



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Agrarias
Licenciatura en Recursos Naturales

Análisis de la efectividad de la apomixis en la fijación de caracteres a través de generaciones sucesivas

Valeria Busnelli
Directora: Dra. Luciana Delgado
Codirectora: Ing. Agr. (Mg.) Verónica Anibalini

Lugar de trabajo: Parque José F. Villarino- Facultad de Ciencias Agrarias

2025

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Características de <i>Paspalum notatum</i> , una gramínea forrajera apomíctica	6
1.2 Desarrollo reproductivo.....	8
1.3 Aplicación de la apomixis en el mejoramiento.....	13
1.4 Metodologías de determinación del comportamiento reproductivo	16
2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS	17
2.1 Objetivo General.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
2.3 Hipótesis	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Sitio de trabajo	18
3.2 Material Vegetal	18
3.3 Condiciones de germinación y crecimiento.....	19
3.4 Diseño Experimental.....	19
3.5 Recolección de datos climáticos.....	20
3.6 Caracterización Fenotípica	21
3.7 Determinación del área foliar.....	21
3.8 Análisis citoembriológico.....	23
3.9 Análisis Estadístico.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Análisis de la estabilidad fenotípica intra-generacional.....	25
4.2 Evaluación del efecto del ambiente sobre las generaciones A1	28
4.3 Análisis comparativo inter-generacional entre las poblaciones A1 y A2	32
4.4 Caracterización del comportamiento reproductivo	35
5. DISCUSIÓN	38
5.1 Efecto ambiental.....	38
5.2 Caracterización del comportamiento reproductivo	42
5.3 Variación transgeneracional	43
6. CONCLUSIONES	45
7. BIBLIOGRAFÍA	46
8. ANEXO	54

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia, por apoyarme incondicionalmente con todas las decisiones que tomé y seguiré tomando en mi vida.

Gracias a mi directora y a mi codirectora, por acompañarme, ayudarme y guiarme en este proceso y por comprender cada momento por el que pasé a lo largo de este recorrido.

Gracias a mis amigos por querer siempre lo mejor para mí y por confiar en mí cuando ni siquiera yo lo hacía.

RESUMEN

Paspalum notatum es una gramínea nativa, perenne empleada para pastoreo directo. Las poblaciones naturales se encuentran organizadas en complejos agámicos multiploides, el citotipo diploide es sexual y auto-incompatible mientras el tetraploide es auto-compatible y se reproduce por apomixis gametofítica apospórica, generando progenies clonales de la planta madre. Los sacos embrionarios aposóricos (SEAs) se originan a partir de una célula somática no reducida, luego el embrión se forma por partenogénesis, y el endosperma por pseudogamia. En este trabajo se analizó la estabilidad intra- e inter-generacional y el efecto ambiental, de caracteres vegetativos y reproductivos en el cultivar híbrido tetraploide apomíctico de *P. notatum*, Boyero-UNNE. Se realizaron evaluaciones a campo durante dos campañas consecutivas. En la primera, se analizaron tres poblaciones de la primera generación de Boyero-UNNE, obtenidas durante tres campañas diferentes, y se obtuvieron las semillas para la segunda generación. En la segunda campaña, se evaluaron las poblaciones de ambas generaciones. Las variables medidas fueron altura de planta, número de macollos, área foliar, largo de vara y de racimo. En cuanto al comportamiento reproductivo se cuantificaron los SEs, aposóricos y sexuales, en la primera generación. En las dos campañas se observó variabilidad intra-generacional para ambas generaciones. El efecto ambiental se evaluó comparando la primera generación durante las dos campañas y se observó una reducción general de los parámetros analizados durante la segunda campaña que presentó una disminución significativa de las precipitaciones acumuladas, respecto al promedio histórico. En cuanto al comportamiento reproductivo, se observó que un 76-78% de ovarios contenía SEAs, un valor significativamente menor al de Boyero-UNNE caracterizado originalmente en la localidad de Corrientes. La comparación de los parámetros fenotípicos entre dos generaciones sucesivas reveló estabilidad para la mayoría de los caracteres analizados. Estos resultados reflejan que los híbridos apomícticos presentan estabilidad fenotípica trans-generacional pero manifiestan variabilidad frente a cambios ambientales.

Palabras clave: apomixis, efecto ambiental, *Paspalum notatum*, trans-generacional

ABSTRACT

Paspalum notatum is a native perennial grass used for direct grazing. Natural populations are organized in multiploid agamic complexes, the diploid cytotype is sexual and self-incompatible while the tetraploid is self-compatible and reproduces by aposporic gametophytic apomixis, generating clonal progeny from the mother plant. The aposporic embryo sacs (AES) originate from a non-reduced somatic cell, which then forms the embryo by parthenogenesis, and the endosperm by pseudogamy. In this work, the intra- and intergenerational stability and the environmental effect of vegetative and reproductive traits were analyzed in the tetraploid apomictic hybrid cultivar of *P. notatum*, Boyero-UNNE. Field evaluations were carried out during two consecutive seasons. In the first campaign, three populations of the first generation of Boyero-UNNE, obtained during three different campaigns, were analyzed and seeds were obtained for the second generation. In the second campaign, populations of both generations were evaluated. The variables measured were plant height, number of tillers, leaf area, cane and bunch length. Regarding reproductive behavior, SEs, aposporic and sexual, were quantified in the first generation. Intra-generational variability was observed in both seasons for both generations. The environmental effect was evaluated by comparing the first generation during the two seasons, and a general reduction in the parameters analysed was observed during the second season, which presented a significant decrease in accumulated rainfall, with respect to the historical average. Regarding reproductive behavior, it was observed that 76-78% of ovaries contained SEAs, a value significantly lower than that of Boyero-UNNE originally characterized in the Corrientes locality. Comparison of phenotypic parameters between two successive generations revealed stability for most of the traits analysed. These results reflect that apomictic hybrids show trans-generational phenotypic stability but show variability in response to environmental changes.

Key words: apomixis, environmental effect, *Paspalum notatum*, transgenerational

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características de *Paspalum notatum*, una gramínea forrajera apomíctica

Paspalum notatum es una gramínea perenne nativa de las regiones cálidas y húmedas del hemisferio occidental, su distribución natural comprende desde México, América Central e Islas del Caribe hasta Brasil, Paraguay, Argentina y Uruguay. Pertenece al género *Paspalum*, tribu *Paniceae*, subfamilia *Panicoideae*, familia *Poaceae*. El género *Paspalum* abarca cerca de 350 especies que se encuentran en regiones templadas y cálidas del continente americano, con pocas especies que no son nativas de América (Chase, 1929; Zuloaga y Morrone, 2005). De las 77 especies que habitan en Argentina, 31 se encuentran en la provincia de Santa Fe con status de nativas (Anibalini et al., 2016).

En la gran mayoría de las especies del género el número básico de cromosomas es $x=10$. En la naturaleza se encuentran organizados en complejos agámicos con diferentes niveles de ploidía y comportamientos reproductivos. Generalmente el citotipo diploide ($2n=2x$) es sexual y auto-incompatible mientras que los citotipos poliploides son apomícticos, auto-fértiles y abarcan desde $3x$ hasta $16x$ (Savidan, 2000; Quarin y Burson, 1991). La mayoría de las especies apomícticas de *Paspalum* forman sacos embrionarios apospóricos (SEA), siendo la diplosporía poco frecuente en el género (Quarin, 1992). *P. notatum* se encuentra en la naturaleza con varios citotipos: diploide ($2n=2x$), triploide ($2n=3x$), tetraploide ($2n=4x$) y pentaploide ($2n=5x$) (Rebozzio et al., 2011; Ortiz et al., 2013). El biotipo diploide *P. notatum* var. *saurae* Parodi (Pensacola bahigrass) presenta autoincompatibilidad y se reproduce de manera sexual, actualmente es cultivado como forrajera en el sureste de Estados Unidos (Ortiz et al., 2001). La forma tetraploide *P. notatum* var. *notatum* (pasto horqueta común o *common bahiagrass*) ($2n=4x=40$) se encuentra ampliamente distribuida en las praderas naturales y los bajos de Argentina, en su mayoría es apomíctico y autofértil (Quarin, 1992).

En cuanto a su crecimiento, *P. notatum*, se extiende mediante fuertes rizomas horizontales, leñosos y cortos, revestidos con las bases persistentes de vainas viejas. Las hojas son apiñadas en la base, y se extienden rígidamente alcanzando una altura común. Las láminas son lineares, generalmente glabras, de entre 2 y 30 cm de largo y 3 a 12 mm de ancho. Las inflorescencias presentan dos racimos, con espiguillas sostenidas por un brevísimo pedicelo, tomando un aspecto de espiga. Las espiguillas son aovadas, solitarias (con la flor inferior ausente), dispuestas en dos hileras a un

lado del raquis, con una longitud de 2,5 a 3,8 mm y ancho de 2 a 2,8 mm. Los estambres y las anteras son púrpuras, el fruto es un cariopse elipsoide de aproximadamente 2 mm de largo (Zuloaga y Morrone, 2005). En cuanto a la respuesta a las condiciones ambientales, se ha observado que la variedad común (*P. notatum* var. *notatum*) exhibe un patrón estacional de acumulación de materia seca, el cual está influenciado por la latitud y altitud. La temperatura, la humedad y la duración del día son los factores determinantes de sus ciclos de producción estacional (Gates et al., 2001, Anibalini, 2021).

P. notatum, forma céspedes duros que se adaptan a suelos livianos y arenosos de baja fertilidad. Destaca por su alta tolerancia a la sequía e inundaciones, y en particular, a condiciones de pastoreo intensas, lo que la convierte en una especie muy utilizada para la cría de ganado en pastoreo directo (Gates et al., 2004). Debido a sus características destacadas como forrajera, ha sido incorporada desde hace unos años a los programas de mejoramiento genético de plantas forrajeras (Valls et al., 2009). En este contexto, se creó el primer cultivar híbrido apomíctico (cv. Boyero-UNNE), cuya obtención se describe más adelante, abriendo la posibilidad de difundir su utilización en la región (Urbani et al., 2017).

Boyero-UNNE por su parte, presenta un alto valor forrajero basado en su producción, calidad y palatabilidad para el ganado, además, su producción de biomasa aérea es muy buena (Anibalini et al., 2015). Estudios recientes de Anibalini (2021), realizados en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario determinaron que *P. notatum* responde satisfactoriamente a intensidades altas de defoliación, demostrando una buena capacidad forrajera. Además, se determinó la duración de las fases y subperíodos fenológicos y la respuesta frente a condiciones diferenciales de humedad y temperatura. Se encontró que la duración de todas las fases de la etapa reproductiva y de macollaje están condicionadas principalmente por las precipitaciones, dado que reducciones significativas de las mismas y altas temperaturas disminuyen su extensión. Estos trabajos demostraron que el cultivar presenta un buen comportamiento agronómico bajo condiciones de secano en el sur de la provincia de Santa Fe (Argentina).

1.2 Desarrollo reproductivo

Las angiospermas han desarrollado diversas estrategias para garantizar el éxito reproductivo, son capaces de generar descendencia tanto por la vía sexual como por la vía asexual (Silvertown, 2008). Dentro de esta última se encuentra la reproducción por semillas: apomixis y la reproducción vegetativa: mediante propágulos, estolones, rizomas o tubérculos. La apomixis es una forma de reproducción asexual por semillas que origina plantas genéticamente idénticas a la planta madre (Asker y Jerling, 1992). Hasta el momento, este modo de reproducción sólo se ha identificado en Angiospermas, abarcando más de 400 especies de Monocotiledóneas y Dicotiledóneas, pero no se han registrado casos de apomixis en Gimnospermas (Carman, 1997). Las especies apomícticas se encuentran repartidas en más de 40 familias, perteneciendo el 75% de las plantas apomícticas a tres familias: *Asteraceae*, *Rosaceae* y *Poaceae* (Bicknell y Koltunow, 2004). *Paspalum notatum*, la especie utilizada en el presente trabajo, pertenece a la familia *Poaceae*.

Las plantas apomícticas producen sus semillas en ausencia de meiosis y sin la fecundación de la célula huevo, siendo sus descendientes genéticamente idénticos a la planta madre. Desde el punto de vista evolutivo carecen de las ventajas de la reproducción sexual, sin embargo, la apomixis podría representar una herramienta valiosa para la selección de individuos adaptados a condiciones ambientales dinámicas, pudiendo promover la perpetuación de los genotipos híbridos de mayor aptitud a dichas condiciones (Calzada et al., 1996; Quero Carrillo et al., 2010). Esta ventaja es la misma que poseen las plantas que se reproducen vegetativamente, con la diferencia de que en las plantas apomícticas los descendientes no permanecen únicamente en las inmediaciones de la planta madre, ya que la dispersión por semillas les permite explorar y colonizar mayor territorio (Schmidt et al., 2015). Además, a pesar de las supuestas desventajas de la apomixis, como la variación genética limitada, las especies apomícticas suelen ser muy adaptables y tolerantes al estrés (Albertini et al., 2019).

Desarrollo reproductivo sexual

El ciclo biológico de las Angiospermas es haplodiplonte o dihaplonte, lo que implica que alternan dos generaciones, una diploide multicelular ($2n$), el esporofito, y otra haploide multicelular (n), el gametofito. El esporofito es la fase dominante y está representado por las células somáticas de la planta. Mientras que el gametofito se

encuentra oculto dentro de las flores y está representado por el grano de polen en las flores masculinas y el saco embrionario en las femeninas (Asker y Jerling, 1992).

En la reproducción sexual, la formación de semillas comienza cuando el grano de polen se deposita en el estigma de la flor y desarrolla el tubo polínico, el cual crece por el estilo e ingresa al óvulo por la abertura micropilar. Uno de los núcleos espermáticos (n) se fusiona con la ovocélula (n) originando el cigoto ($2n$) y el otro se fusiona con los dos núcleos polares para dar origen al endosperma ($2n+n$). Después de la doble fertilización, el cigoto dará origen al embrión de la semilla, que es el comienzo de la generación esporofítica, y el endosperma formará el tejido nutritivo del embrión. De este modo, la fusión de dos gametos haploides, derivados de la distribución al azar del material genético durante la meiosis, genera progenies genéticamente diversas (Brink y Cooper, 1940; Drews y Koltunow, 2011).

Durante la megasporogénesis (esporogénesis femenina) una célula especializada de la nucela, denominada célula arquesporrial, da origen a la célula madre de las megásporas (CMM), la cual por meiosis forma cuatro megásporas haploides. Por lo general, tres de las megásporas degeneran y sólo una da lugar a la megáspora funcional, la cual, durante la megagametogénesis, forma el gametofito femenino (megagametofito) o saco embrionario (SE). Estos presentan diferentes tipos dependiendo del número de mitosis y el número de megásporas que intervienen. El tipo más común, y el que se encuentra en las especies de *Paspalum*, es el tipo *Polygonum*, que se forma a partir de tres mitosis sucesivas de la megáspora funcional originando ocho núcleos haploides contenidos en siete células: la ovocélula, dos sinérgidas, una célula central con dos núcleos polares y tres antípodas (Quarin, 1992).

El gametofito masculino, también llamado grano de polen o microgametofito, se desarrolla dentro de la antera. Durante la microsporogénesis, las células madres de las microsporas formadas a partir de un tejido especializado de la antera llamado tapetum, se reducen y dividen por meiosis generando cuatro micrósporas. Cada una de las cuales dará origen a un grano de polen formado por una célula vegetativa y una generativa en el proceso de microgametogénesis. La célula generativa sufre luego una mitosis que originará dos células espermáticas, esta división mitótica suele ocurrir en el momento en el que el grano de polen se deposita en la flor y el tubo polínico está en crecimiento, pero en algunas especies, como *Arabidopsis* y maíz, la célula generativa se divide antes de que la antera libere el polen (Schmidt et al., 2015).

