	26	54 A	22	70,3 A	21	43,7 A	23	42 A
7	71,5 A	6	59,7 A	1	72 A	3	52 A	16	43 A
9	73 A	38	61 A	35	74,7 A	34	56 A	20	48,7 A
14	79,7 A	11	62,7 A	14	82 A	14	58 A	7	52,7 A
1	96,7 B	23	69,3 A	28	83 A	2	69,7 A	21	56 A
36	103,3 B	1	71 A	13	86,3 A	25	71,7 A	40	62 A
4	107,7 B	2	97 B	29	92,3 A	19	80,7 A	38	65,5 A
6	110,7 B	10	103 B	20	96,3 A	12	90 A	4	80 B
35	113 B	39	104 B	37	101,7 A	17	92,3 A	17	80,5 B
10	113,3 B	20	108 B	26	103 A	26	109,3 B	29	97,3 B
21	121,7 B	35	111,3 B	21	105,7 A	13	113,7 B	19	99 B
11	132,3 B	16	115,7 B	17	140 B	10	120,3 B	30	110 B
16	136 B	17	130,7 B	34	149,3 B	9	120,7 B		
13	138,7 B	18	155 B	25	156,3 B	33	135,5 B		

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Tabla 1.7. Peso de semillas promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Peso de semillas													
Población 1		Población 2		Población 3		Población 5		Población 6		Población 7		Población 8	
Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media
4	4,8 A	26	5,9 A	31	2,3 A	11	5A	21	0,9 A	40	2,6 A	5	1,9 A
37	8,1 A	35	10,4 A	32	2,5 A	19	6,7 A	3	3,2 A	39	3,9 A	34	6,1 A
35	8,7 A	13	11,5 A	28	3,9 A	33	8A	9	6,7 A	34	4,9 A	14	6,1 A
12	9,5 A	23	12,2 A	40	5,5 A	9	10,6 A	12	8,1 A	6	6,2 A	13	10,6 A
1	9,8 A	1	13,5 A	16	6,5 A	36	12A	25	9,4 A	32	6,5 A	18	11A
14	10A	38	14,5 A	2	7,8 A	4	12,5 A	10	10A	16	7,4 A	29	12,2 A
7	10,1 A	6	15,3 A	24	9,2 A	3	13,1 A	2	10,5 A	37	7,6 A	3	14 A
36	12,7 A	11	16 A	20	10,5 A	16	13,2 A	13	11,5 A	24	8,3 A	36	15,3 A
10	12,7 A	20	16,1 A	30	10,6 A	23	15,9 A	14	12A	20	13,9 A	16	19,5 A
9	17,2 A	18	18 A	29	10,9 A	27	17,7 A	34	12,5 A	7	14,9 A	17	20,2 A
11	25,2 B	10	20 A	12	11,2 A	39	18 A	19	13 A	29	16,1 A	8	20,6 A
6	27,6 B	16	20,5 A	4	11,6 A	21	19,7 A	26	14 A	10	17,6 A	28	26,8 B
21	27,8 B	17	23,1 B	38	14,1 A	15	23,9 B	17	16,3 A	26	17,8 A	33	28,3 B
13	35,6 B	39	25,7 B	18	18,7 B	26	26,8 B	4	19,8 A	11	17,9 A	2	30,9 B
16	76,4 C	2	27,4 B	17	32,7 C	20	31,4 B	33	26,2 B	30	27,5 B	26	31,3 B

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Tabla 1.8. Peso de mil semillas promedio para cada genotipo dentro de las nueve poblaciones de Festuca alta.

Peso de mil semillas																	
Población1		Población2		Población 3		Población 4		Población 5		Población 6		Población 7		Población 8		Población 9	
Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media	Gen	Media
4	1,5 A	39	2A	30	1,2 A	22	1,4 A	19	1,2 A	21	1,5 A	39	1A	14	1,4 A	7	1,7 A
16	1,6 A	2	2A	24	1,3 A	17	1,4 A	33	1,5 B	3	1,7 A	40	1,5 B	3	1,4 A	13	12A
36	1,8 A	6	2,1 A	16	1,4 A	35	1,5 A	11	1,6 B	12	1,8 A	20	1,6 B	18	1,5 A	4	2A
21	2 B	17	2,1 A	38	1,5 A	34	1,5 A	4	1,7 B	33	1,9 B	7	1,7 B	5	1,6 A	23	2A
13	2,1 B	20	2,2 A	32	1,5 A	14	1,6 A	9	2 C	9	2 B	37	1,9 C	13	1,6 A	16	2,2 A
11	2,1 B	35	2,2 A	31	1,5 A	13	1,7 A	20	2,1 C	19	2 B	32	1,9 C	8	1,7 A	21	2,2 A
12	2,1 B	18	2,2 A	18	1,6 A	1	1,7 A	16	2,1 C	13	2,1 B	34	2 C	33	1,7 A	40	2,2 A
9	2,2 B	10	2,2 A	40	1,6 A	28	1,7 A	21	2,2 C	17	2,2 B	11	2,1 C	28	1,9 B	19	2,4 B
14	2,2 B	11	2,2 A	20	1,7 A	37	1,7 A	36	2,12 C	26	2,2 B	10	2,2 C	34	2 B	29	2,5 B
6	2,3 B	13	2,3 A	4	1,9 A	3	1,8 A	3	2,2 C	4	2,2 B	6	2,3 C	2	2,1 B	30	2,5 B
35	2,3 B	16	2,3 A	17	1,9 A	25	1,9 A	23	2,2 C	14	2,3 B	16	2,3 C	36	2,1 B	20	2,6 B
37	2,4 B	1	2,5 B	28	1,9 A	29	1,9 A	15	2,3 C	2	2,3 B	24	2,4 C	29	2,2 B		
1	2,4 B	26	2,5 B	29	2A	33	2A	39	2,3 C	34	2,4 B	26	2,9 D	26	2,2 B		
10	2,8 C	23	2,6 B	12	2,1 A	21	2,7 B	27	2,4 C	25	2,4 B	30	3,1 D	17	2,2 B		
		38	2,8 B	2	2,6 B	20	2,8 B	26	2,7 D	10	2,8 C	29	3,3 D	16	2,2 B		

Nota: Se muestran las poblaciones con diferencias significativas entre genotipos.

Anexo 2

Tabla 2.1. Valores de membresía de cada uno de los genotipos a cada uno de los tres grupos generados por STRUCTURE.