Desarrollo reproductivo apomíctico

La apomixis puede darse mediante diferentes vías que comparten tres componentes de desarrollo. Un proceso denominado Apomeiosis (ausencia de meiosis) mediante el cual una célula es capaz de producir un embrión sin haber reducido su contenido genético ni haber realizado recombinación genética durante la meiosis. Otro componente de la apomixis comprende la partenogénesis, en la que el desarrollo del embrión se produce en ausencia de fecundación. El tercer componente está vinculado con la forma en la que se desarrolla el endosperma, el mismo puede formarse de manera autónoma en ausencia de fertilización o por pseudogamia, mediante la fusión del gameto masculino con el o los núcleos polares de la célula central del saco embrionario (Koltunow y Grossniklaus, 2003). La reproducción apomíctica, a través de la alteración u omisión de la meiosis, generalmente genera embriones que son clones de la planta madre. Estos embriones apomícticos pueden formarse a través de una ruta esporofítica o a través de una ruta gametofítica.

La reproducción apomíctica mediante la ruta esporofítica se denomina embrionía adventicia. En este caso, los embriones asexuales surgen directamente de la división mitótica de una célula somática de la nucela ($2n$) o de los tegumentos del óvulo ($2n$) sin que se forme gametofito. Estas células iniciales dan origen a embriones que solo pueden alcanzar la madurez si el saco embrionario sexual (SES) es fertilizado, ya que tanto los embriones sexuales como los asexuales comparten el mismo endosperma como fuente de nutrición. En cada semilla se desarrollan entonces conjuntamente varios embriones asexuales junto con el embrión sexual que se produce normalmente. Este tipo de apomixis es el más común en la naturaleza y se encuentra con mucha frecuencia en los cítricos (Koltunow y Grossniklaus, 2003). La mayoría de las especies con embriogénesis adventicia requieren endospermo generado por pseudogamia. De esta manera, la embrionía adventicia, depende de la reproducción sexual para producir el endospermo, requerido para el crecimiento y desarrollo del embrión nucelar, y la formación de semillas, mientras el desarrollo del gametofito masculino sigue la vía sexual (Koltunow, 1993).

En la apomixis gametofítica se generan SE que presentan diferencias con respecto al gametofito femenino sexual. La diferencia radica en que estos sacos son no reducidos, ya que los núcleos que los conforman no han pasado por el proceso meiótico y por lo tanto no han reducido su contenido de ADN. El embrión surge a partir de una célula huevo de un SEA en ausencia de fecundación. Según el origen de la célula que genera al SE, la apomixis gametofítica se clasifica como diplosporía o

aposporía. La gametogénesis masculina generalmente no se ve afectada, ya que en más del 90% de los casos se requiere polen funcional para la formación de endospermo viable (Hand y Koltunow, 2014).

En la diplosporía el saco embrionario no reducido se puede originar por mitosis de la célula madre de la megáspora, sin previa reducción del contenido genómico, en este caso se los denomina tipo *Antennaria*, o por falla en la meiosis, iniciando este proceso, pero abortando antes de finalizarlo, en este caso se conoce como tipo *Taraxacum* e *Ixeris* (Nogler, 1984). Casi todos los SE diplospóricos conservan la estructura de los SE de origen meiótico de tipo *Polygonum*, con tres antípodas, una célula central con dos núcleos polares, una ovocélula y dos sinérgidas. Esta estructura queda conformada luego de tres mitosis de la megáspora no reducida ($2n$) (Pessino y Ortiz, 2010). En las plantas diplospóricas el proceso sexual se ve completamente comprometido ya que la misma célula madre de la megáspora da origen al saco apomítico. Sin embargo, existen individuos diplospóricos facultativos en los cuales algunos óvulos siguen la ruta sexual y otros la asexual (Bashaw y Hanna, 1990).

En la apomixis apospórica el saco embrionario apospórico se origina por mitosis a partir de una célula somática adyacente a la línea germinal. Usualmente, determinadas células somáticas de la nucela se diferencian como células iniciales de la aposporia (IA) y adquieren una nueva capacidad para desarrollar SE (Nogler, 1984). De esta manera durante la apomixis apospórica, se pueden producir las dos vías en el mismo óvulo. La vía sexual en la cual la CMM mediante meiosis produce cuatro esporas de las cuales tres degeneran y una da lugar a una megáspora funcional que posteriormente por sucesivas mitosis, produce el SES. Al mismo tiempo y en el mismo óvulo, una o varias células nucelares se pueden diferenciar en IA y por mitosis generan el SEA (Ortiz et al., 2013). Queda conformado entonces un número variable de SEAs que pueden o no coexistir con SESs. Los SEAs muestran una constitución muy variable, y según la especie bajo la cual se describieron por primera vez se los clasificó en diversos tipos. Los sacos apospóricos del tipo *Panicum* se forman luego de dos mitosis consecutivas, con permanencia de los cuatro núcleos en un polo celular, quedando el megagametofito conformado por una ovocélula flanqueada por dos sinérgidas y una célula central uninucleada (Warmke, 1954). El tipo *Paspalum* es una variante de este tipo de aposporia que se diferencia del anterior por la constitución de la célula central, que presenta dos núcleos polares y a veces tres. Ambas estructuras se caracterizan por la ausencia de antípodas. En la aposporia tipo *Hieracium* el saco embrionario se forma después de tres divisiones mitóticas, queda así conformado por

ocho núcleos que se distribuyen hacia ambos polos, con una estructura similar al tipo *Polygonum* presente en las especies sexuales (Asker y Jerling, 1992).

La figura 1 muestra las principales diferencias en la vía de desarrollo reproductivo hasta la formación de semillas ya sea sexuales, apomícticos gametofítico y esporofíticos.

De esta manera, la reproducción sexual y la apomíctica no son procesos mutuamente excluyentes. Las plantas que pueden generar una parte de su progenie por sexualidad y una parte por apomixis se denominan facultativas. Las progenies de los genotipos facultativos pueden segregarse como clases maternas directamente por partenogénesis sin fecundación ($2n+0$), o bien pueden segregarse como clases no maternas o aberrantes. Hay tres tipos de individuos aberrantes provenientes de reproducción sexual: híbridos BIII ($2n+n$) que resultan de la fecundación de una ovocélula no reducida, híbridos BII ($n+n$), que resultan de la unión sexual habitual de dos gametos reducidos y los haploides ($n+0$) generados por partenogénesis a partir de una ovocélula reducida (Pessino y Ortiz, 2010). Las plantas que generarían teóricamente el 100% de su progenie por apomixis se denominan apomícticas obligadas, esta condición es hasta el momento teórica, ya que todas las especies parecen retener una proporción de sexualidad (Nogler, 1984).

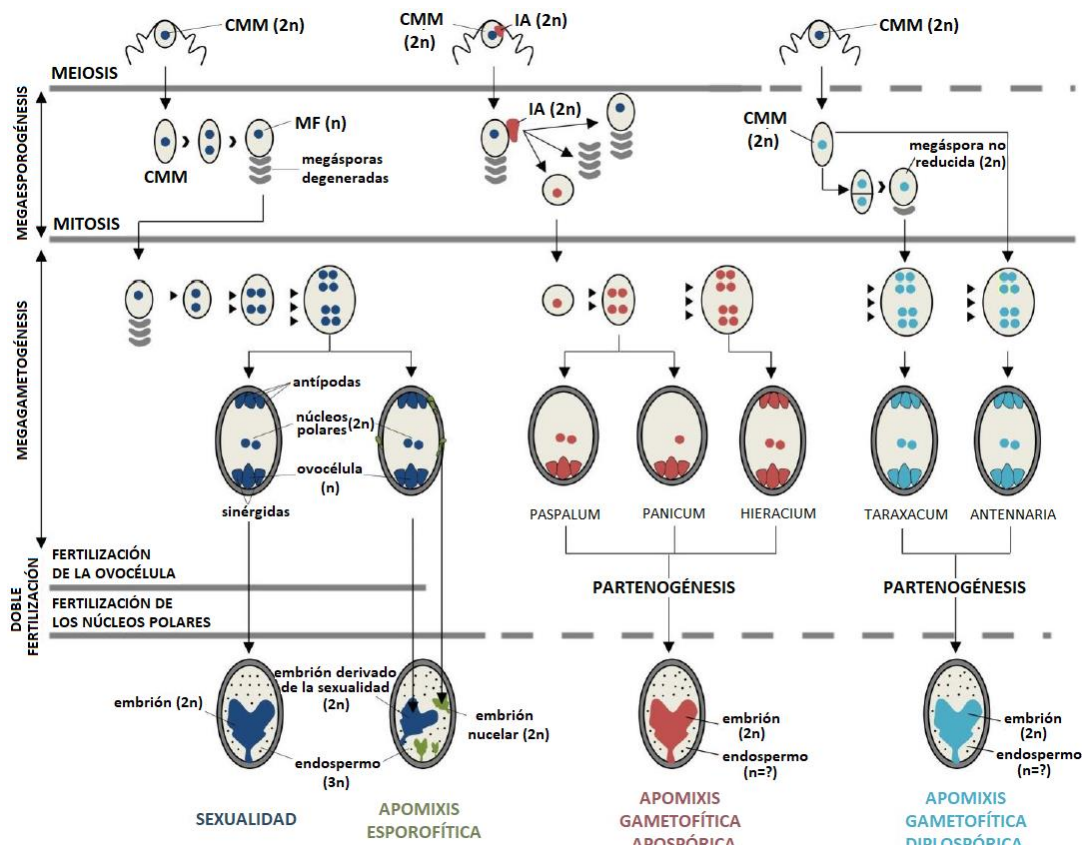


Figura 1.1. Vías de desarrollo sexual y apomítico. Esta figura muestra los eventos que conducen a la formación de los diferentes sacos siguiendo la ruta sexual y las rutas asexuales. La meiosis, la mitosis y la doble fertilización constituyen los componentes principales de la vía de formación de semillas. En la apomixis gametofítica, el saco embrionario se forma mediante aposporía o diplosporía, que se distinguen por diferentes células precursoras, la formación de embriones se inicia en ausencia de fertilización (partenogénesis); sin embargo, la formación de endospermo puede ocurrir con o sin fertilización, lo cual se representa con una línea discontinua. El nivel de ploidía (n) del endospermo formado a través de la apomixis gametofítica es variable, por lo tanto, está representado por un signo de interrogación (?).

IA, células iniciales de la aposporía; **CMM**, célula madre de la megáspora; **MF**, megáspora funcional; **►**, números de divisiones mitóticas (Figura adaptada de Colono, 2020).

1.3 Aplicación de la apomixis en el mejoramiento

Programas de mejoramiento en especies apomíticas

La apomixis es un rasgo que se puede aprovechar en el ámbito del mejoramiento de plantas y la producción de alimentos, ya que representa una herramienta beneficiosa para la estabilización de genotipos superiores y la fijación de combinaciones híbridas. Conocer el modo de reproducción y los mecanismos involucrados en la variación de la expresividad de este rasgo es determinante para llevar a cabo un programa de mejoramiento. Por otro lado, las plantas apomíticas se reproducen casi completamente de forma clonal, por lo que se hace necesario contar

con individuos sexuales del mismo nivel de ploidía del genotipo que se desea mejorar (Kumar et al., 2017). Otro requerimiento esencial para los programas de mejoramiento es contar con el recurso fitogenético adecuado, en este aspecto, los bancos de germoplasma son centros para la conservación de recursos genéticos en condiciones apropiadas que permiten prolongar su viabilidad y disponibilidad (Acuña et al., 2019). Entre los métodos de mejoramiento que hacen uso de la apomixis se pueden encontrar al menos dos líneas de trabajo. La primera es la selección de ecotipos y se enfoca en la selección dentro de la variabilidad natural de la especie, sin crear ninguna variabilidad nueva. Se seleccionan individuos en bancos de germoplasma o variedades locales, los cuales se multiplican y se evalúan en múltiples localidades y años para determinar la calidad de forraje y/o grano, tolerancia a factores bióticos y abióticos, estrés, entre otros. La mayoría de los cultivares liberados de *Paspalum* fueron seleccionados mediante este método de selección.

La segunda línea de trabajo se basa en la hibridación, la idea general de utilizar la hibridación en plantas apomícticas se relaciona con la posibilidad de liberar la diversidad natural presente en los ecotipos apomícticos, y fijar híbridos F₁ superiores. El objetivo de un programa de mejoramiento para una especie apomíctica, es identificar en la población segregante los genotipos híbridos superiores y que además sean apomícticos. Se espera que estos nuevos híbridos apomícticos sean genéticamente estables a través de generaciones asexuales indefinidas (Miles, 2007; Acuña et al., 2019). La hibridación requiere que los progenitores presenten el mismo nivel de ploidía. Para ello, es necesario contar con plantas sexuales tetraploides, las cuales en una primera instancia se han obtenido de forma sintética mediante el tratamiento con colchicina (Quarin et al., 2001). De esta manera, los genotipos apomícticos se utilizan como dadores de polen y los sexuales como progenitores femeninos. Luego, se analiza la progenie para seleccionar e identificar los individuos con un alto grado de expresión de apomixis y con características agronómicas deseables. Recientemente, se han generado poblaciones sintéticas tetraploides sexuales que han sido utilizadas en programas de mejoramiento de especies apomícticas, como lo demuestra el trabajo de Zilli et al. (2018).

P. notatum y *P. dilatatum* se destacan como las gramíneas forrajeras más ampliamente cultivadas dentro del género *Paspalum*. Los objetivos específicos para la mejora de *Paspalum* incluyen: aumentar la tolerancia al frío y el crecimiento durante estaciones frías, mejorar el rendimiento de semillas, fortalecer la resistencia al pastoreo, elevar el valor nutritivo y aumentar la resistencia a estreses bióticos. La

hibridación se ha convertido en una herramienta más reciente para enriquecer los cultivares con estos rasgos específicos de interés. El éxito de este método en el mejoramiento de *Paspalum* depende en gran medida de la disponibilidad de citotipos sexuales poliploides (Acuña et al., 2019). La mejora del *Paspalum* apomíctico a través de la hibridación tuvo sus inicios en el trabajo pionero del Dr. Burton y sus colegas. Estos investigadores generaron plantas tetraploides sexuales mediante el uso de colchicina (Burton y Forbes, 1960) y las cruzaron con ecotipos tetraploides naturalmente presentes, obteniendo así numerosos híbridos apomícticos. Sin embargo, es importante destacar que estos híbridos nunca fueron liberados como cultivares. A partir de uno de los híbridos tetraploides sexuales originales, se realizaron cruces con un ecotipo local argentino, dando lugar a varios híbridos. De entre estos, se seleccionó y liberó el primer cultivar híbrido apomíctico de *Paspalum*, desarrollado mediante hibridación, conocido como 'Boyero-UNNE' (Ortiz et al., 2013; Urbani et al., 2017).

Obtención del híbrido tetraploide Boyero-UNNE

Boyero-UNNE es un híbrido tetraploide apomíctico pseudógamo mejorado generado por Urbani y colaboradores en la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional del Nordeste (Urbani et al., 2017). Es el primer cultivar híbrido tetraploide apomíctico registrado de *Paspalum notatum* desarrollado mediante un esquema de hibridación sexual x apomíctica. El progenitor femenino (Q3664) es una planta vigorosa de estigmas blancos seleccionada a partir de un cruzamiento entre una planta sexual tetraploide inducida por colchicina y una cepa tetraploide apomíctica silvestre con estigmas blancos. Su alto porcentaje de sexualidad (70%, Urbani et al., 2017) junto con el color de sus estigmas, son de especial interés para utilizarse como genotipo materno en estos esquemas de mejoramiento. El progenitor masculino es una cepa tetraploide apomíctica silvestre de estigmas morados con una baja capacidad de reproducción sexual, como se ha documentado en estudios anteriores (Ortiz et al., 1997; Martínez et al., 2001). Del cruzamiento entre ambos progenitores se seleccionaron las plantas híbridas, que exhibían estigmas morados, y con más del 80% de aposporía de los híbridos evaluados (Urbani et al., 2017). Esta población dio origen al cv. Boyero que presenta un hábito de crecimiento más erguido y produce mayor cantidad de materia seca que los biotipos silvestres (Urbani et al., 2017).