ID	Población	Genotipo	1	2	3
1	1	1	0.017	0.024	0.959
2	1	2	0.008	0.010	0.982
3	1	3	0.020	0.067	0.913
4	1	4	0.005	0.006	0.990
5	1	5	0.012	0.008	0.980
6	1	6	0.025	0.031	0.944
7	1	7	0.016	0.011	0.973
8	1	8	0.050	0.044	0.906
9	1	9	0.013	0.009	0.978
10	1	10	0.010	0.006	0.984
11	1	11	0.011	0.008	0.982
12	1	12	0.008	0.015	0.976
13	1	13	0.054	0.062	0.884
14	1	14	0.027	0.015	0.958
15	1	15	0.294	0.031	0.676
16	1	16	0.009	0.013	0.978
17	1	17	0.042	0.012	0.946
18	1	18	0.013	0.307	0.680
19	1	19	0.006	0.010	0.984
20	1	20	0.006	0.010	0.985
21	1	21	0.027	0.048	0.925
22	1	22	0.005	0.051	0.944
23	1	23	0.017	0.012	0.970
24	1	24	0.025	0.143	0.832
25	1	25	0.010	0.007	0.982
26	1	26	0.079	0.172	0.749
27	1	27	0.017	0.024	0.959
28	1	28	0.099	0.043	0.858
29	1	29	0.020	0.012	0.968
30	1	30	0.008	0.006	0.985
31	1	31	0.010	0.011	0.980
32	1	32	0.013	0.011	0.975
33	1	33	0.023	0.017	0.960
34	1	34	0.016	0.008	0.976
35	1	35	0.152	0.049	0.800
36	1	36	0.032	0.020	0.948
37	1	37	0.005	0.011	0.984
38	1	38	0.009	0.008	0.982
39	1	39	0.008	0.007	0.984
40	1	40	0.009	0.024	0.967
41	2	1	0.023	0.935	0.043
42	2	2	0.018	0.971	0.011
43	2	3	0.006	0.977	0.017
44	2	4	0.017	0.959	0.023
45	2	5	0.016	0.454	0.531
46	2	6	0.058	0.934	0.007

47	2	7	0.024	0.867	0.109
48	2	8	0.052	0.943	0.006
49	2	9	0.010	0.966	0.024
50	2	10	0.024	0.971	0.006
51	2	11	0.010	0.977	0.013
52	2	12	0.015	0.980	0.005
53	2	13	0.016	0.977	0.007
54	2	14	0.071	0.915	0.014
55	2	15	0.013	0.971	0.016
56	2	16	0.033	0.959	0.008
57	2	17	0.020	0.843	0.137
58	2	18	0.220	0.735	0.045
59	2	19	0.010	0.979	0.011
60	2	20	0.039	0.945	0.016
61	2	21	0.021	0.972	0.006
62	2	22	0.015	0.977	0.008
63	2	23	0.012	0.983	0.005
64	2	24	0.249	0.741	0.009
65	2	25	0.095	0.900	0.005
66	2	26	0.011	0.933	0.056
67	2	27	0.027	0.953	0.020
68	2	28	0.082	0.902	0.016
69	2	29	0.218	0.769	0.012
70	2	30	0.194	0.408	0.398
71	2	31	0.013	0.980	0.007
72	2	32	0.020	0.964	0.016
73	2	33	0.018	0.974	0.008
74	2	34	0.028	0.965	0.007
75	2	35	0.038	0.940	0.022
76	2	36	0.022	0.913	0.064
77	2	37	0.139	0.851	0.010
78	2	38	0.177	0.808	0.015
79	2	39	0.029	0.862	0.109
80	2	40	0.676	0.315	0.010
81	3	1	0.017	0.976	0.006
82	3	2	0.040	0.947	0.014
83	3	3	0.330	0.329	0.342
84	3	4	0.065	0.923	0.012
85	3	5	0.006	0.984	0.009
86	3	6	0.093	0.892	0.015
87	3	7	0.013	0.973	0.013
88	3	8	0.020	0.967	0.013
89	3	9	0.010	0.981	0.009
90	3	10	0.517	0.432	0.051
91	3	11	0.159	0.829	0.012
92	3	12	0.023	0.935	0.042
93	3	13	0.014	0.906	0.079
94	3	14	0.861	0.109	0.030
95	3	15	0.193	0.800	0.007
96	3	16	0.028	0.948	0.024
97	3	17	0.011	0.976	0.013
98	3	18	0.009	0.980	0.010

99	3	19	0.048	0.939	0.012
100	3	20	0.696	0.298	0.006
101	3	21	0.030	0.953	0.017
102	3	22	0.011	0.975	0.014
103	3	23	0.009	0.983	0.009
104	3	24	0.036	0.957	0.007
105	3	25	0.020	0.962	0.018
106	3	26	0.053	0.933	0.014
107	3	27	0.198	0.773	0.029
108	3	28	0.915	0.072	0.014
109	3	29	0.072	0.920	0.007
110	3	30	0.016	0.946	0.038
111	3	31	0.166	0.809	0.024
112	3	32	0.106	0.831	0.063
113	3	33	0.371	0.398	0.231
114	3	34	0.104	0.617	0.280
115	3	35	0.014	0.958	0.028
116	3	36	0.131	0.607	0.262
117	3	37	0.009	0.930	0.061
118	3	38	0.020	0.888	0.091
119	3	39	0.048	0.916	0.036
120	3	40	0.016	0.970	0.014
121	4	1	0.090	0.847	0.063
122	4	2	0.818	0.174	0.008
123	4	3	0.937	0.057	0.006
124	4	4	0.815	0.178	0.006
125	4	5	0.974	0.018	0.009
126	4	6	0.974	0.019	0.008
127	4	7	0.732	0.248	0.020
128	4	8	0.893	0.101	0.006
129	4	9	0.948	0.046	0.005
130	4	10	0.756	0.230	0.014
131	4	11	0.940	0.049	0.010
132	4	12	0.848	0.143	0.009
133	4	13	0.024	0.972	0.005
134	4	14	0.035	0.956	0.008
135	4	15	0.600	0.388	0.012
136	4	16	0.100	0.896	0.004
137	4	17	0.418	0.508	0.074
138	4	18	0.049	0.947	0.005
139	4	19	0.214	0.746	0.040
140	4	20	0.539	0.441	0.020
141	4	21	0.668	0.250	0.082
142	4	22	0.252	0.705	0.043
143	4	23	0.583	0.195	0.222
144	4	24	0.624	0.314	0.062
145	4	25	0.725	0.250	0.025
146	4	26	0.766	0.228	0.006
147	4	27	0.895	0.092	0.013
148	4	28	0.676	0.303	0.020
149	4	29	0.861	0.130	0.009
150	4	30	0.469	0.315	0.216