1.4 Metodologías de determinación del comportamiento reproductivo

Como se menciona en la caracterización reproductiva del híbrido Boyero-UNNE, para las especies apomícticas apospóricas facultativas, existen diversas técnicas que permiten determinar el comportamiento reproductivo. Dependiendo de la metodología aplicada, se obtendrá un tipo específico de información. La identificación de regiones genómicas ligadas a la apomixis en el género *Paspalum* permitió el desarrollo de marcadores moleculares basados en ADN (Stein et al., 2004). La disponibilidad de marcadores moleculares confiables ligados a la apomixis, permite una clasificación temprana del modo de reproducción utilizando tejidos de plántulas, mejorando así la eficiencia del proceso de mejoramiento (Brugnoli et al., 2019). Debido a la variabilidad en la expresividad de la aposporia reportada en las especies de *Paspalum*, esta técnica no permite identificar aquellos híbridos altamente apomícticos de los que presentan baja expresividad del carácter, por lo que son necesarias técnicas auxiliares como la observación de SE maduros y la caracterización de las semillas mediante citometría de flujo.

La observación de SE mediante microscopía evalúa la expresividad de la aposporia de las plantas en etapa de floración. Esta técnica permite determinar la capacidad de una planta para producir SEAs, ya que los SE tipo *Paspalum* no presentan antípodas y son fácilmente distinguibles de los SESs. No obstante, la presencia de SEAs no garantiza que la planta deje descendencia por esta vía, ya que podrían no generar semillas o, como coexisten con SESs, podrían ser estos los que finalmente produzcan semillas por sexualidad (Delgado et al., 2014).

Para poder determinar el origen reproductivo de la descendencia, ya sea por reproducción sexual o asexual, se utiliza una técnica que evalúa la semilla. En este caso se trabaja con Citometría de flujo, este método se emplea para medir el contenido de ADN en núcleos de células vegetales. Mediante una estrategia desarrollada por Matzk et al. (2000), FCSS, del inglés Flow cytometry Seed Screening, que permite determinar el contenido de ADN en núcleos aislados a partir de los cariopses. De esta manera se puede conocer la relación de ploidía entre el embrión y el endosperma de una semilla a partir de la cual se deduce la vía reproductiva que le dio origen a la semilla (Matzk et al., 2000). Dependiendo de si los SE, son reducidos o no reducidos, y si las células huevos fueron o no fertilizadas, se producen diferentes relaciones de ploidía entre el embrión y el endospermo, lo que permiten determinar qué

comportamiento reproductivo dio origen a las semillas, así como determinar la viabilidad de los SE producidos ya sean sexuales o apomícticos (Matzk et al., 2000).

2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Analizar la estabilidad de caracteres vegetativos y reproductivos, en híbridos apomícticos de *Paspalum notatum*, a fin de corroborar la utilización de la apomixis como herramienta para la fijación de caracteres fenotípicos complejos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analizar la estabilidad fenotípica en la primera generación (A1) del cultivar Boyero-UNNE en tres poblaciones colectadas en diferentes campañas.
- ✓ Desarrollar segundas generaciones (A2), a partir de generaciones A1.
- ✓ Analizar caracteres vegetativos y reproductivos en ambas generaciones.

2.3 Hipótesis

La expresión de la apomixis, forma natural de reproducción asexual por semillas, permite el mantenimiento indefinido de las combinaciones híbridas, la estabilidad del cultivar y la transmisión generacional de los caracteres seleccionados en el cultivar híbrido Boyero-UNNE de *P. notatum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio de trabajo

El estudio se realizó en el Campo Experimental “José Félix Villarino” de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (UNR). Se encuentra situado en la localidad de Zavalla, Santa Fe, a 33° 01' de latitud sur y 60° 53' de longitud oeste, dista 22 km al sudoeste de la ciudad de Rosario. El campo tiene una extensión de 350 hectáreas y se compone de módulos de investigación y módulos productivos en los que se desarrollan actividades de docencia, investigación a campo, extensión y producción agropecuaria. El trabajo se desarrolló en el lote N° 5 dentro del módulo de investigación en una parcela de 7 m x 15 m.

El clima de la región es húmedo y templado la mayor parte del año, con una temperatura media anual de 17,1°C. El período medio de heladas abarca desde mediados de junio hasta principios de septiembre con un desvío de 18 días, resultando el período libre de heladas de 272 días. El régimen de precipitaciones es semi-monzónico, con un total anual que varía entre 511 mm - 1378 mm, siendo la media de 966 mm (Coronel et al., 2012; Anibalini et al., 2022). El tipo de suelo corresponde a la Serie Roldán, taxonómicamente clasificado como Argiudol vértico, familia fina, ilítica, térmica. Presenta la siguiente composición y espesor de los horizontes: A1: 18-22 cm; B1: 15 cm; C21t: 45-50 cm; B22t: 20-32 cm; B3: 35-48 cm; C1: 20-40 cm; C2ca (Busso y Ausilio, 1989).

3.2 Material Vegetal

El objeto de estudio del presente trabajo fue el cultivar híbrido apomíctico: cv. Boyero-UNNE, perteneciente a *Paspalum notatum* var. *notatum* ($2n=4x=40$), nativo del centro y noreste argentino, sur de Brasil y Paraguay (Burton, 1955, Espinoza et al., 2001; Acuña et al., 2014). Este cultivar fue registrado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste en el Registro Nacional de Cultivares (RNC) y en el Registro Nacional de Propiedad de Cultivares (RNPC) pertenecientes al Instituto Nacional de Semillas (INASE) (Registro Nacional de Semillas Reg. N° 3213) y liberado en agosto del 2012 (Urbani et al., 2017). El punto de partida para la obtención de la primera generación (A1), producida a partir de Boyero-UNNE, fueron las semillas colectadas durante tres campañas consecutivas: 2015-16, 2016-17 y 2017-18, denominadas A1-1, A1-2, A1-3, respectivamente durante el desarrollo de la Tesis de maestría de la Ing. Anibalini, V. (Co-Directora de la presente Tesis).

3.3 Condiciones de germinación y crecimiento

Las semillas almacenadas a 4°C se germinaron (septiembre/octubre) en cajas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril en cámara cálida, a una temperatura de 28°C/26°C y un fotoperíodo de 14 horas de luz (Anibalini et al., 2015). En el caso de aquellas semillas que no habían superado el efecto de dormancia (6 meses), según lo establecido por Anibalini et al. (2017), se escarificaron mediante tratamiento con ácido sulfúrico (98% v/v) durante 10 minutos y luego fueron lavadas con abundante agua destilada. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a macetas y fueron llevadas a invernadero hasta alcanzar una altura aproximada de 15 cm para luego ser trasplantadas a campo (diciembre/enero).

3.4 Diseño Experimental

La primera generación A1 se obtuvo a partir del híbrido Boyero-UNNE implantado a campo previamente (2014), las semillas colectadas durante tres campañas consecutivas (2015-16, 2016-17 y 2017-18) fueron utilizadas para generar las poblaciones (A1-1, A1-2 y A1-3 respectivamente). Durante la primera campaña 2018-19 se llevaron a campo las tres poblaciones correspondientes a la primera generación A1-1, A1-2 y A1-3 de las cuales se realizó la primera caracterización fenotípica (Fig. 3.1a). Al finalizar la floración y la fructificación se colectaron semillas de todas las plantas analizadas para cada una de las tres poblaciones A1, luego se mezclaron las semillas provenientes de las plantas de cada población y a partir de esta mezcla se obtuvo la segunda generación A2. En la siguiente campaña, 2019-20, se pusieron a germinar nuevamente, las tres poblaciones A1 y las correspondientes poblaciones A2 denominadas A2-1, A2-2 y A2-3, y se llevaron a campo para ser analizadas bajo las mismas condiciones ambientales (Fig. 3.1a).

En el primer ensayo se establecieron las poblaciones A1-1, A1-2 y A1-3 a campo. Para cada población se implantaron parcelas de 40 individuos, distribuidos en líneas de 10 plantas, con una separación entre plantas y líneas de 60 cm, sin fertilización ni riego (Fig. 3.1b). Las parcelas fueron rodeadas por una línea de plantas de Boyero-UNNE original para evitar el efecto borde en los análisis.

En el segundo ensayo se establecieron al mismo tiempo las poblaciones A1-1, A1-2 y A1-3 de la primera generación y las poblaciones A2-1, A2-2 y A2-3 de la segunda generación que se distribuyeron de la misma manera que en el primer ensayo (Fig. 3.1b).

En ambos experimentos las plantas individuales son las unidades experimentales y representan las repeticiones dentro de cada población.

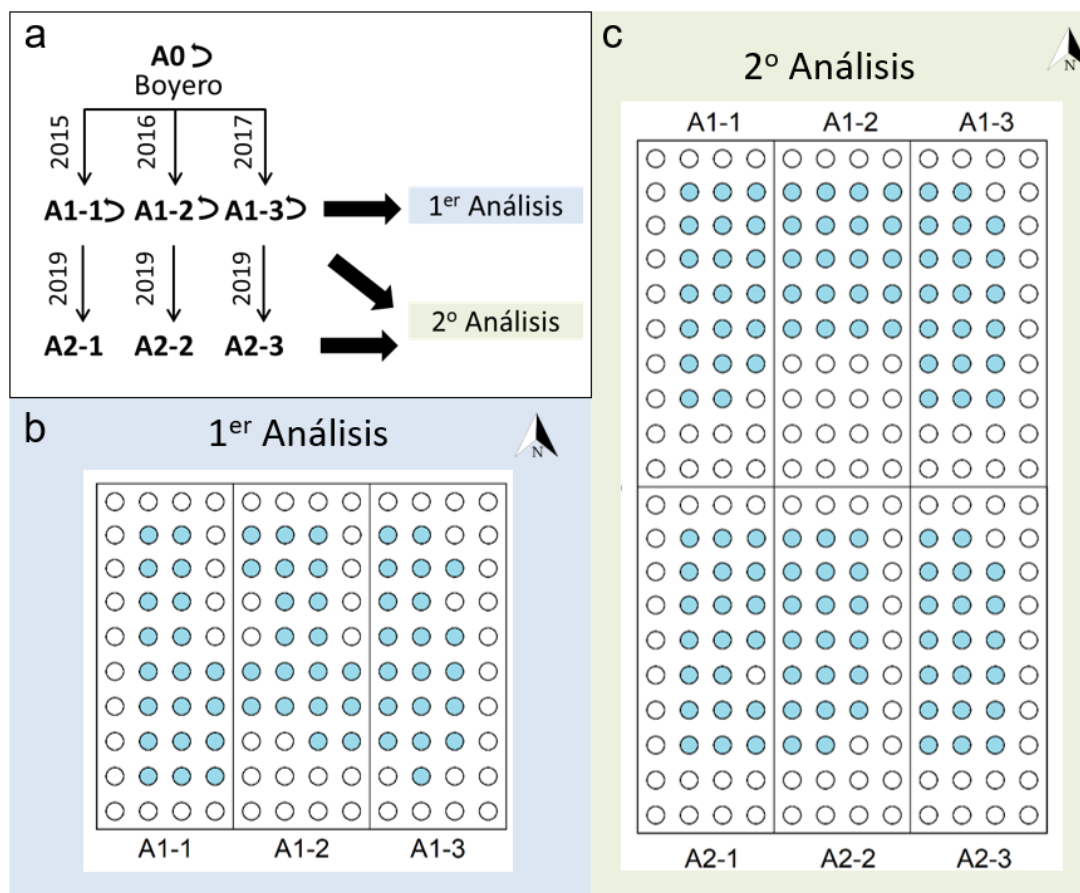


Figura 3.1. Diseño de experimental a) Esquema que describe la obtención de las poblaciones A1 y A2 y la organización de los análisis realizados. Diagrama de los ensayos a campo durante la b) Campaña 2018-19 y c) Campaña 2019-20. Las flechas, \curvearrowright , indican autopolinización. Cada planta está representada por un círculo. El color celeste indica las plantas sobre las cuales se realizaron las determinaciones. N: norte.

3.5 Recolección de datos climáticos

Para el análisis del efecto ambiental entre ambas campañas se reunieron los datos de los parámetros climáticos de precipitaciones (PP) acumuladas y temperaturas medias registradas durante los meses de diciembre a mayo en las campañas 2018-19 y 2019-20. Además, se adicionaron los promedios históricos registrados para igual período entre 1991 y 2020 en la localidad de Zavalla. Toda la información climática fue proporcionada por la Estación Agrometeorológica de la facultad de Ciencias Agrarias.

3.6 Caracterización Fenotípica

La caracterización fenotípica se efectuó en tres etapas de desarrollo: 1) a los 30 días de establecidas a campo, 2) en floración plena (cuando más del 50% de las plantas alcanzaron la floración), y 3) al finalizar la floración.

Las variables medidas de las tres etapas fueron: altura de planta (Fig. 3.2), considerada perpendicularmente desde la superficie del suelo hasta la altura de la hoja más alta (en los estadios en que las hojas, con mayor expansión foliar, presentan un quiebre se considera la altura del mismo) y el número de macollos. En el momento de la floración plena, se determinaron el área foliar y los parámetros reproductivos midiendo el largo de la vara y promediando los largos de los racimos del macollo principal (Fig. 3.2). En el caso de la población A1 de la campaña 2018-19, el parámetro área foliar también se midió en la primera y última etapa de desarrollo. Las determinaciones se realizaron sobre 20 plantas seleccionadas al azar (Fig. 3.1 b y c) de cada una de las tres poblaciones sin incluir las plantas de los bordes.

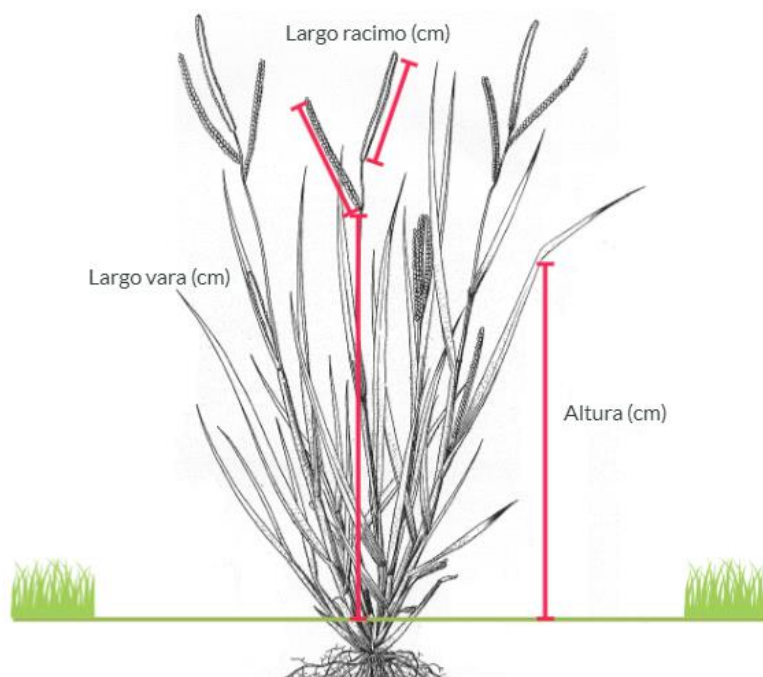


Figura 3.2. Esquema de los parámetros evaluados. El largo de racimo y largo de vara se determinaron en el macollo principal de la planta. La altura se determinó al nivel del quiebre de la hoja más alta.

3.7 Determinación del área foliar

El área foliar de las plantas se realizó mediante análisis de imágenes con el programa “Easy Leaf Area” (Easlson y Bloom, 2014). Estas medidas se registraron una única vez para cada planta en floración plena. Para ello se tomaron fotografías de la

totalidad de las plantas desde la parte superior según lo descrito por Easlon y Bloom (2014). Dado que las plantas se encontraban a campo, para eliminar las distorsiones relacionadas con el fondo, debajo de cada planta y abarcando toda su área, se colocó una tela negra rodeando la planta dispuesta en su base (Fig. 3.3). De esta manera se evita considerar erróneamente áreas que no corresponden a la planta en estudio y se optimiza el contraste entre las hojas y el fondo, con el propósito de mejorar la detección de las hojas en las imágenes. Para calibrar las imágenes se colocó como referencia un cuadrado de cartulina roja de 4 cm x 4 cm sobre la superficie negra, eliminando de esta manera la necesidad de mantener la distancia de la cámara para cada imagen (Fig. 3.3), según se aconseja en Easlon y Bloom (2014). Para la detección de los píxeles verdes y rojos correspondientes a las hojas y los patrones de referencia respectivamente se siguieron dos criterios básicos. El primero fue seleccionar los umbrales mínimos, de tal manera que no se consideren erróneamente como hojas o como patrón de referencia, pequeños ruidos en el fondo de la imagen. El segundo criterio fue fijar las relaciones verdes/rojo (G/R) y azul/rojo (B/R) para determinar con precisión cuáles píxeles se corresponden con la masa foliar y cuales con el patrón de referencia (Easlon y Bloom, 2014). Para mejorar la detección, los cuadrados utilizados como referencia se rellenaron de rojo homogéneo en las imágenes. La optimización de los parámetros se realizó en un mínimo de 10 imágenes verificando que el programa detectara toda o la mayor parte del área ocupada por las hojas (Fig. 3.3b).

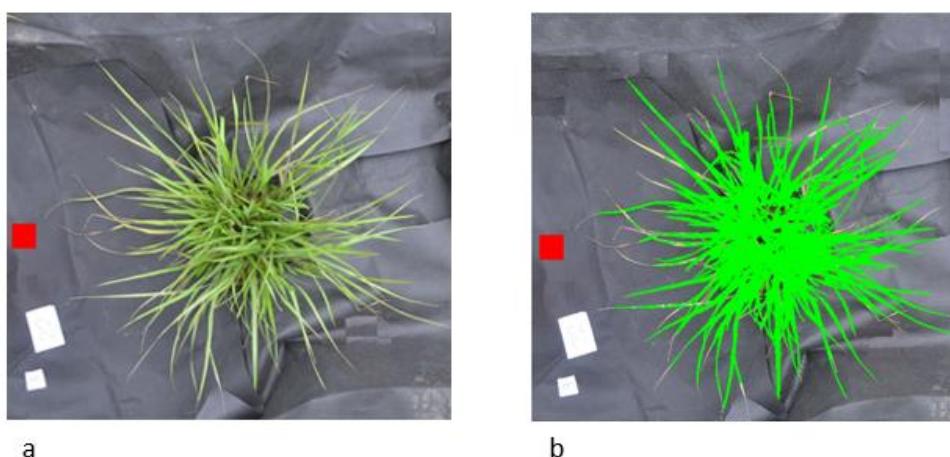


Figura 3.3. Determinación de área foliar (IAF). (a) Fotografía de una planta previa al procesamiento con Easy Leaf Area en la cual se coloreó el área de referencia de forma digital. (b) Imagen de la planta luego del procesamiento con Easy Leaf Area. El área de referencia corresponde a un cuadrado rojo de 4cm x 4cm.

3.8 Análisis citoembriológico

El comportamiento reproductivo se analizó según la capacidad de generar SEAs en las tres poblaciones A1. Las determinaciones de la proporción de ovarios que contienen SEAs se realizaron según los protocolos utilizados previamente (Delgado et al., 2014, 2016). En primer lugar, se fijaron las inflorescencias, en estadio de anthesis, en FAA (etanol al 70%: Ácido acético glacial: formaldehído, 90:5:5) por al menos 24 hs y luego se transfirieron a una solución de etanol al 70%. Posteriormente, se disectaron los pistilos de las espiguillas y se clarificaron según lo descrito por Delgado et al. (2014). Primero se deshidrataron en series sucesivas de etanol hasta alcanzar su inclusión en etanol absoluto y luego, se clarificaron con metil-salicilato mediante incubaciones sucesivas en diferentes proporciones Etanol: metil-salicilato hasta alcanzar 100% de este último (Young et al., 1979; Delgado et al., 2014). Los ovarios clarificados se observaron en un Microscopio con tecnología de contraste de interferencia diferencial (DIC). Para determinar el comportamiento reproductivo se analizaron los ovarios según las características de los SESs presentes. Los SESs del tipo *Polygonum* presentan una célula huevo, dos sinérgidas en el extremo micropilar, dos núcleos polares y un grupo de antípodas en el extremo chalazal. Los SEAs de tipo *Paspalum* se diferencian de los SESs ya que carecen de antípodas. Para determinar el porcentaje de ovarios que presentan SEAs se observaron al menos 50 ovarios de cada una de las plantas analizadas y se observaron 5 plantas de cada población. Para evaluar la posibilidad de apomixis y la posibilidad de sexualidad se consideró lo propuesto por Urbani et al. (2017). El porcentaje de SEAs de cada planta, potencial de apomixis, se considera como el porcentaje de ovarios que contengan SEAs, ya sea solos o acompañados de SESs, en relación con la totalidad de ovarios analizados. De igual manera, el porcentaje de SESs, potencial de sexualidad, se considera como la suma de los ovarios que presentan sólo SESs y los que presentan SESs acompañados de SEAs.

3.9 Análisis Estadístico

Para analizar los datos fenotípicos se realizaron análisis de rangos múltiples mediante test de Fisher (StatGraphicCenturion XVI (16.1.03)) de tal manera que las diferencias se consideraron significativas a un $p < 0,05$. Las comparaciones se realizaron para cada parámetro entre las poblaciones evaluadas. En los casos en que no se cumplía la homocedasticidad o la distribución normal se utilizó un test no paramétrico (Kruskal-Wallis).

Las comparaciones realizadas fueron las siguientes:

Con el propósito de analizar los efectos del ambiente se compararon las generaciones A1 (A1-1, A1-2 y A1-3) entre las dos campañas 2018-19 (A1 19) con 2019-20 (A1 20).

Por otro lado, para analizar el efecto de la generación se compararon las generaciones A1 vs A2 tomando las tres poblaciones como un único conjunto durante la campaña 2019-2020. Además, para analizar los posibles efectos dentro de una misma generación se compararon entre sí las generaciones A1-1, A1-2 y A1-3 así como A2-1, A2-2 y A2-3. Las proporciones de SEAs y SESs producidas por los individuos de cada población A1 se compararon mediante el test de Fisher (Upton, 1992) utilizando un servicio online MeasuringU (<http://www.measuringu.com/ab-calc.php>), según análisis previos (Delgado et al., 2016). Los intervalos de confianza (IC) del 95% para las proporciones de SE para cada población fueron calculados siguiendo el método descrito por Newcombe (1998), sin corrección de continuidad, utilizando la herramienta online (<http://vassarstats.net>) (Delgado et al., 2016).

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de la estabilidad fenotípica intra-generacional

La caracterización fenotípica se inició sobre la primera generación A1, las cuales se pusieron a campo durante dos campañas consecutivas (Fig. 4.1 a y b).

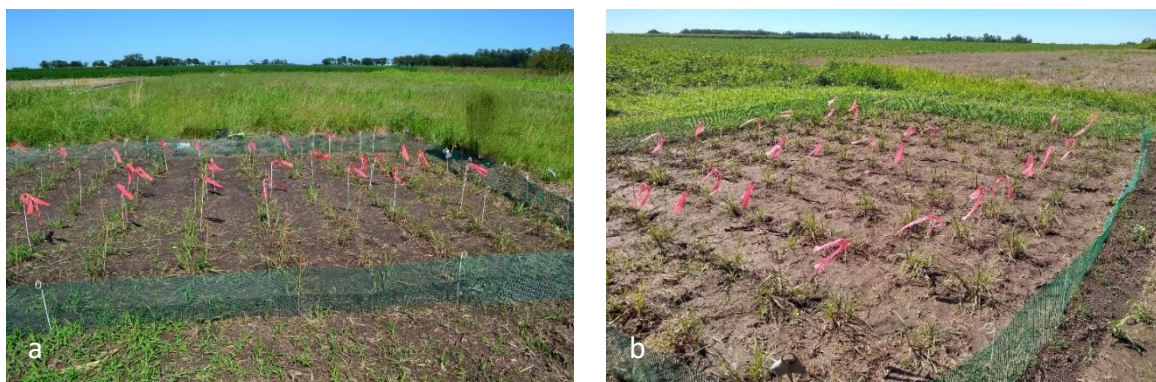


Figura 4.1. Fotografías de las poblaciones a campo. (a) poblaciones A1 en enero del 2019, momento de la segunda medición de los parámetros vegetativos y reproductivos de la campaña 2018-19. (b) poblaciones A1 y A2 en abril del 2020, momento en el que se realizó la segunda medición de los parámetros vegetativos y reproductivos de la campaña 2019-20. Las cintas rojas se utilizaron para marcar las plantas a las que se les realizaron las mediciones.

Estos análisis se realizaron entre diferentes poblaciones de una misma generación. En principio se analizó la primera generación A1 de la campaña 2018-19 y luego se analizaron la primera y segunda generación (A1 y A2) de la campaña 2019-20. Estas poblaciones fueron caracterizadas y comparadas entre sí, en ambos períodos (Fig. 4.2 y 4.3).

En la figura 4.2 se comparan los parámetros vegetativos y reproductivos entre las poblaciones A1-1, A1-2 y A1-3 de la primera campaña 2018-19.

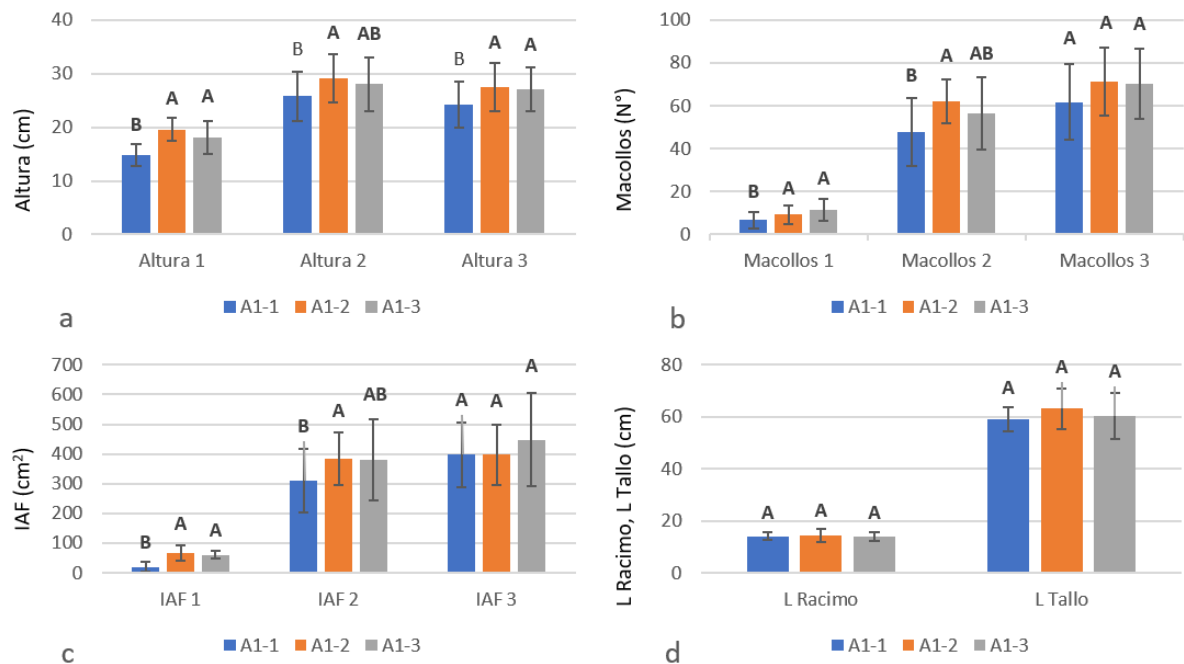


Figura 4.2. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, evaluados en tres etapas de crecimiento, entre las poblaciones A1 de la campaña 2018-19. (a) Altura de la planta (cm), (b) número de Macollos y (c) área foliar (IAF, cm²). En cuanto a los parámetros reproductivos se determinaron en floración plena, (d) largo de racimo (L Racimo, cm) y largo de tallo (L Tallo, cm). Las barras indican la desviación estándar para cada parámetro; diferentes letras indican diferencias significativas entre las poblaciones comparadas ($p < 0,05$).

En relación con los parámetros vegetativos se observó que en general una de las poblaciones (A1-1) se diferencia de las otras dos (A1-2 y A1-3) mostrando una disminución significativa ($p < 0,05$) de los parámetros analizados, principalmente en las etapas 1 y 2, mientras que entre las otras poblaciones los parámetros fueron homogéneos para todas las etapas analizadas (Fig. 4.2 a, b y c). La altura de la población A1-1 fue menor para las tres mediciones (excepto para la Altura 2 en A1-3, cuya diferencia no mostró significancia) (Fig. 4.2a), mientras que el número de macollos y el área foliar mostraron disminución significativa en las etapas más jóvenes 1 y 2 (Fig. 4.2 b y c). Los parámetros correspondientes a largo de racimo y largo de tallo resultaron ser homogéneos en los 3 grupos (Fig. 4.2d).

Posteriormente, durante la campaña 2019-20 se replicaron los análisis comparativos de la misma generación (Fig. 4.3), en este caso el área foliar solo se determinó en la segunda etapa de crecimiento. Durante este período no se repitió el mismo comportamiento entre las poblaciones. A diferencia de lo sucedido en 2018-19, en 2019-20 la población A1-1 tuvo mayor crecimiento que las otras dos poblaciones para todos los parámetros, vegetativos y reproductivos, a excepción de la primera medición de la altura (Fig. 4.3a y Tabla 8.3, Anexo). Entre las poblaciones

A1-2 y A1-3, ésta última en general, tuvo mayores parámetros vegetativos que la A1-2 (Fig. 4.3 a, b y c) y en contraposición tuvo menores parámetros reproductivos (Fig. 4.3d). Tanto el número de macollos en los tiempos 2 y 3 como la altura de tallo se diferenciaron significativamente en las tres poblaciones.

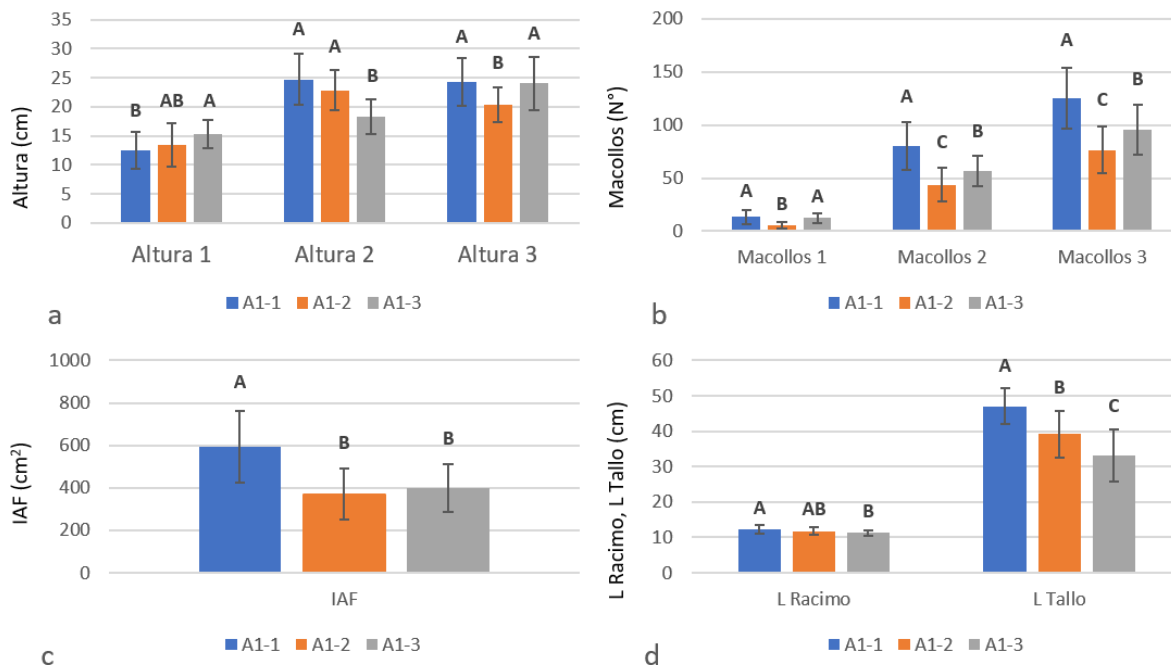


Figura 4.3. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, evaluados en tres etapas de crecimiento, entre las poblaciones A1 de la campaña 2019-20. (a) alturas de la planta (cm), (b) número de Macollos y (c) área foliar (IAF, cm²). En cuanto a los parámetros reproductivos se determinaron en floración plena, (d) largo de racimo (L Racimo, cm) y largo de tallo (L Tallo, cm). Las barras indican la desviación estándar para cada parámetro; diferentes letras indican diferencias significativas entre las poblaciones comparadas (p<0,05).