151	4	31	0.231	0.759	0.010
152	4	32	0.145	0.824	0.031
153	4	33	0.810	0.162	0.028
154	4	34	0.663	0.321	0.016
155	4	35	0.314	0.674	0.012
156	4	36	0.186	0.777	0.037
157	4	37	0.074	0.841	0.086
158	4	38	0.165	0.771	0.064
159	4	39	0.248	0.717	0.035
160	4	40	0.044	0.952	0.004
161	5	1	0.957	0.036	0.006
162	5	2	0.943	0.048	0.009
163	5	3	0.838	0.148	0.013
164	5	4	0.620	0.372	0.008
165	5	5	0.785	0.196	0.018
166	5	6	0.977	0.014	0.009
167	5	7	0.417	0.569	0.014
168	5	8	0.242	0.739	0.019
169	5	9	0.961	0.029	0.010
170	5	10	0.915	0.075	0.010
171	5	11	0.885	0.100	0.014
172	5	12	0.839	0.148	0.013
173	5	13	0.943	0.043	0.014
174	5	14	0.976	0.015	0.010
175	5	15	0.969	0.018	0.013
176	5	16	0.891	0.088	0.021
177	5	17	0.938	0.052	0.010
178	5	18	0.943	0.041	0.016
179	5	19	0.894	0.099	0.007
180	5	20	0.957	0.034	0.009
181	5	21	0.649	0.337	0.013
182	5	22	0.866	0.121	0.013
183	5	23	0.979	0.013	0.008
184	5	24	0.968	0.025	0.006
185	5	25	0.850	0.144	0.006
186	5	26	0.968	0.027	0.005
187	5	27	0.033	0.955	0.012
188	5	28	0.893	0.100	0.007
189	5	29	0.741	0.251	0.007
190	5	30	0.950	0.045	0.005
191	5	31	0.846	0.146	0.008
192	5	32	0.942	0.047	0.011
193	5	33	0.946	0.041	0.013
194	5	34	0.704	0.286	0.010
195	5	35	0.947	0.037	0.016
196	5	36	0.313	0.237	0.450
197	5	37	0.948	0.041	0.011
198	5	38	0.895	0.082	0.023
199	5	39	0.890	0.102	0.008
200	5	40	0.730	0.260	0.011
201	6	1	0.884	0.109	0.007
202	6	2	0.971	0.024	0.005

203	6	3	0.976	0.016	0.007
204	6	4	0.855	0.129	0.017
205	6	5	0.390	0.591	0.019
206	6	6	0.450	0.542	0.008
207	6	7	0.960	0.032	0.008
208	6	8	0.019	0.969	0.012
209	6	9	0.932	0.062	0.006
210	6	10	0.305	0.663	0.032
211	6	11	0.855	0.138	0.007
212	6	12	0.573	0.415	0.012
213	6	13	0.749	0.238	0.013
214	6	14	0.970	0.021	0.009
215	6	15	0.952	0.040	0.008
216	6	16	0.162	0.797	0.040
217	6	17	0.957	0.029	0.014
218	6	18	0.759	0.130	0.111
219	6	19	0.465	0.506	0.029
220	6	20	0.587	0.205	0.208
221	6	21	0.918	0.047	0.035
222	6	22	0.860	0.092	0.047
223	6	23	0.854	0.136	0.010
224	6	24	0.404	0.580	0.017
225	6	25	0.227	0.752	0.020
226	6	26	0.736	0.239	0.024
227	6	27	0.860	0.128	0.012
228	6	28	0.616	0.373	0.011
229	6	29	0.370	0.618	0.012
230	6	30	0.962	0.023	0.014
231	6	31	0.805	0.184	0.010
232	6	32	0.936	0.038	0.026
233	6	33	0.778	0.212	0.010
234	6	34	0.914	0.071	0.015
235	6	35	0.222	0.758	0.019
236	6	36	0.404	0.564	0.032
237	6	37	0.617	0.367	0.016
238	6	38	0.817	0.170	0.013
239	6	39	0.062	0.925	0.013
240	6	40	0.933	0.036	0.031
241	7	1	0.346	0.637	0.017
242	7	2	0.901	0.091	0.008
243	7	3	0.280	0.059	0.661
244	7	4	0.947	0.042	0.011
245	7	5	0.916	0.062	0.022
246	7	6	0.278	0.711	0.011
247	7	7	0.907	0.076	0.017
248	7	8	0.638	0.352	0.010
249	7	9	0.796	0.187	0.017
250	7	10	0.444	0.543	0.013
251	7	11	0.871	0.123	0.006
252	7	12	0.640	0.353	0.007
253	7	13	0.952	0.043	0.005
254	7	14	0.947	0.044	0.009

255	7	15	0.803	0.190	0.007
256	7	16	0.089	0.904	0.008
257	7	17	0.958	0.031	0.010
258	7	18	0.965	0.029	0.006
259	7	19	0.866	0.113	0.022
260	7	20	0.791	0.114	0.094
261	7	21	0.726	0.261	0.012
262	7	22	0.886	0.103	0.011
263	7	23	0.897	0.093	0.011
264	7	24	0.815	0.176	0.009
265	7	25	0.039	0.937	0.025
266	7	26	0.695	0.290	0.015
267	7	27	0.085	0.890	0.025
268	7	28	0.814	0.167	0.019
269	7	29	0.871	0.121	0.009
270	7	30	0.962	0.034	0.004
271	7	31	0.966	0.028	0.006
272	7	32	0.944	0.051	0.005
273	7	33	0.907	0.087	0.006
274	7	34	0.982	0.014	0.004
275	7	35	0.807	0.184	0.009
276	7	36	0.935	0.057	0.008
277	7	37	0.985	0.010	0.005
278	7	38	0.800	0.180	0.019
279	7	39	0.964	0.028	0.008
280	7	40	0.983	0.012	0.005
281	8	1	0.960	0.034	0.007
282	8	2	0.737	0.249	0.014
283	8	3	0.042	0.951	0.007
284	8	4	0.971	0.022	0.007
285	8	5	0.976	0.015	0.009
286	8	6	0.977	0.016	0.006
287	8	7	0.542	0.403	0.055
288	8	8	0.976	0.016	0.008
289	8	9	0.949	0.045	0.006
290	8	10	0.745	0.234	0.021
291	8	11	0.876	0.116	0.008
292	8	12	0.639	0.353	0.008
293	8	13	0.961	0.018	0.021
294	8	14	0.958	0.019	0.023
295	8	15	0.930	0.061	0.010
296	8	16	0.948	0.041	0.011
297	8	17	0.957	0.034	0.009
298	8	18	0.944	0.049	0.007
299	8	19	0.721	0.026	0.253
300	8	20	0.928	0.037	0.035
301	8	21	0.950	0.045	0.005
302	8	22	0.939	0.039	0.022
303	8	23	0.969	0.024	0.007
304	8	24	0.931	0.057	0.012
305	8	25	0.978	0.017	0.005
306	8	26	0.975	0.017	0.008