Además, durante la campaña 2019-20, se compararon las poblaciones de la segunda generación, A2-1, A2-2 y A2-3 (Fig. 4.4). En este caso las alturas en las etapas 1 y 3 resultaron homogéneas entre los tres grupos. El resto de los caracteres mostraron similitudes entre dos poblaciones a excepción del número de macollos en la etapa 1 que presentó diferencias entre las tres poblaciones. Sin embargo, es interesante resaltar que la segunda generación A2-1, siempre presentó mayor o igual crecimiento que las otras poblaciones (Anexo, Tabla 8.5), mientras las poblaciones A2-2 y A2-3 se parecen más en los parámetros vegetativos.

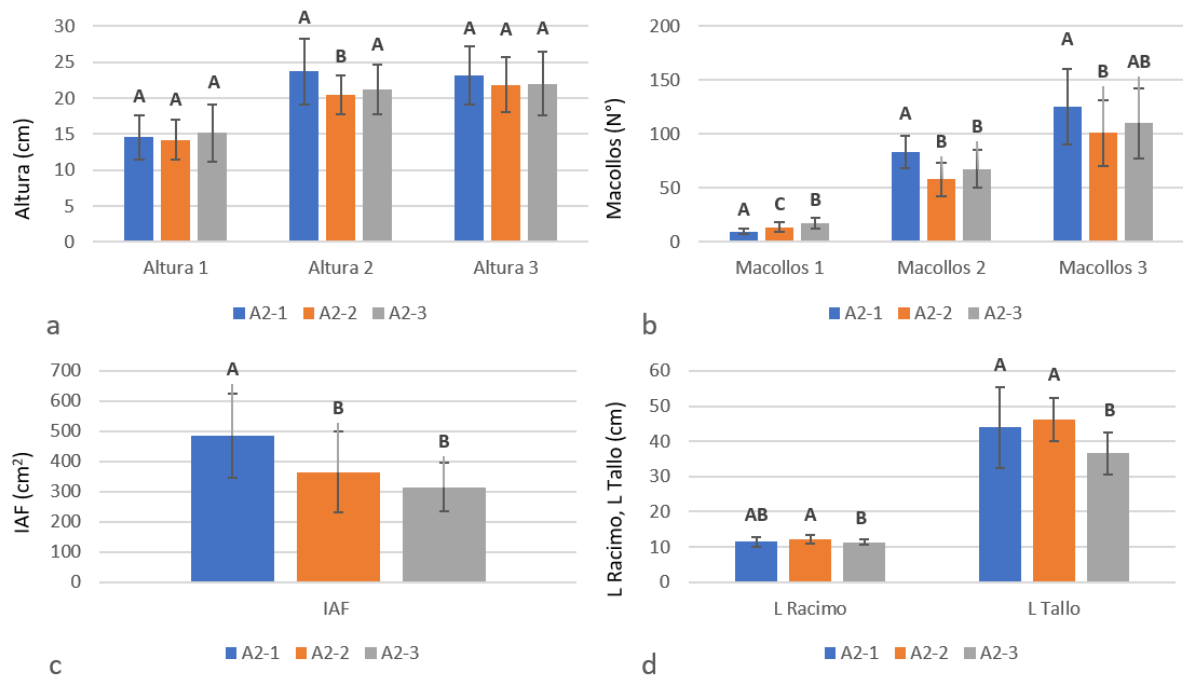


Figura 4.4. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, evaluados en tres etapas de crecimiento, entre las poblaciones A2 de la campaña 2019-20. (a) alturas de la planta (cm), (b) número de Macollos y (c) área foliar (IAF, cm²). En cuanto a los parámetros reproductivos se determinaron en floración plena, (d) largo de racimo (L Racimo, cm) y largo de tallo (L Tallo, cm). Las barras indican la desviación estándar para cada parámetro; diferentes letras indican diferencias significativas entre las poblaciones comparadas ($p < 0,05$).

4.2 Evaluación del efecto del ambiente sobre las generaciones

A1

Dado que según lo que observamos de los análisis previos, se percibieron diferencias interanuales, se propuso comparar el desempeño entre las dos campañas de los parámetros evaluados de la generación A1 (A1-1, A1-2 y A1-3). El análisis global (sin diferenciar entre poblaciones) mostró diferencias significativas para la mayoría de los parámetros ($p < 0,05$) mostrando un efecto global de reducción de los parámetros vegetativos y reproductivos durante la segunda campaña, a excepción de la tercera medición del número de macollos y del área foliar que mostraron mayores magnitudes (Anexo, Tabla VIII.1). Con el propósito de analizar si el efecto ambiental fue homogéneo entre las tres poblaciones se compararon cada una de las poblaciones en los diferentes años (Fig. IV.5, IV.6 y VI.7).

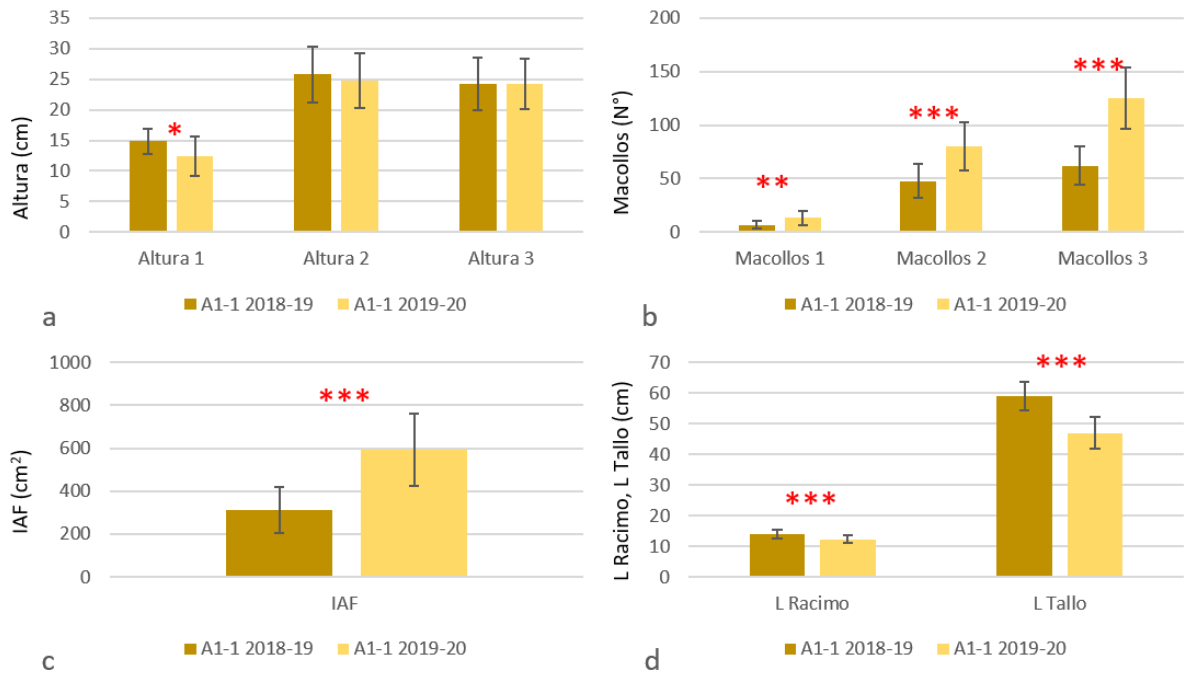


Figura 4.5. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, de la población A1-1, evaluados en tres etapas de crecimiento, entre dos campañas consecutivas 2018-19 y 2019-20. (a) alturas de la planta (cm), (b) número de Macollos y (c) área foliar (IAF, cm²). En cuanto a los parámetros reproductivos se determinaron en floración plena, (d) largo de racimo (L Racimo, cm) y largo de tallo (L Tallo, cm). Las barras indican la desviación estándar para cada parámetro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre campañas: *** p<0.001, ** 0.001<p<0.01 y * 0.01<p<0.05.

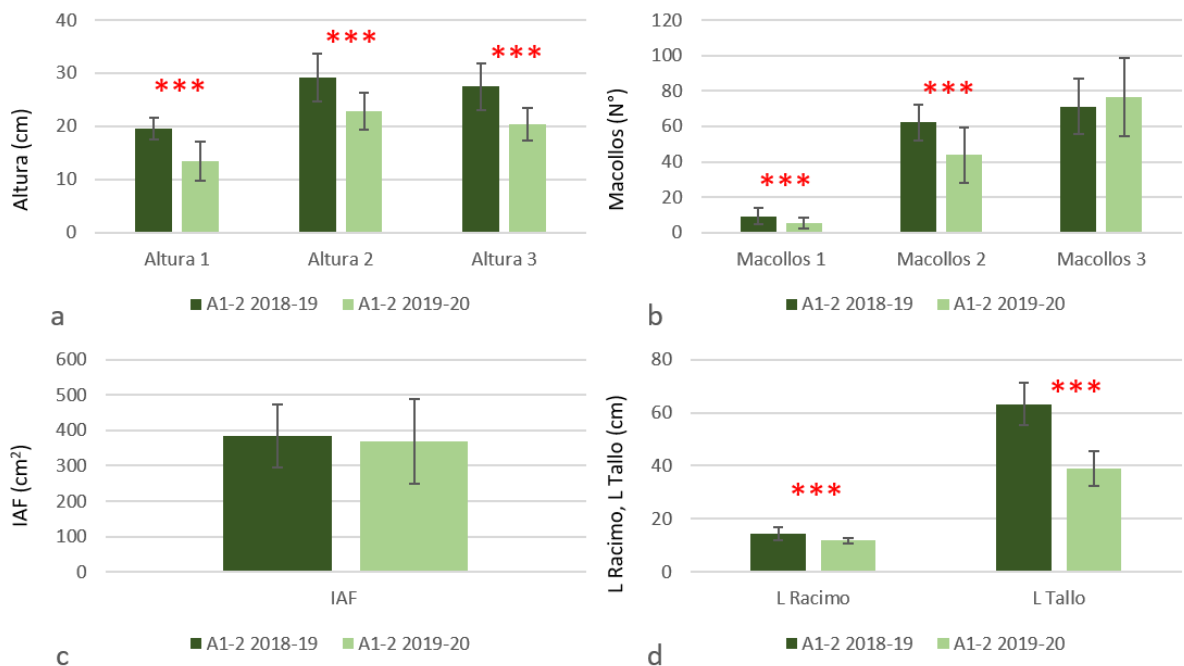


Figura 4.6. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, de la población A1-2, evaluados en tres etapas de crecimiento, entre dos campañas consecutivas 2018-19 y 2019-20. (a) alturas de la planta (cm), (b) número de Macollos y (c) área foliar (IAF, cm²). En cuanto a los parámetros reproductivos se determinaron en floración plena, (d) largo de racimo (L Racimo, cm) y largo de tallo (L Tallo, cm). Las barras indican la desviación estándar para cada parámetro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre campañas: *** p<0.001, ** 0.001<p<0.01 y * 0.01<p<0.05.

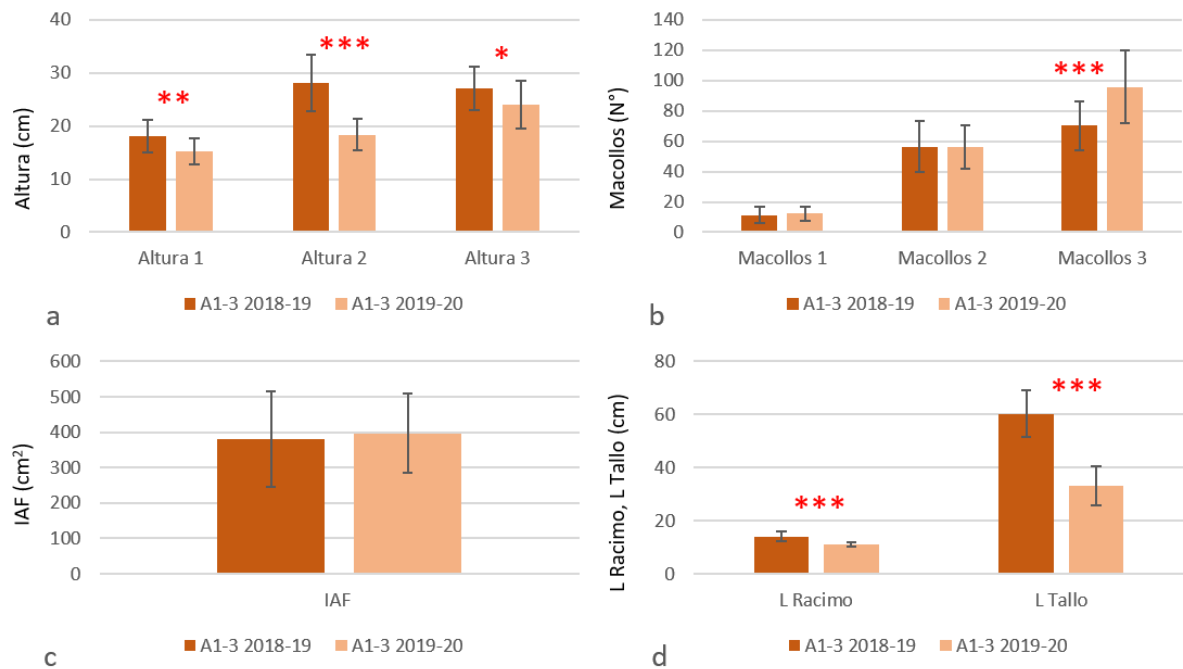


Figura 4.7. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, de la población A1-3, evaluados en tres etapas de crecimiento, entre dos campañas consecutivas 2018-19 y 2019-20. (a) alturas de la planta (cm), (b) número de Macollos y (c) área foliar (IAF, cm²). En cuanto a los parámetros reproductivos se determinaron en floración plena, (d) largo de racimo (L Racimo, cm) y largo de tallo (L Tallo, cm). Las barras indican la desviación estándar para cada parámetro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre campañas: *** $p < 0.001$, ** $0.001 < p < 0.01$ y * $0.01 < p < 0.05$.

Según los análisis realizados se observó que el efecto ambiental, en cada una de las 3 poblaciones, no fue del todo homogéneo. Si bien los parámetros florales se redujeron significativamente en todos los casos, los parámetros vegetativos fueron más variables. La población A1-1 no siempre presentó reducción, las alturas prácticamente se mantienen sin variación, pero el número de macollos y el área foliar aumentaron significativamente el segundo año (Fig. 4.5). El efecto ambiental fue más homogéneo sobre las poblaciones A1-2 y A1-3, con una tendencia a disminuir los parámetros vegetativos durante la segunda campaña, excepto en el área foliar en donde no se observaron diferencias significativas entre campañas. Respecto al número de macollos el comportamiento fue más variable entre estas dos poblaciones, A1-2 redujo el número de macollos en 2019-20, (mediciones 1 y 2) y se mantuvo en la medición 3, mientras que A1-3 solo varía en la tercera medición donde aumentó significativamente (Fig. 4.6 y 4.7 y Anexo, Tabla 8.2).

Del análisis estadístico de los parámetros climáticos de cada período por campaña relevada con respecto a igual momento de la serie histórica se determinó que solo la segunda campaña mostró una reducción significativa ($p < 0,05$) en los valores acumulados de PP (Tabla 8.7, Anexo) en relación a los históricos para igual

período. Aunque el análisis entre campañas no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) (Tabla 8.8, Anexo), las precipitaciones de la campaña 2018-19 fueron superiores respecto a la campaña 2019-20, registrándose un acumulado de 612 mm y 350 mm respectivamente, lo que representa una reducción del 57% del acumulado en la segunda campaña. En la campaña 2019-20 prácticamente todos los meses mostraron montos acumulados inferiores a la campaña anterior (Fig. 4.8), salvo el mes de abril en el que se presentaron mayores precipitaciones que en 2018-19 (80,5 mm en 2020 y 61,2 mm en 2019). Además, las precipitaciones en la primera campaña superaron los valores históricos registrados para esos meses (161,7 mm en enero, 32% más respecto al histórico y 136 mm; 13% más con respecto al histórico en marzo) (Fig. 4.8).

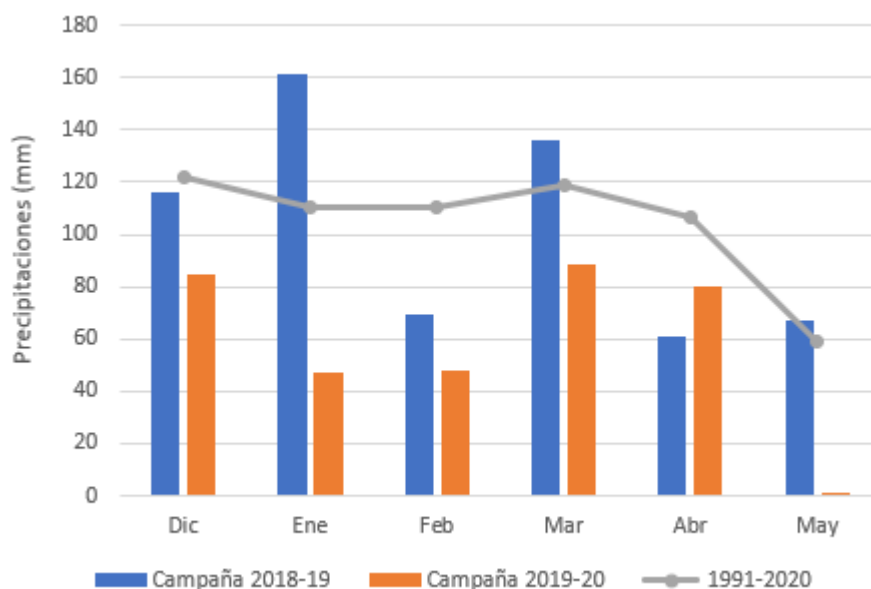


Figura 4.8. Precipitaciones mensuales acumuladas para cada campaña de estudio (barras) y promedio histórico (1991-2020) (línea).

En cuanto a las temperaturas medias, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre campañas (Tabla 8.9, Anexo), así como tampoco entre cada campaña con el promedio histórico (Tabla 8.10, Anexo). Sin embargo, en marzo, la campaña de 2019-20 mostró un aumento de la temperatura (23,5 °C) de 4,2 °C en comparación con la primera campaña (19,2 °C). Posteriormente, en los meses de abril y mayo, la campaña de 2018-19 presentó temperaturas superiores a las de la segunda campaña, coincidiendo con dos de los momentos en los que se realizaron las mediciones en la campaña 2019-20. En la figura 6.9 se muestran las temperaturas medias correspondientes a los meses de las campañas de estudio y la media histórica para el mismo período.

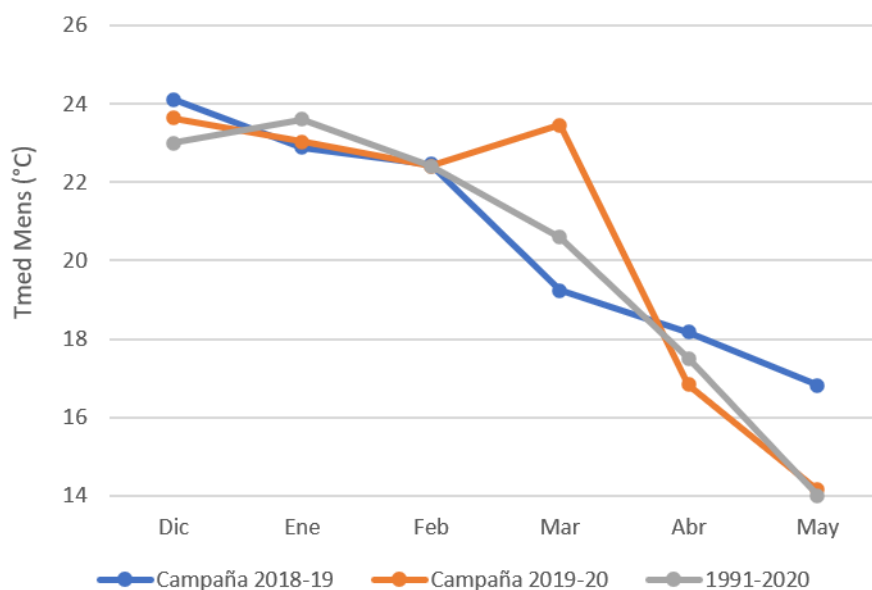


Figura 4.9. Temperatura media mensual de cada campaña (líneas azul y naranja) e histórica (1991-2020) (línea gris).

4.3 Análisis comparativo inter-generacional entre las poblaciones A1 y A2

Con el propósito de analizar si la apomixis es capaz de fijar caracteres híbridos a través de generaciones se realizaron análisis comparativos entre la primera y la segunda generación puestas a campo y evaluadas durante la misma campaña (2019-20).

La comparación global de ambas generaciones (sin discriminar por población) mostró que la mayoría de los parámetros se mantienen, las únicas variaciones significativas se observaron para el número de macollos (Anexo, Tabla 8.5). Dado que las poblaciones se mostraron diferentes entre sí se procedió a hacer el análisis comparativo para cada una de las poblaciones (Fig. 4.10, 4.11 y 4.12).

En general no se observan diferencias para la mayoría de los parámetros analizados, la población A1-1 fue la más estable, solo mostró variación significativa para la primera determinación de la altura (Fig. 4.10).

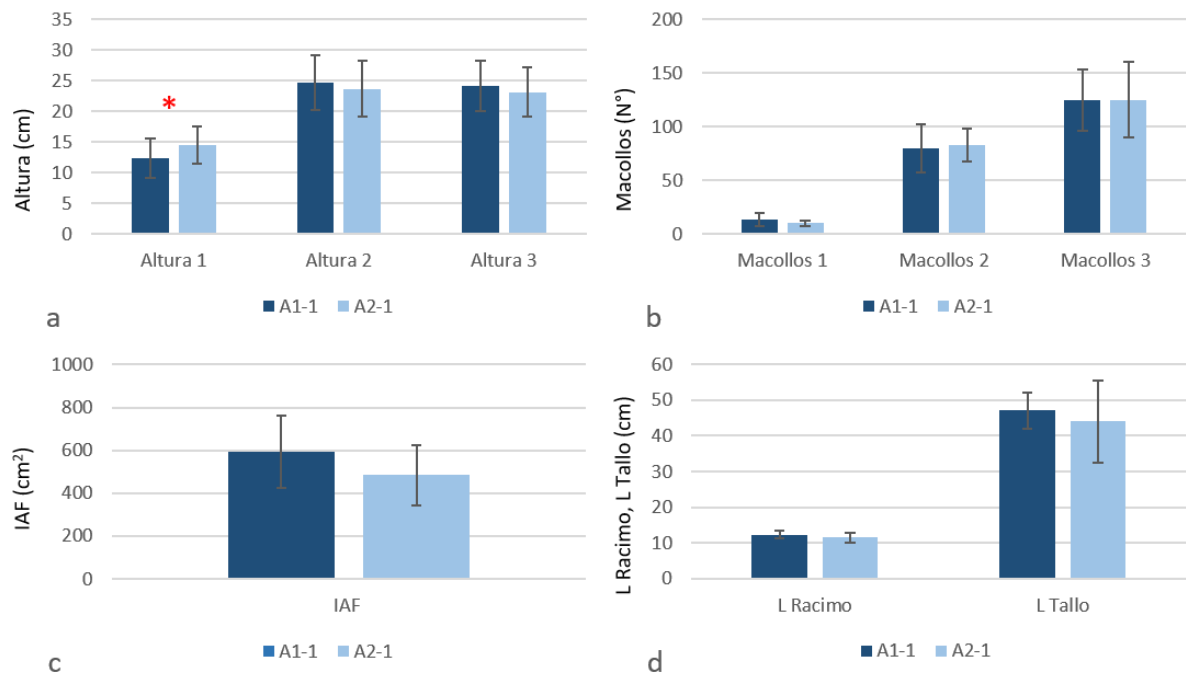


Figura 4.10. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, entre la generación A1-1 y la generación A2-1, evaluados en tres etapas de crecimiento en la campaña 2019-20. (a) Altura 1, 2 y 3 (cm). (b) Macollos 1, 2 y 3 (n°). (c) Largo de racimo (L Racimo, cm) y Largo de tallo (L Tallo, cm) evaluados en floración plena. (d) Área foliar (cm²) determinada en floración plena (IAF 2). El asterisco indica diferencias significativas entre campañas: * 0.01 < p < 0.05.

En el caso de la población A1-2 vs A2-2, la segunda determinación de la altura, el número de macollos (para las tres determinaciones) y el largo del tallo mostraron diferencias significativas (Fig. 4.11 a, b y d), mientras que la altura en las mediciones 1 y 2, el IAF y el largo de racimo fueron homogéneos (Fig. 4.11 a, c y d).

La población A1-3 presentó diferencias intergeneracionales similares, con variación en la altura (segunda medición), el número de macollos (primera y segunda medición) y el área foliar (Fig. 4.12 a, b y c), manteniendo sus parámetros reproductivos y sus vegetativos de altura y macollos en el tiempo 3 estables (Fig. 4.12 a, b y d).

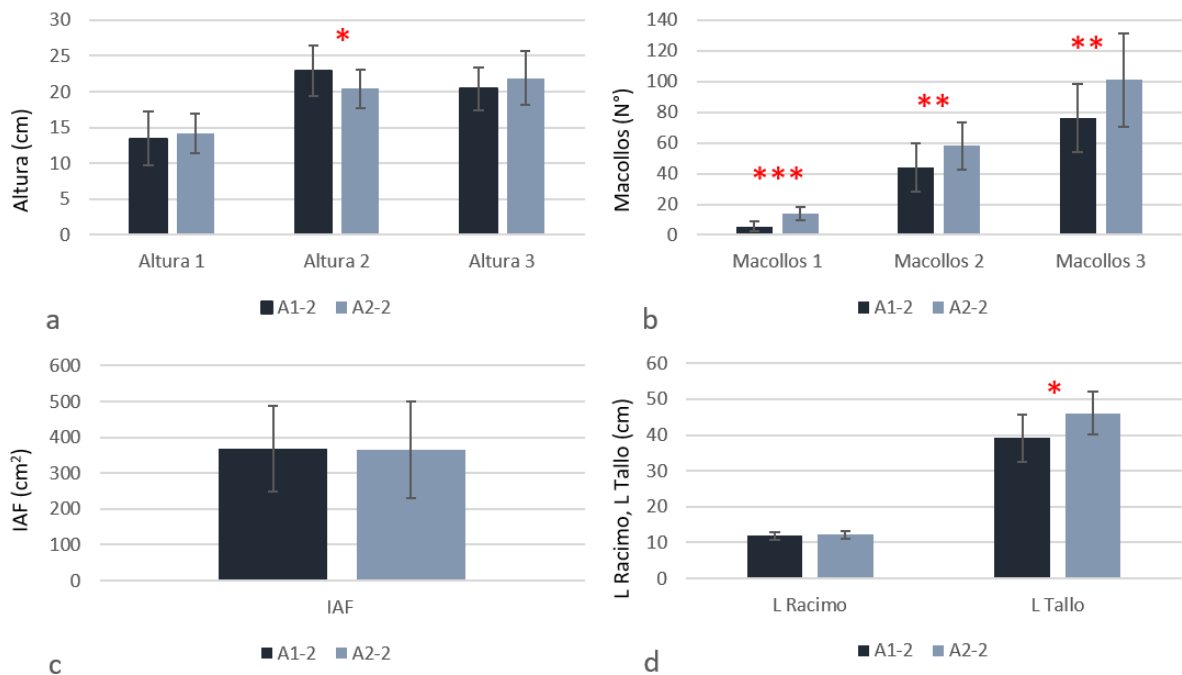


Figura 4.11. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, entre la generación A1-2 y la generación A2-2, evaluados en tres etapas de crecimiento en la campaña 2019-20. (a) Altura 1, 2 y 3 (cm). (b) Macollos 1, 2 y 3 (n°). (c) Largo de racimo (L Racimo, cm) y Largo de tallo (L Tallo, cm) evaluados en floración plena. (d) Área foliar (cm²) determinada en floración plena (IAF 2). Los asteriscos indican diferencias significativas entre campañas: *** $p < 0.001$, ** $0.001 < p < 0.01$ y * $0.01 < p < 0.05$.

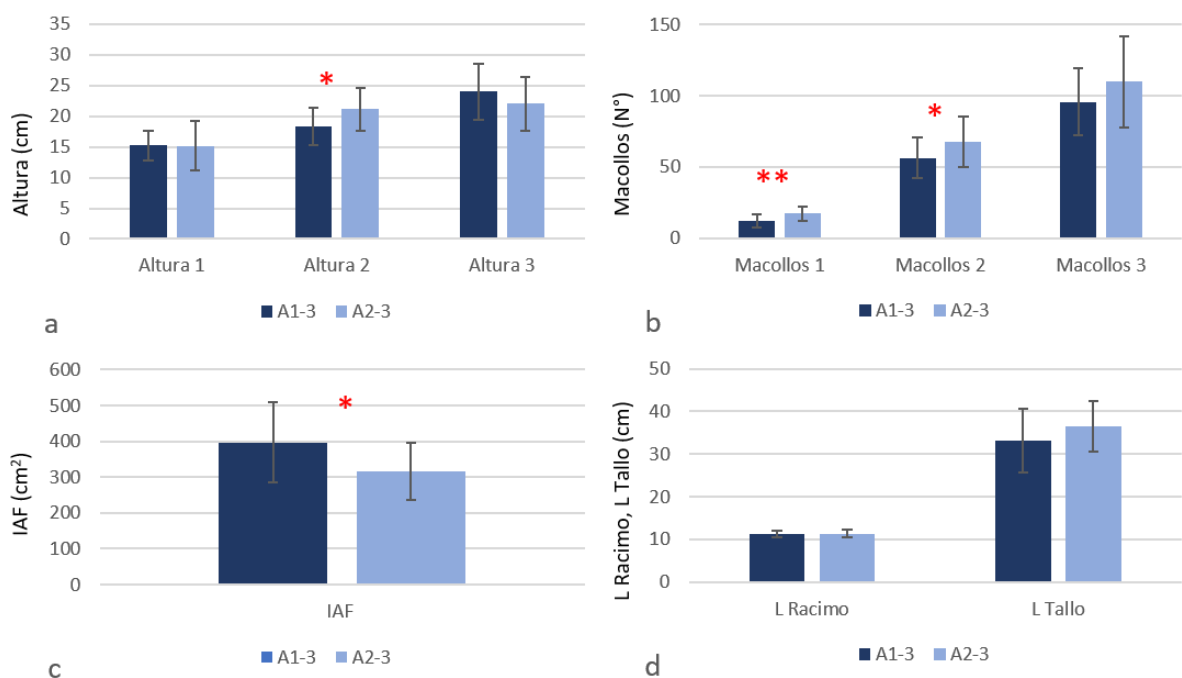


Figura 4.12. Análisis comparativos de los parámetros vegetativos y reproductivos, entre la generación A1-3 y la generación A2-3, evaluados en tres etapas de crecimiento en la campaña 2019-20. (a) Altura 1, 2 y 3 (cm). (b) Macollos 1, 2 y 3 (n°). (c) Largo de racimo (L Racimo, cm) y Largo de tallo (L Tallo, cm) evaluados en floración plena. (d) Área foliar (cm²) determinada en floración plena (IAF 2). Los asteriscos indican diferencias significativas entre campañas: ** $0.001 < p < 0.01$ y * $0.01 < p < 0.05$.