307	8	27	0.950	0.042	0.008
308	8	28	0.777	0.214	0.010
309	8	29	0.813	0.165	0.022
310	8	30	0.957	0.037	0.006
311	8	31	0.947	0.049	0.004
312	8	32	0.964	0.030	0.006
313	8	33	0.815	0.173	0.012
314	8	34	0.341	0.651	0.008
315	8	35	0.230	0.750	0.020
316	8	36	0.938	0.055	0.007
317	8	37	0.872	0.122	0.006
318	8	38	0.948	0.047	0.005
319	8	39	0.815	0.178	0.007
320	8	40	0.834	0.051	0.115
321	9	1	0.175	0.813	0.011
322	9	2	0.368	0.608	0.025
323	9	3	0.557	0.421	0.022
324	9	4	0.659	0.334	0.007
325	9	5	0.150	0.830	0.020
326	9	6	0.407	0.571	0.022
327	9	7	0.082	0.907	0.011
328	9	8	0.523	0.454	0.023
329	9	9	0.749	0.222	0.028
330	9	10	0.894	0.100	0.005
331	9	11	0.848	0.146	0.006
332	9	12	0.174	0.821	0.005
333	9	13	0.986	0.010	0.004
334	9	14	0.926	0.066	0.008
335	9	15	0.990	0.006	0.004
336	9	16	0.042	0.863	0.095
337	9	17	0.906	0.089	0.005
338	9	18	0.939	0.056	0.005
339	9	19	0.952	0.036	0.011
340	9	20	0.219	0.753	0.028
341	9	21	0.923	0.071	0.006
342	9	22	0.974	0.019	0.008
343	9	23	0.976	0.017	0.007
344	9	24	0.930	0.059	0.010
345	9	25	0.600	0.377	0.023
346	9	26	0.765	0.225	0.011
347	9	27	0.857	0.134	0.010
348	9	28	0.588	0.397	0.015
349	9	29	0.933	0.059	0.008
350	9	30	0.913	0.075	0.012
351	9	31	0.366	0.613	0.020
352	9	32	0.056	0.939	0.005
353	9	33	0.791	0.047	0.162
354	9	34	0.111	0.877	0.011
355	9	35	0.062	0.932	0.006
356	9	36	0.969	0.015	0.017
357	9	37	0.969	0.023	0.007
358	9	38	0.602	0.383	0.015

359	9	39	0.955	0.039	0.006
360	9	40	0.752	0.239	0.009

Nota: En gris se resaltan los genotipos que dieron origen a las 30 FMH.

Tabla 2.2. Peso total de semillas y Peso de mil semillas promedio para cada Pool de Festuca alta.

Pool	Psem	Pmil
1	6,98 A	1,93 A
2	7,09 A	1,92 A
3	12,35 B	1,91 A

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

Tabla 2.3. Genotipos selectos de cada uno de los pooles por mayor producción de semillas.

Pool	Población	Genotipo	Psem	Pool	Población	Genotipo	Psem	Pool	Población	Genotipo	Psem
1	9	21	21,754	2	3	18	15,62	3	1	27	32,811
1	5	3	15,933	2	2	4	15,552	3	1	21	29,089
1	6	14	14,299	2	3	1	14,103	3	1	2	26,085
1	8	15	12,39	2	4	40	14,007	3	1	4	25,026
1	7	20	9,975	2	2	29	13,795	3	1	13	22,846
1	9	30	9,951	2	3	30	13,248	3	1	3	22,582
1	6	27	9,17	2	3	40	12,988	3	1	6	20,41
1	9	26	9,069	2	2	6	12,57	3	1	1	19,516
1	5	22	8,275	2	2	38	12,163	3	1	11	19,399
1	5	9	7,922	2	3	16	11,659	3	1	8	19,147

Anexo 3

Tabla 3.1. Medias y desvíos de los caracteres PFA, PSA, PSR y PST, para las 30 FMH en los diferentes tratamientos realizados (C, S1, S2).