4.4 Caracterización del comportamiento reproductivo

Otro parámetro que se tuvo en cuenta para la caracterización reproductiva fue el análisis del comportamiento reproductivo mediante citoembriología. Esta técnica permite cuantificar la presencia de SEAs y SESs ya que ambos se diferencian fácilmente según se describe en la sección materiales y métodos. En la figura 4.13 se muestran ejemplos de ovarios conteniendo combinaciones diferentes de tipos de SEs.

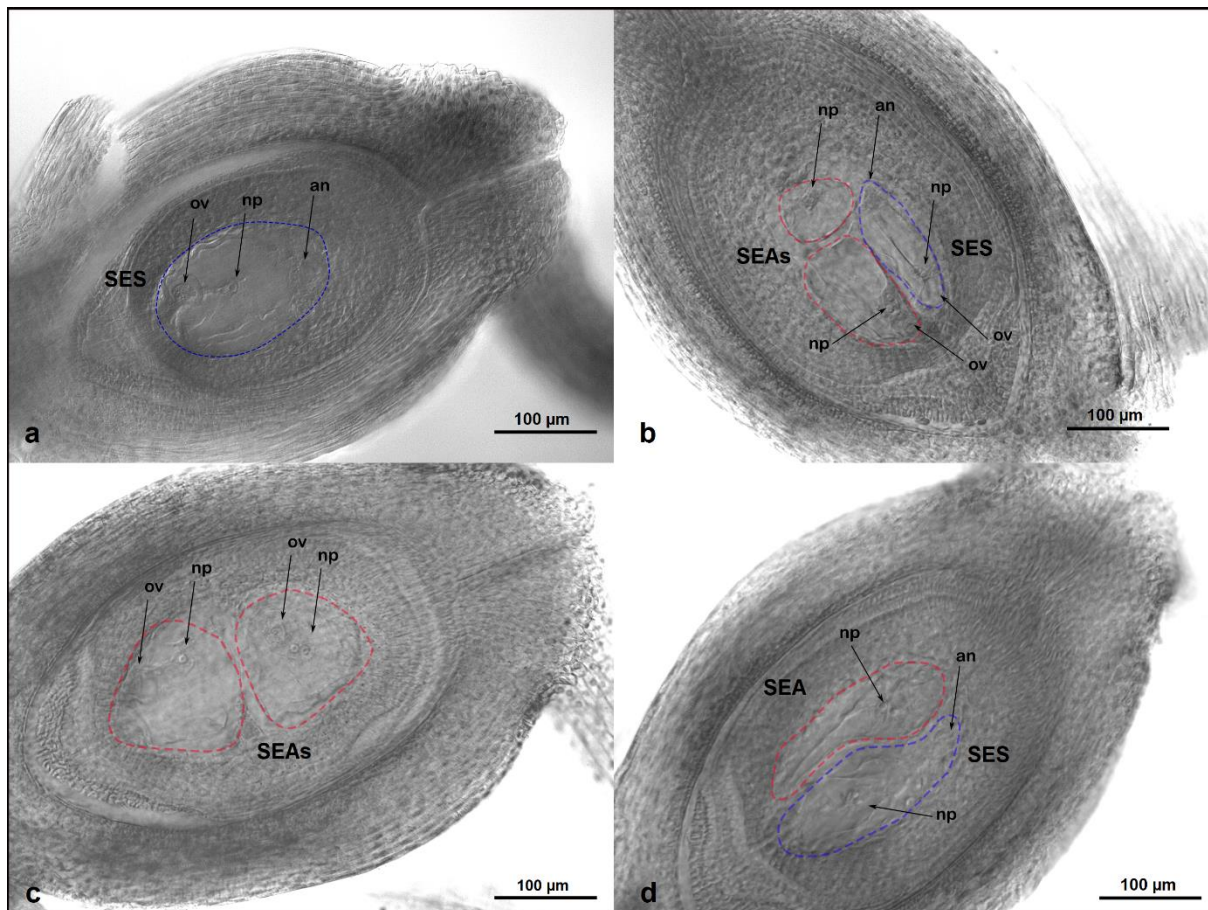


Figura 4.13. Sacos embrionarios de *Paspalum notatum*. (a) Ovario con un SES, (b) Ovario con un SES y dos SEAs (c) Ovario con dos SEAs, d) Ovario con un SES y un SEA. “np” núcleos polares, “an” células antípodas, “ov” oósfera. SES” (azul) saco embrionario sexual, “SEA/s” (rojo) saco/s embrionario/s apomítico/s.

Como se observa en la Fig. 4.13 se pudieron identificar varios tipos de ovarios según contengan solo SEA, solo SES o ambos sacos en el mismo ovario.

Se analizaron ovarios provenientes de cinco plantas de cada una de las poblaciones A1 analizadas (2018-19). En la tabla IV.1 se muestra el análisis cuantitativo de ovarios conteniendo SEA, SES, o ambos sacos (SEA+SES) así como los sacos abortados.

Tabla 4.1. Análisis cuantitativo de la producción de SEA y SES en las poblaciones A1 1, A1 2 y A1 3.

	TOTAL	N° SEA (%)	N° SES (%)	N° SEA+SES (%)	N° AB ¹ (%)	N° SEA _{tot} ² (%)	N° SES _{tot} ³ (%)
A1 1	239	136 (57)	34 (14)	45 (19)	24 (10)	181 (76)	79 (33)
A1 2	282	180 (64)	37 (13)	43 (15)	22 (8)	223 (79)	80 (28)
A1 3	267	163 (61)	28 (10)	47 (18)	29 (11)	210 (79)	75 (28)
total	788	479	99	135	75	614	234

¹AB: Ovarios abortados

²SEA_{tot}: Número de ovarios que contienen tanto SA solos como SA acompañados por SS

³SES_{tot}: Número de ovarios que contienen tanto SS solos como SS acompañados por SA

En todos los casos se confirma una predominancia de ovarios conteniendo solo SEA respecto de los que presentan únicamente SES. Por otro lado, se cuantificó el potencial de apomixis, considerado como el número de ovarios conteniendo SEA, independientemente de que estén solos o acompañados por SES, en este caso se observó una preponderancia del potencial apomíctico (76-78%) con respecto al potencial sexual (28-33%) que incluye los ovarios que presentan SES solos o acompañados de SEA (Fig. 4.14).

En la comparación del comportamiento reproductivo entre las poblaciones analizadas no se observaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros evaluados lo que refleja estabilidad de este carácter (Fig. 4.14).

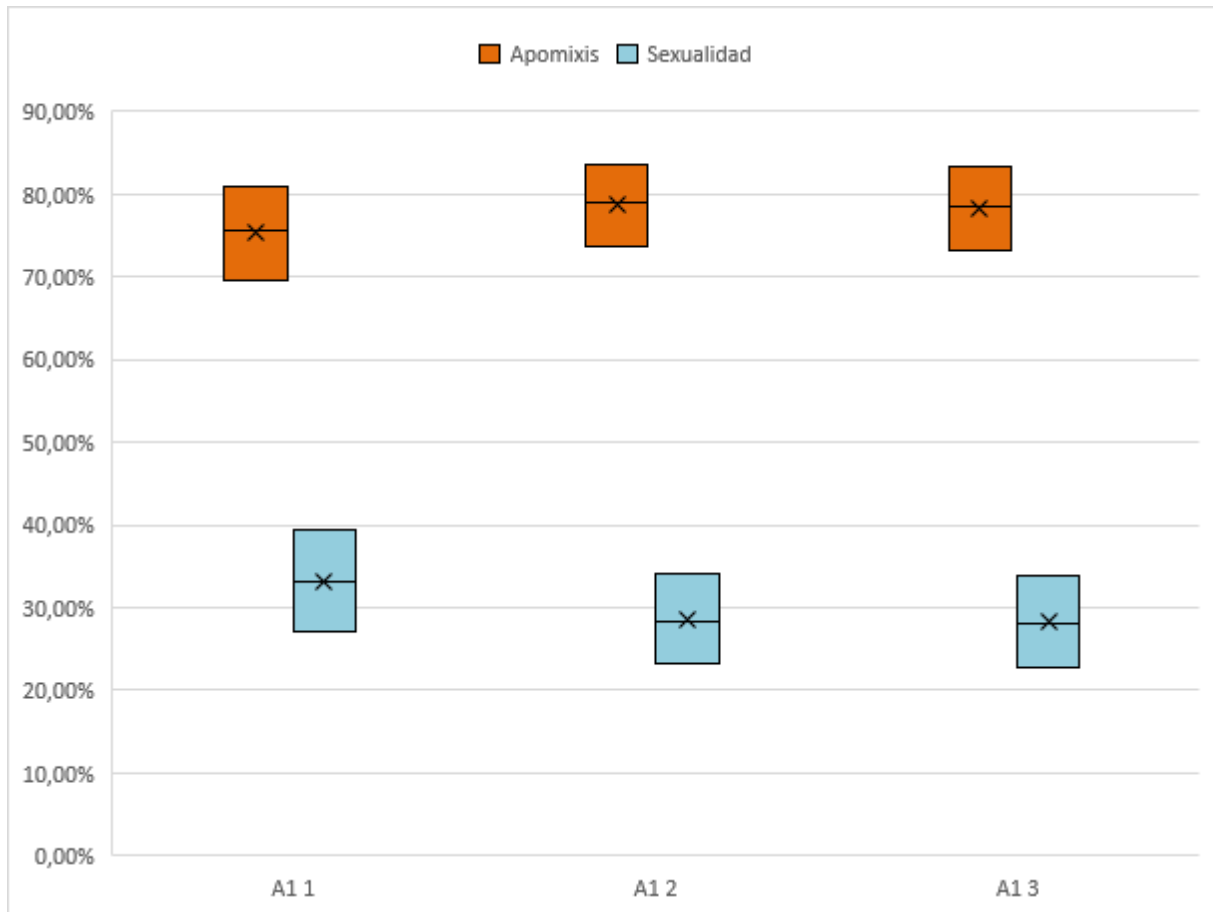


Figura 4.14. Análisis comparativos del potencial de apomixis y potencial de sexualidad entre las poblaciones A1-1, A1-2 y A1-3. Cada caja representa el potencial de sexualidad (color celeste) y el potencial de apomixis (color naranja). El tamaño de las cajas representa el intervalo de confianza (95%), la línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana y la cruz corresponde a la media.

Se realizó además la comparación entre los datos actuales y los publicados en la caracterización original de Boyero-UNNE durante su registro (Urbani et al., 2017). Los análisis comparativos detectaron una disminución del potencial de apomixis y también se observó un aumento significativo del potencial de sexualidad en las tres poblaciones A1 respecto de Boyero-UNNE (Anexo, Tabla 8.6).

5. DISCUSIÓN

Durante este trabajo de Tesina se realizaron evaluaciones a campo del cultivar híbrido Boyero-UNNE con el propósito de conocer la estabilidad fenotípica del mismo. Las diferentes comparaciones realizadas permitieron evaluar dos aspectos diferentes: 1) El efecto ambiental, obtenido en primer lugar, del análisis comparativo de los caracteres de una misma generación entre dos campañas consecutivas. Además, se realizó la comparación entre poblaciones diferentes de una misma generación, para evaluar un posible efecto ambiental sobre la planta madre, que se transmita, a través de las semillas, a las plantas hijas 2) La estabilidad fenotípica transgeneracional mediante la comparación de dos generaciones consecutivas, analizadas durante una misma campaña.

5.1 Efecto ambiental

El efecto ambiental evaluado durante este trabajo se realizó comparando las mismas generaciones durante dos años consecutivos, se consideró además el origen y las condiciones de generación de las semillas de cada población. Se realizaron mediciones durante tres etapas diferentes del crecimiento focalizadas en la caracterización del desarrollo vegetativo, del desarrollo de la flor, así como del comportamiento reproductivo.

Las variaciones en las condiciones ambientales producidas entre dos campañas diferentes (2018-19 y 2019-20) afectaron los parámetros vegetativos, en general las plantas presentaron menor crecimiento durante la segunda campaña, en comparación con la primera. Este efecto podría ser justificado según lo observado en los registros de temperaturas medias y precipitaciones, por la disminución de las precipitaciones durante la campaña 2019-20 que fueron menores respecto de las medias históricas, así como respecto de la campaña 2018-19. Estas precipitaciones son marcadamente menores a las condiciones consideradas adecuadas por Schulz et al. (2023) para *P. notatum*, donde entre los meses de diciembre a marzo se observaron 1000 mm en Corrientes, mientras en el mismo período de 2018-19 y 2019-20 en Zavalla se registraron 484 mm y 269 mm respectivamente. Asimismo, Holt y Bashaw (1963) determinaron que *P. dilatatum* mostró su mejor desarrollo en zonas con suelos bien drenados que reciben 900 o más milímetros por año de precipitaciones; situación bastante alejada de la ocurrida durante las campañas analizadas. A su vez, las variaciones observadas en el presente análisis se condicen

con lo observado por Anibalini (2021), que también detectó efectos ambientales significativos inter-campañas sobre el desarrollo vegetativo, donde la variación en la producción de biomasa aérea total (Kg MS/ha) fue explicada en un 77% por el efecto campaña.

El análisis global de las tres poblaciones evaluadas mostró una menor altura en la campaña 2019-20 con menores precipitaciones. Sin embargo, el número de macollos muestra aumentos en la última etapa, y se observó estabilidad en el área foliar. Estas variaciones en las respuestas de las diferentes variables pueden estar relacionados con lo observado durante el estudio fenológico realizado por Anibalini (2021). En este trabajo se informó una disminución significativa del número de macollos durante la campaña más húmeda y concluye que la producción de macollos está influenciada por diversos factores ya que, además de la temperatura, agua y radiación, es afectado por la cubierta vegetal, densidad de macollos, genotipo, índice de área foliar, etc. Respecto a la estabilidad del IAF los resultados no se condicen con lo que se desprende del estudio original del híbrido Boyero-UNNE que muestran una gran variación interanual del rendimiento (Urbani et al., 2017) ni con el aumento significativos de producción de biomasa e IAF observado por Anibalini (2021). Estas diferencias podrían estar relacionadas con las distintas técnicas aplicadas para la determinación de la variable, que difiere en cada caso. El método de medición del área foliar, utilizado en el presente estudio, es mediante el análisis de imágenes de una vista superior de la planta (Easy Leaf Area). Según los trabajos realizados por Ahmad et al. (2015), esta metodología tiene un buen potencial para estimar el índice de área foliar, de hojas cortadas, en cereales de invierno (trigo, cebada y centeno) en comparación con las estimaciones manuales. Sin embargo, en nuestro caso, como la medición se realizó sobre la totalidad de la planta, esta técnica no tiene en cuenta la superposición ni el ángulo de las hojas por lo cual es más representativa del área de cobertura y no es tan sensible a las variaciones en la altura de la planta.

La gran variabilidad observada frente a cambios ambientales ha sido ampliamente documentada para especies del género y otras especies relacionadas. Investigaciones previas han demostrado que factores externos, como el riego, afectan la composición fenológica del forraje y la acumulación de materia seca en especies como *P. notatum* y *P. dilatatum* (Casalás et al., 2023). Además, estudios realizados bajo condiciones de secano en Boyero-UNNE por Anibalini (2021) han revelado que la duración de los distintos sub-períodos fenológicos está definida por la temperatura,

con un efecto amplificado ante una reducción significativa de las precipitaciones (Anibalini, 2021).