FMH	PFA			PSA			PSR			PST		
	C	S1	S2	C	S1	S2	C	S1	S2	C	S1	S2
1	19,98±5,47	4,02±1,47	1,09±0,32	3,36±1	0,87±0,31	0,34±0,09	0,62±0,17	0,17±0,07	0,09±0,03	3,98±1,12	1,04±0,38	0,43±0,11
2	17,06±6,07	4,65±1,16	1,03±0,47	2,89±1,01	0,96±0,32	0,33±0,13	0,61±0,19	0,29±0,13	0,13±0,05	3,5±1,17	1,25±0,39	0,47±0,14
3	16,45±8,31	2,85±1,01	1,15±0,39	2,69±1,38	0,62±0,18	0,37±0,14	0,56±0,3	0,19±0,06	0,19±0,12	3,25±1,61	0,82±0,21	0,56±0,22
4	14,8±3,4	2,41±0,89	1,12±1,57	2,39±0,57	0,51±0,19	0,23±0,12	0,47±0,1	0,13±0,04	0,13±0,07	2,86±0,62	0,65±0,22	0,37±0,16
5	17,86±7,44	3,04±1,43	1,06±0,49	3±1,26	0,71±0,31	0,35±0,17	0,61±0,21	0,2±0,07	0,17±0,08	3,61±1,45	0,91±0,35	0,52±0,21
6	14,46±5,84	3,56±1,84	1,22±0,5	2,4±0,96	0,81±0,4	0,36±0,14	0,61±0,24	0,23±0,11	0,26±0,19	3,01±1,16	1,05±0,48	0,63±0,28
7	23,63±6,68	3,82±1,25	1,42±0,72	4,1±1,21	0,95±0,34	0,44±0,2	0,78±0,3	0,22±0,1	0,13±0,06	4,88±1,4	1,18±0,43	0,58±0,24
8	13,83±9,8	2,72±1,16	0,75±0,47	2,27±1,39	0,61±0,23	0,27±0,15	0,49±0,26	0,15±0,05	0,1±0,04	2,76±1,64	0,76±0,28	0,37±0,18
9	13,55±4,36	2,75±1,7	5,88±7,86	2,24±0,78	0,6±0,33	1,07±1,19	0,57±0,18	0,18±0,11	0,21±0,1	2,8±0,9	0,78±0,37	1,29±1,15
10	15,8±5,56	4,23±1,63	1,17±0,4	2,61±0,9	0,93±0,32	0,38±0,12	0,62±0,16	0,23±0,07	0,2±0,07	3,23±1,04	1,16±0,36	0,58±0,17
11	12,69±7,64	2,01±1,25	0,73±0,42	1,99±1,26	0,46±0,29	0,25±0,14	0,5±0,27	0,13±0,06	0,14±0,13	2,49±1,5	0,6±0,34	0,39±0,26
12	11,34±5,05	3,19±1,61	0,86±0,4	2,02±0,89	0,75±0,36	0,3±0,12	0,48±0,21	0,24±0,11	0,16±0,09	2,5±1,04	1±0,44	0,47±0,21
13	21,36±7,44	5,43±3,32	0,99±0,53	3,37±1,14	0,96±0,45	0,4±0,22	0,71±0,24	0,22±0,09	0,21±0,14	4,08±1,35	1,19±0,54	0,6±0,3
14	13,7±3,51	3,37±1,51	0,96±0,48	2,38±0,65	0,67±0,27	0,34±0,14	0,52±0,17	0,25±0,11	0,23±0,09	2,9±0,77	0,93±0,36	0,58±0,21
15	15,24±8,67	3,39±1,8	1,090,27	2,59±1,55	0,92±0,46	0,43±0,11	0,55±0,23	0,22±0,09	0,22±0,18	3,14±1,74	1,15±0,48	0,66±0,23
16	16,21±5,74	2,93±1,25	1,15±0,39	2,59±0,84	0,64±0,23	0,39±0,16	0,86±0,24	0,23±0,08	0,19±0,09	3,44±0,98	0,88±0,22	0,59±0,25
17	17,09±5,81	2,7±1,35	0,98±0,51	2,79±1,02	0,62±0,26	0,32±0,13	0,55±0,23	0,17±0,11	0,14±0,08	3,35±1,18	0,79±0,31	0,46±0,16
18	16,45±5,49	2,67±1,23	0,82±0,38	2,71±0,93	0,62±0,28	0,29±0,11	0,57±0,14	0,17±0,08	0,09±0,04	3,28±1,04	0,8±0,36	0,38±0,15
19	14,57±8,78	2,62±1,45	0,98±0,59	2,5±1,56	0,59±0,3	0,33±0,17	0,51±0,26	0,2±0,07	0,13±0,07	3,01±1,64	0,79±0,35	0,47±0,22
20	13,22±4,68	2,97±1,66	1,19±0,63	2,39±1,21	0,67±0,3	0,39±0,18	0,62±0,28	0,17±0,07	0,15±0,11	3,01±1,41	0,84±0,35	0,55±0,29
21	20,47±6,59	3,42±0,96	0,97±0,49	3,24±1,05	0,73±0,23	0,35±0,18	0,71±0,23	0,2±0,07	0,14±0,1	3,95±1,13	0,93±0,26	0,49±0,23
22	19,56±7,25	3,73±1,45	1,41±0,58	2,99±1,24	0,74±0,32	0,45±0,16	0,52±0,26	0,16±0,06	0,12±0,06	3,51±1,41	0,91±0,37	0,57±0,22
23	22,26±10,69	4,56±1,39	1,65±0,76	3,58±1,61	1,02±0,31	0,51±0,3	0,75±0,28	0,25±0,09	0,22±0,13	4,33±1,79	1,28±0,33	0,78±0,37
24	20,92±9,55	3,79±1,26	1,2±0,31	3,35±1,44	0,86±0,26	0,41±0,08	0,59±0,36	0,24±0,07	0,18±0,07	3,95±1,46	1,1±0,29	0,6±0,13
25	20,9±11,06	3,37±1,33	1,49±0,78	3,24±1,86	0,71±0,29	0,45±0,2	0,65±0,3	0,25±0,06	0,21±0,08	3,89±2,12	0,97±0,34	0,67±0,23
26	21,19±8,55	3,17±1,31	1,01±0,41	3,7±1,46	0,7±0,26	0,32±0,13	0,62±0,22	0,23±0,08	0,18±0,1	4,33±1,65	0,94±0,33	0,51±0,21
27	18,83±5,92	2,71±1,13	1,03±0,34	3,23±1,02	0,65±0,27	0,34±0,12	0,61±0,24	0,2±0,08	0,16±0,06	3,84±1,24	0,86±0,33	0,51±0,17
28	20,57±8,31	4,7±1,45	1,55±0,8	3,6±1,47	1,05±0,31	0,55±0,23	0,7±0,26	0,24±0,12	0,17±0,07	4,31±1,72	1,3±0,39	0,72±0,29
29	13,11±4,05	5,02±2,66	1,37±0,41	2,26±0,65	1,02±0,56	0,45±0,12	0,41±0,16	0,23±0,13	0,23±0,07	2,67±0,79	1,26±0,67	0,68±0,16
30	15,02±12,31	4,34±1,95	1,4±0,48	2,56±1,98	0,95±0,41	0,43±0,14	0,79±0,32	0,26±0,08	0,19±0,07	3,35±2,18	1,22±0,46	0,63±0,16

Tabla 3.2. Medias y desvíos de los caracteres Alt y Nmac para las 30 FMH en los diferentes tratamientos realizados (C, S1, S2) y distintos tiempos.

FMH	Alt						Nmac					
	C		S1		S2		C		S1		S2	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	23,7±5,84	35,19±8,75	19,2±3,41	23,98±4,28	16,53±2,61	14,52±3,8	13,6±4,12	18,27±5,7	5,2±1,93	6,6±2,61	4,33±1,58	4,26±1,57
2	24,5±4	37,33±5,46	21,43±3,91	25,31±3,9	18±2,52	16,75±3,08	10,13±2,27	14,2±4,11	5,8±1,65	8,06±2,63	3,8±1,52	4,06±1,16
3	21,3±5,17	31,94±6,96	16,33±3,29	17,68±4,99	17,46±4,9	14,18±3,46	10,8±4,23	15,8±6,45	5,5±2,13	6,8±3	5,2±1,82	5,06±2,25
4	22,67±4,89	31,65±8,21	15,2±2,46	14,53±2,83	13,63±3,2	13,5±3,04	9,27±2,99	14,2±5	4,46±1,45	5,26±1,57	3,26±1,09	3,42±1,22
5	22,2±4,57	34,63±5,42	16,86±3,78	17,26±4,15	15,76±2,43	13,22±4,29	10,73±3,17	14,2±4,49	4,8±2,17	5,8±2,83	4±2,2	3,93±2,31
6	21,83±4,28	32,1±5,85	17,3±3,94	17,74±5,85	17,33±3,51	14,94±2,75	9,4±3,4	12,33±4,81	5,33±2,46	6,2±2,51	3,73±1,98	4,13±1,8
7	28,93±3,62	39,82±5,14	19,4±3,07	19,94±6,71	18,44±2,7	13,75±3,63	13,4±3,66	18,6±6,68	7,33±2,79	8,06±2,63	4,93±1,57	4,73±1,53
8	25,1±4,79	34,94±5,32	21,16±5,17	22,32±7,08	17,66±3,16	14,23±4,9	7,27±5,3	12,67±11,03	4±1,25	4,53±1,4	2,46±1,55	14,23±1,52
9	18,53±4,12	28,18±5,73	16,23±2,74	15,69±1,92	14,63±3,17	7,97±4,21	12,47±4,24	17,87±4,98	5,93±2,49	7,53±3,66	4,66±1,63	4,57±1,45
10	24,77±4	33,31±5	20,06±4,61	21,51±4,95	15,5±3,64	13,31±3,85	10,07±3,9	13,27±5,26	6,2±1,74	6,93±2,05	4,53±1,95	4,86±1,92
11	20,27±2,97	29,79±5,81	13,9±2,78	16,71±4,23	12,42±1,73	10,58±3,56	9,6±4,79	13,33±7,22	4,33±2,09	4,8±2,48	4,07±1,85	4,08±2,39
12	18,33±3,19	25,83±4,12	14,06±3,41	14,86±4,27	14,1±2,86	11,14±2,81	12,53±5,13	16,73±6,4	7,6±3,79	9,06±4,89	5,06±1,38	4,8±1,52
13	23,83±5,12	29,5±6,55	16,23±3,01	17,93±7,2	14,06±1,97	11,13±3,45	17,13±9,21	24,73±11,85	7,93±2,12	9,66±3,3	5,73±2,15	5,53±2,38
14	23,2±3,6	31,77±6,04	15,83±2,88	19,96±5,94	15,66±3,12	11,32±4,97	10,53±3,95	13,8±4,66	4,8±1,26	6,33±2,12	4,46±1,59	4,64±1,54
15	22,97±3,64	32,37±6,05	17,86±2,03	17,8±3,44	14,96±2,28	10,33±5,86	9,93±3,47	15,13±7,88	6,8±2,85	6,93±2,78	6,13±1,84	5,2±1,26
16	23,57±4,88	34,83±9,22	16,8±2,85	18,76±4,59	17,86±4,59	10,43±4,97	14±5,24	19,07±6,05	5,6±2,41	6±2,53	6,53±2,58	6,53±3,2
17	20,3±3,9	29,2±4,04	15,93±3,32	17,73±5,42	15,7±2,43	11,78±4,11	12,33±5,74	17±8,29	5,06±2,49	6±2,75	4,13±1,12	4,13±1,5
18	23±5,75	31,97±8,15	14,3±4,8	14,53±4,12	13,9±1,78	9,1±4,15	11,47±4,44	15,07±5,61	5,86±2,23	6,2±2,75	5,4±1,76	4,06±2,05
19	21,1±4,57	32,7±5,59	14,76±2,85	15,21±4,47	14,16±2,49	19,25±13,46	11,73±4,5	15,6±6,57	5,66±2,41	5,93±2,40	4,93±2,12	10,8±9,81
20	24,23±6,26	36,63±10,53	19,2±3,11	16,2±7,19	17,2±3,52	21,7±9,03	8,73±2,99	13,27±4,28	5,66±2,19	5,2±1,85	4,86±2,03	10,73±7,31
21	21,54±4,79	33,27±6,9	14,26±2,17	15,56±3,17	15,33±1,44	9,96±3,51	13,73±5,18	19,2±6,98	6±2,72	6,4±3,08	4,93±1,9	4,46±2,06
22	23,43±4,54	32,93±6,38	16,8±3,28	18,43±3,98	17,5±3,98	15,53±3,79	12,8±4,33	17,2±6,47	6,06±2,21	7±2,43	4,6±1,63	4,46±1,55
23	22,33±4,72	31,33±7,66	18,23±3,91	19,1±5,98	17,26±3,83	14,1±6,23	16,2±6	22,73±8,66	7,26±2,6	9,6±3,31	6,13±2,89	6,73±3,01
24	20,1±6,22	28,57±5,74	16,53±2,48	13,6±2,99	17,4±3,24	12,3±4,38	15,13±6,22	21,93±7,79	8,26±2,08	10,6±3,33	4,8±1,65	5,2±2,24
25	26,13±4,85	35±7,37	17,86±3,94	18,73±5,3	17,66±2,41	13,2±4,41	9,27±5,16	14,53±8,5	4,53±1,72	5,93±2,21	4,26±2,01	4,13±1,72
26	25,27±5,71	33,17±8,2	14,73±2,45	15,2±3,58	13,7±2,41	10,76±3,08	13±5,49	17,87±8,25	5,66±2,49	7,53±3,5	4,46±1,95	4,46±2,03
27	25,3±6,61	36,63±9,28	18,06±3,09	16,93±3,33	17,2±3,13	13,4±4,06	9,67±2,79	13,13±4,36	4,2±1,47	5,71±1,48	3,53±0,99	3,56±0,99
28	24,2±5,01	34,7±6,65	17,53±3,22	17,76±4,91	17±3,05	12,2±4,68	13,73±3,28	18±4,74	8,06±1,9	9,53±2,26	5,86±2,58	5,8±2,88
29	23,93±5,75	33,43±8,37	19,96±4,26	23,23±4,74	17,83±2,48	14,6±3,07	10,33±2,58	12,87±4,09	6,86±3,52	7,73±4,26	5,46±2,53	5,53±2,3
30	24,53±5,67	32,4±7,03	18,56±3,48	20,06±4,94	17,93±2,41	15,13±4,22	14,13±6,46	19,47±9,83	7,06±2,63	8,26±2,91	5,66±2,38	6,13±2,5

Tabla 3.3. Medias y desvíos del carácter LR para las 30 FMH en los diferentes tratamientos realizados (C, S1, S2).

FMH	LR		
	C	S1	S2
1	35,35±4,67	19,76±1,97	16,51±2,29
2	33,79±6,73	22,79±3,95	15,27±2,04
3	30,17±7,13	21,13±4,4	15,26±2,62
4	34,41±6,46	19,47±3,92	17,18±2,8
5	34,65±9,77	18,85±2,84	18,06±3,33
6	28,89±7,88	18,17±2,78	18,31±3,37
7	32,15±6,35	19,67±2,7	19,45±4,15
8	30,43±8,76	22±4,3	21,61±2,36
9	34,23±6,18	20,56±3,54	17,17±3,79
10	32,96±7,7	22,01±4,67	21,61±4,83
11	33,04±8,06	19,45±4,06	16,02±4,32
12	28,09±4,08	22,28±3,98	17,06±3,5
13	25,04±3,36	20,29±4,61	17,99±5,84
14	25,95±7,29	21,93±4,76	16,19±3,26
15	31,2±8,04	20,32±2,28	21,07±3,77
16	26,96±5,97	19,83±4,4	18,93±4,23
17	29,19±6,6	22,78±5,03	18,87±4,85
18	37,47±7,7	20,39±2,53	17,12±2,55
19	33,78±7,01	20,01±3,32	17,17±4,94
20	34,89±8,02	20,87±3,54	20,06±7,11
21	31,28±4,96	22,06±3,77	18,64±4,74
22	34,38±8,29	21,68±2,86	19,92±3,56
23	28,14±5,03	18,66±2,59	17,44±3,72
24	31,35±5,82	21,83±6,09	16,25±2,18
25	27,27±7,23	18,49±3,45	16,66±3,9
26	33,08±6,38	20,73±5,43	16,08±2,97
27	27,65±5,53	18,81±9,19	16,37±4,28
28	27,51±6	20,57±3,99	17,31±4,74
29	27,9±6,33	20,72±4	18,76±4,5
30	28,13±8,84	21,36±6,65	16,6±3,4

Anexo 4

Tabla 4.1. Medias y desvíos de los caracteres número de macollos y altura para las 30 FMH en los distintos tratamientos y tiempos evaluados.

FMH	Número de macollos						Altura					
	1		2		F		1		2		F	
	Control	Sequía	Control	Sequía	Control	Sequía	Control	Sequía	Control	Sequía	Control	Sequía
1	7,13±2,45	7,33±2,13	10,27±3,9	9,73±3,58	12,27±3,94	9,4±3,89	13,83±2,38	14,22±2,54	16,09±3,39	15,43±2,87	17,83±3,71	16,71±2,77
2	6,93±1,83	6,67±2,53	10,67±2,72	8,6±3,44	12,93±3,24	8,53±4,12	14,55±3,23	15,31±2,43	16,26±3,59	16,98±3,92	18,43±4,14	17,83±4,19
3	9,67±2,89	8±2,51	12,33±4,01	9,8±3	15,73±4,27	9,93±2,37	13,05±2,21	14,23±2,66	14,37±3,42	15,65±3,3	16,21±3,45	17,34±3,39
4	10,4±2,77	9,47±2,61	13,87±3,07	11,93±3,13	16,07±3,59	11,93±4,13	12,93±2,39	13,33±2,51	14,27±4,19	13,07±2,92	16,15±3,29	14,17±3,01
5	8,07±2,22	8,2±2,76	11,33±3,5	10,2±3,63	13,6±4,01	9,73±3,56	12,25±1,67	12,93±3,44	13,74±2,08	13,63±4,09	15,1±2,32	14,79±4,31
6	7,73±1,94	7,8±3,19	10,4±2,1	9±2,93	12,2±2,37	8,93±3,73	13,7±2,67	13,31±2,44	14,53±3,39	14,34±2,62	16,47±3,13	16,33±2,92
7	7,27±3,2	7,8±2,48	9,87±3,58	10,07±3,77	12,13±5,14	9,73±3,49	13,57±2,9	14,14±1,98	15,48±3,56	14,54±1,59	16,89±3,16	17,81±8,26
8	7,8±1,7	8,27±2,99	10,33±2,13	10,47±3,29	11,87±2,56	9,53±1,81	14,61±1,99	13,59±2,67	16,95±2,86	15,63±3,26	18,97±3,25	16,44±3,72
9	12,07±5,01	11,6±2,77	17,2±6,77	15±4	20±7,46	15,2±4,07	12,05±2,13	15,2±2,25	14,22±2,68	17,67±2,3	15,78±2,82	17,95±1,96
10	8,07±2,58	8,53±3	10,4±3,16	10,67±4,12	12,2±3,63	9,53±3,52	15,76±1,53	15,24±2,88	17,42±3,12	16,99±3,04	20,03±2,65	17,99±3,33
11	10,53±3,46	11,47±2,92	14,27±5,22	14,47±3,38	15,67±5,33	13,4±2,95	10,68±0,93	12,59±2,25	11,65±1,58	13,32±3,23	12,57±1,36	14,01±2,74
12	10,87±3,38	8,47±2,95	13,93±4,98	11,4±3,5	16,93±6,08	10,73±3,84	12,75±2,37	12,66±2,05	14,23±3,46	13,35±1,97	15,39±3,24	14,23±1,96
13	11,6±3,89	10,87±1,88	17,07±5,18	14,2±2,43	20,8±6,96	15,07±2,81	10,9±2,54	11,26±1,58	12,78±2,99	13,19±3,33	14,75±2,94	14,4±3,82
14	6,93±1,87	7,2±2,27	9,8±2,62	9,33±3,29	12,13±3,5	9,87±3,09	11,43±1,63	12,7±3,31	14,44±3,03	15,77±2,82	15,87±2,11	16,35±2,6
15	8,73±3,81	7,6±2,8	13,2±5,53	10±3,98	15,47±6,09	8,93±3,9	14,75±2,64	13,61±2,53	17,79±3,48	15,37±2,98	20,19±3,87	16,67±2,7
16	9,87±3,7	10,93±2,34	12,13±3,34	12,6±2,69	15,47±5,36	11±2,24	13,13±2,05	11,84±1,84	14,25±3,16	13,5±2,72	16,04±3,62	13,09±1,96
17	10,13±3,8	12,07±4,17	13,87±3,46	14±5,24	16,27±4,01	14,2±5,48	11,72±2,98	11,69±1,65	13,51±3,13	12,09±1,85	14,26±1,99	13,16±1,92
18	10,2±3,67	12,8±4,41	14,2±6,59	15,47±4,41	14,8±6,57	15,47±5,13	11,9±2,62	12,83±3,91	13±2,98	13,57±3,72	13,69±3,51	14,37±3,58
19	9,6±2,95	8,67±2,61	12,4±3,6	11,13±2,8	14,4±4,31	10,93±3,33	13,98±1,62	14,93±1,9	16,15±1,91	16,74±1,99	17,64±2,29	17,67±2,44
20	8,47±2,23	7,2±1,82	11,67±2,32	10,2±1,97	14,13±3,02	10,2±2,04	14,09±2,47	13,11±1,48	17,22±3,98	14,77±2,01	18,83±4,1	15,59±1,89
21	11,27±2,34	11,8±2,98	15,8±2,88	15,2±4,09	17,87±3,18	15,13±4,53	12,15±2,07	12,49±1,82	13,42±2,3	12,71±2,26	13,71±2,68	13,9±2,38
22	11±2,54	12,4±2,16	15,2±3,49	15,13±2,95	16,8±4,31	13,93±4,17	12,88±2,36	13,01±2,67	14,44±3,3	13,66±3,27	15,4±3,51	15,11±3,71
23	11,8±4	11,47±2,2	16,67±5,55	13,87±2,67	18,53±5,94	14,07±2,99	14,68±3,44	14,28±2,54	17,81±2,8	14,27±3,34	17,83±3,53	15,34±3,05
24	13,87±4,12	12,13±3,83	18,47±5,18	14,8±3,51	24,33±7,46	15,53±5,71	12,72±2,76	11,19±2,03	14,74±3,78	11,21±2,44	16,11±3,48	12,3±2,08
25	8±2,14	8,73±2,28	10,8±3,61	11,07±2,37	11,67±4,3	10,73±3,22	14,79±2,86	15,92±2,42	16,63±4,22	17,03±2,67	18,19±4,38	18,14±2,74
26	10,87±3,81	10,93±3,56	15,07±4,08	14,8±4,59	17,27±4,83	15,33±5,43	15,25±2,46	14,25±3,27	16,62±2,77	14,03±2,99	17,69±2,99	15,41±3,34
27	6,13±2,47	7±2,33	8,87±2,92	8,33±3,35	11±3,95	8,67±3,02	15,12±1,73	15,85±2,69	18,73±3,71	17,95±4,43	19,97±3,92	18,4±3,53
28	8,27±2,69	7,4±2,53	11,07±4,13	9,13±3,38	13,27±4,79	9,13±3,29	15,39±2,81	14,29±2,41	17,94±4,15	14,93±2,58	19,24±4,25	16,11±2,46
29	10,67±2,19	11,73±3,77	14,2±2,68	13,4±4,26	15,33±4,19	12,07±3,58	13,42±2,44	13,46±4,33	14,65±2,39	14,87±3,43	16,59±2,21	15,53±3,64
30	10,8±3,17	10,73±3,15	14,87±5,17	11,53±2,85	15,87±5,74	11,47±3,02	12,99±1,78	13,5±2,82	14,35±3,33	13,49±2,65	14,93±2,71	14,07±2,78

Tabla 4.2. Medias y desvíos de los caracteres peso fresco y peso seco para las 30 FMH en los diferentes tratamientos evaluados.

FMH	Peso fresco		Peso seco	
	Control	Sequía	Control	Sequía
1	2,02±0,71	0,77±0,2	0,27±0,12	0,22±0,05
2	2,14±0,85	0,77±0,31	0,29±0,11	0,19±0,09
3	2,48±0,63	0,89±0,33	0,33±0,09	0,25±0,1
4	2,69±0,87	0,88±0,37	0,37±0,16	0,24±0,11
5	2,32±0,49	0,73±0,23	0,32±0,07	0,25±0,09
6	2,08±0,63	0,76±0,32	0,28±0,08	0,25±0,1
7	2,09±0,42	0,92±0,32	0,3±0,07	0,26±0,12
8	2,3±0,61	0,89±0,18	0,31±0,08	0,26±0,06
9	2,43±0,67	1,08±0,23	0,34±0,1	0,31±0,08
10	2,36±0,4	0,81±0,26	0,32±0,08	0,27±0,08
11	1,98±0,59	0,75±0,27	0,27±0,09	0,25±0,08
12	2,13±0,56	0,67±0,16	0,31±0,08	0,23±0,06
13	2,42±0,95	0,91±0,48	0,32±0,13	0,26±0,08
14	1,86±0,42	0,84±0,21	0,25±0,06	0,23±0,06
15	2,7±1,27	0,81±0,25	0,36±0,18	0,23±0,07
16	2,01±0,65	0,61±0,12	0,26±0,1	0,21±0,04
17	2,08±0,44	0,89±0,3	0,29±0,05	0,28±0,1
18	1,79±0,71	0,84±0,23	0,25±0,09	0,27±0,08
19	2,11±0,59	0,9±0,26	0,31±0,09	0,28±0,06
20	2,59±0,76	0,83±0,21	0,37±0,12	0,25±0,06
21	2,14±0,58	0,89±0,35	0,31±0,09	0,28±0,1
22	2,13±0,54	0,86±0,24	0,3±0,08	0,3±0,07
23	3,41±1,26	0,84±0,17	0,44±0,17	0,27±0,06
24	4,12±2,69	0,81±0,19	0,52±0,32	0,26±0,09
25	2,33±0,97	0,87±0,3	0,34±0,15	0,3±0,1
26	3,25±1,08	1,08±0,4	0,47±0,18	0,36±0,15
27	2,27±1	0,8±0,24	0,27±0,19	0,23±0,08
28	2,37±0,98	0,78±0,3	0,3±0,16	0,21±0,11
29	2,31±0,5	0,73±0,28	0,33±0,08	0,26±0,09
30	2,42±0,82	0,66±0,24	0,3±0,14	0,24±0,08