Las comparaciones intra-generacionales, entre las poblaciones A1 durante la campaña 2018-19, mostraron homogeneidad entre los parámetros reproductivos, sin embargo, los parámetros vegetativos presentaron variaciones. Mientras las poblaciones A1-2 y A1-3 exhibieron mayor crecimiento que A1-1 en 2018-19, para la mayoría de los parámetros, la población A1-1 tuvo mejor desempeño en 2019-20 tanto para el número de macollos como para el área foliar (Anexo, Tabla VIII.5). Estas diferencias podrían estar relacionadas con las condiciones ambientales que experimentaron las plantas progenitoras, en las que se generaron cada una de estas poblaciones, así como la edad de las mismas. Según lo descrito la población A1-1 fue producida en condiciones cálidas y húmedas (campaña 2015-16), observándose mayores temperaturas medias y mayores precipitaciones que en las campañas 2016-17 y 2017-18, superando además a las medias históricas, (Anibalini, 2021). Durante la primera campaña, tanto las temperaturas medias como las temperaturas mínimas se encontraron dentro de valores óptimos para el crecimiento de las especies tropicales, siendo además más húmedo, con precipitaciones 18,2% por encima del promedio histórico (Anibalini, 2021). Según esos trabajos previos, en esta campaña (2015-16) el híbrido Boyero-UNNE mostró diferente desempeño respecto a las otras dos, tanto en su biomasa, en número de macollos y en masa aérea, mientras en las otras dos campañas fue similar para todos estos parámetros. Esto podría ser explicado también porque durante 2015-16 la pastura se encontraba en su año de estabilización mostrando un pico de producción dado por el máximo número de plantas establecidas (Anibalini, 2021). Por otro lado, las campañas de 2016-17 y 2017-18 (correspondientes al año de generación de las poblaciones A1-2 y A1-3) presentaron similares temperaturas medias y menores precipitaciones a las observadas en 2015-16 y a las medias históricas, siendo la campaña 2017-18 la más seca. Estas variaciones sugieren que las condiciones de producción y cosecha, así como la edad de los progenitores, podrían influir posteriormente en el desempeño de las plantas hijas. En este sentido es interesante mencionar el “efecto adaptativo materno” que altera el fenotipo y el rendimiento de la progenie, trans-generacionalmente, según el ambiente al que se expuso la planta madre (Agrawal, 1999). Estos efectos, que en principio eran considerados adversos para los estudios de herencia genética, tomaron trascendencia a finales de los '80 y fueron considerados portadores de un importante significado ecológico y evolutivo (Herman y Sultan, 2011). Whittle et al. (2009) presentaron evidencias de respuestas trans-

generacionales adaptativas al estrés por calor en *Arabidopsis thaliana*, que persistieron durante al menos dos generaciones. Los autores concluyeron que las plantas conservan una memoria epigenética adaptativa de las condiciones de temperatura de sus ancestros. Un estudio más reciente en la especie *Secale sylvestre* mostró que la descendencia de madres sometidas a estrés hídrico presentaba brotes más largos, mayor número de macollos, más del doble de biomasa y mayor producción de semillas que las madres cultivadas bajo condiciones de buen riego, evidenciando una plasticidad transgeneracional positiva en respuesta a la sequía (Mojzes et al., 2021). Estas evidencias sugieren que las diferencias encontradas entre las diferentes poblaciones de una misma generación podrían deberse a variaciones epigenéticas heredadas de la planta madre según los efectos ambientales a los que se expuso durante su crecimiento. Si bien estas consideraciones son meramente especulativas dejan abierta la puerta para profundizar el estudio de modificaciones epigenéticas inducidas por efectos de estrés.

En los análisis realizados sobre las tres poblaciones de la segunda generación, también se observaron diferencias significativas entre ellas (A2-1, A2-2 y A2-3), si bien fueron menores, muchos parámetros/estadios mostraron diferencias entre sí. Este efecto bien podría explicarse por la plasticidad fenotípica trans-generacional. Si bien los cambios producidos en las plantas progenitoras no son genéticos, sí han sido informadas modificaciones epigenéticas sobre metilación diferencial del ADN, así como de histonas, en plantas sometidas a diversos ambientes y condiciones de estrés, marcas que pueden transferirse a las generaciones subsiguientes (Herman y Sultan, 2011). Este efecto ha sido recientemente bien documentado en *Poa annua*, donde se observó que el estrés abiótico generado a partir del corte de la pastura indujo la metilación global del ADN y que estos patrones de metilación se transmitieron a la descendencia. Además, se observó una reducción del tamaño de los brotes en la descendencia de los clones podados, lo que sugiere que *Poa annua* puede transmitir señales ambientales a su prole de manera trans-generacional (Benson et al., 2020). De manera similar, en *Polygonum persicaria*, la metilación de ADN se ha correlacionado con la tolerancia al estrés por sequía inducida trans-generacionalmente, los autores concluyeron que la metilación es necesaria para la expresión de los efectos ambientales heredados en el desarrollo de la descendencia (Herman y Sultan, 2016).

En cuanto a los parámetros florales las respuestas al ambiente fueron homogéneas para todas las poblaciones ya que tanto el largo de racimo como el del

tallo disminuyeron significativamente durante la campaña 2019-20. Los valores obtenidos para el largo de racimo durante la campaña 2018-19 son comparables a los observados por Anibalini (2021), que no detectó diferencias significativas entre las campañas analizadas (2015-16, 2016-17 y 2017-18), a pesar de las diferencias climáticas.

Quizás el efecto ambiental observado en el presente trabajo tenga que ver con que las plantas se analizaron durante el primer año de implantadas. En realidad, este es un punto importante a tener en cuenta cuando se evalúan forrajeras perennes ya que los valores medios de los caracteres evaluados pueden variar según sean determinados a partir de plantaciones sucesivas o de mediciones sucesivas sobre una misma plantación (Casler, 1999). Durante la caracterización realizada para el registro del cultivar Boyero-UNNE y otros cultivares (Urbani et al., 2017) el rendimiento forrajero se evalúa durante tres campañas sucesivas sobre una misma población. De estos estudios emerge que el rendimiento forrajero es mayor el primer año de implantado el cultivar y se reduce los dos años consecutivos, poniendo en evidencia las variaciones intrínsecas a la edad de la planta que podrían influir también en la producción y calidad de las semillas.

Más aún, los análisis comparativos de los parámetros reproductivos, entre las tres poblaciones dentro de una misma campaña también mostraron variaciones, pero solo durante 2019-20, donde tanto el largo del racimo como el del tallo presentaron diferencias significativas entre las 3 poblaciones.

5.2 Caracterización del comportamiento reproductivo

Mediante análisis citoembriológicos fue posible caracterizar el comportamiento reproductivo para las 3 poblaciones A1, cuantificando la proporción de ovarios que contienen SEA, SES o SEA+SES. Las 3 poblaciones mostraron comportamientos similares sin diferencias significativas. El potencial de apomixis, considerado como el número de ovarios conteniendo tanto SEA solos o acompañados de SES, fue elevado (76%-79%) y similar para las tres poblaciones A1. Sin embargo, estos valores son significativamente menores a los obtenidos por Urbani y colaboradores (2017) para Boyero-UNNE en Corrientes. En sus estudios observaron un 86% de óvulos con SEA solos, un 7% con SEA+SES, y un 7% con SES, siendo la posibilidad de apomixis, del Boyero-UNNE original, de 93%, significativamente más alta que la encontrada en el presente estudio. Por otro lado, el porcentaje de ovarios con SES solos, evaluados en

el presente trabajo varió entre el 10% al 14%, y la posibilidad de sexualidad osciló entre 28% y 33%, siendo estos valores significativamente superiores en relación con Boyero-UNNE en Corrientes (7% al 14%).

Estos resultados reflejan que el comportamiento reproductivo es estable entre las tres poblaciones, sin embargo, está influenciada significativamente por el ambiente. Este efecto ambiental ha sido documentado en varios estudios previos, en investigaciones realizadas por Quarin (1986) en Corrientes de *Paspalum cromyorrhizon* tetraploide, un genotipo con una estrecha relación filogenética con *P. notatum* Flügge, se encontraron variaciones del comportamiento reproductivo bajo diferentes regímenes de luz. En presencia de días cortos, la incidencia de la sexualidad fue baja, mientras que aumentó considerablemente en días largos. Además, la mayor incidencia de apomixis se registró durante condiciones favorables para el crecimiento y la floración, especialmente después de las lluvias de verano y las altas temperaturas (Quarin, 1986). En genotipos de *P. rufum* diploides, Soliman et al. (2021) informaron disminuciones significativas de la expresividad de la aposporía en Zavalla respecto a Corrientes. Estos análisis concuerdan con lo observado para el cultivar Boyero-UNNE.

5.3 Variación transgeneracional

Las tres poblaciones A1 fueron utilizadas para generar las progenies A2 y las semillas de las tres poblaciones de cada generación fueron llevadas a campo y analizadas durante la misma campaña. La comparación inter-generacional global, sin diferenciar las poblaciones, muestra estabilidad en los caracteres analizados, solo varía significativamente el número de macollos. El análisis comparativo considerando cada población por separado muestra más estabilidad para la población A1, mientras las otras dos poblaciones presentan variaciones principalmente en el número de macollos. En las tres poblaciones A1, A2 y A3, la altura al final de la floración y el largo de racimo se mantuvieron más estables entre ambas generaciones. Nuestros resultados resultan comparables con estudios previos realizados en la especie apospórica *Hieracium pilosella*. En este caso se demostró que el 90% de los 20 rasgos analizados se heredaron de manera estable durante dos generaciones sucesivas cultivadas simultáneamente (Sailer, 2016). En ambos casos se cultivaron plantas de diferentes generaciones al mismo tiempo, reduciendo en gran medida el efecto de la variación ambiental sobre los caracteres en estudio. Se concluyó que los fenotipos de los híbridos de *Hieracium pilosella* pudieron fijarse a lo largo de las generaciones.

Si bien los aumentos en la posibilidad de reproducción sexual, que se observan en Zavalla, podrían justificar las variaciones fenotípicas entre las poblaciones, estos resultados deberían ser corroborados con otro tipo de análisis. Las diferencias entre la producción de SEA a nivel del ovario no implican una disminución en la proporción de semillas generadas por apomixis. Es necesario completar este estudio con análisis de citometría de flujo de semillas, así como mediante marcadores moleculares para analizar la estabilidad genética de las progenies.

Aunque no se pudo completar un análisis multifactorial, dado que muchos de los parámetros analizados no se ajustaron a la normalidad, de los análisis realizados se infiere que los parámetros presentan más variación frente a cambios ambientales que entre las diferentes generaciones. De esta manera, al igual que en el trabajo de *Hieracium pilosella* se puede concluir que, aún en un ambiente en el cual la expresión de la apomixis parece ser menor que en Corrientes, los caracteres son fijados al menos en una generación.

6. CONCLUSIONES

En función de los objetivos planteados inicialmente se arriba a las siguientes conclusiones:

- ✓ Las condiciones ambientales de las plantas progenitoras pueden provocar diferencias significativas en el desempeño de las progenies.
- ✓ Las generaciones sucesivas del híbrido apomítico Boyero-UNNE muestran estabilidad de la mayoría de los caracteres vegetativos y reproductivos analizados.

A partir de los análisis realizados en cuanto al efecto ambiental se puede concluir:

- ✓ Las variaciones ambientales interanuales producen variaciones significativas en los caracteres vegetativos y reproductivos del híbrido Boyero-UNNE.
- ✓ Las variaciones ambientales entre Corrientes y Zavalla provocan disminuciones significativas en las proporciones de SEA producidos por el híbrido Boyero-UNNE disminuyendo la probabilidad de que las semillas se produzcan por apomixis.

Finalmente, estos resultados permiten aceptar la hipótesis propuesta y confirman la estabilidad fenotípica facilitada por la apomixis y también resaltan la influencia del ambiente en la expresión de los caracteres.

Este trabajo de tesina aporta información sobre el comportamiento reproductivo del cultivar Boyero-UNNE y constituye un aporte al estudio de los caracteres vegetativos y reproductivos en *Paspalum notatum*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Acuña CA, Urbani MH, Quarín CL. 2014. Mejoramiento genético de especies de *Paspalum*: una actualización. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR, 20: 055-055.

Acuña CA, Martínez EJ, Zilli AL, Brugnoli EA, Espinoza E, Marcón F, Urbani MH, Quarín CL. 2019. Relevance for Germplasm Collection and Conservation, Breeding Techniques, and Adoption of Released Cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1377. doi:10.3389/fpls.2019.01377.

Agrawal AA, Laforsch C, Tollrian R. 1999. Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*, 401(6748): 60-63. doi: <https://doi.org/10.1038/43425>.

Ahmad S, Ali H, Rehman A, Khan RJZ, Ahmad W, Fatima Z, Abbas G, Irfan M, Ali H, Khan MA, Hasanuzzaman M. 2015. Measuring leaf area of winter cereals by different techniques: A comparison. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 13(2):117–125.

Albertini E, Barcaccia G, Carman J, Pupilli F. 2019. Did apomixis evolve from sex or was it the other way around?. *Journal of experimental botany*, 70(11): 2951-2964. doi:10.1093/jxb/erz109.

Anibalini V, Galleano A, Siena L, Ortiz JPA, Martín B. 2015. *Paspalum notatum* Flüggé: una alternativa forrajera para mejorar los bajos inundables en el sur de la provincia de Santa Fe. *Agromensajes*, 42: 25–30.

Anibalini V, Maturo H, Palou D, Oakley LJ, Prado DE. 2016. Especies Nativas del Género *Paspalum* en la provincia de Santa Fe (Argentina). XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Santa Fe. p. 25-30.

Anibalini V, Martín B, Ortiz JPA. 2017. Germination percentages of common bahiagrass (*Paspalum notatum*) seeds at different maturation stages. 9th International Herbage Seed Group Conference. Buenos Aires. p. 112.

Anibalini V. 2021. Evaluación bioclimática del pasto horqueta (*Paspalum notatum* Fl. cv Boyero) bajo condiciones de secano en el sur de la provincia de Santa Fe

(Argentina). Tesis de Magister en manejo y conservación de recursos naturales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina. <http://hdl.handle.net/2133/25614>.

Anibalini V, Dickie MJ, Gastaud J, Coronel A. 2022. Variabilidad climática de la precipitación, temperatura y de sus eventos extremos en el sur de Santa Fe. Revista Argentina de Agrometeorología RADA, 13: 23–29.

Asker SE, Jerling L. 1992. Apomixis in plants. Florida, USA. Boca Raton. p. 285. ,

Bashaw EC, Hanna W. 1990. Apomictic reproduction. En Chapman GP (Ed.) Reproductive versatility in the grasses. Cambridge University Press. p. 100-130.

Benson CW, Mao Q, Huff DR. 2020. Global DNA methylation predicts epigenetic reprogramming and transgenerational plasticity in *Poa annua* L. Crop Science, 61(5): 3011-3022. doi:10.1002/csc2.20337.

Bicknell R, Koltunow A. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. The Plant Cell, 16(1): 228-245. doi:10.1105/tpc.017921.

Brink RA, Cooper DC. 1940. Double Fertilization and Development of the Seed in Angiosperms. Botanical Gazette, 102(1): 1-25. doi: <https://doi.org/10.1086/334932>

Brugnoli EA, Martínez EJ, Ferrari Usandizaga SC, Zilli AL, Urbani MH, Acuña CA. 2019. Breeding tetraploid *Paspalum simplex*: hybridization, early identification of apomicts, and impact of apomixis on hybrid performance. Crop Science, 59(4): 1617-1624. doi:10.2135/cropsci2018.12.0771.

Burton GW. 1955. Breeding Pensacola Bahiagrass, *Paspalum notatum*: I. Method of Reproduction. Agronomy Journal, 47: 311–314. doi:10.2134/agronj1955.00021962004700070008x.

Burton GWM, Forbes I. 1960. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge). Proceedings of the 8th International Grassland Congress. Inglaterra. p. 66–71.

- Busso A, Ausilio A. 1989. Publicación Técnica N°5 Mapa de Suelos del Campo Experimental "José F. Villarino" Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.
- Calzada, JPV, Crane CF, Stelly DM. 1996. Apomixis--the asexual revolution. *Science*, 274(5291): 1322-1323. doi: 10.1126/science.274.5291.1322.
- Carman JG. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(1): 51-94. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1997.tb01778.x>.
- Casalás F, Speranza P, Cadenazzi M, Zanoniani R, Giménez L, Boggiano P. 2023. Effect of irrigation on biomass production and components of dallis grass (*Paspalum dilatatum*) and Bahia grass (*P. notatum*) in Uruguay. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 11(1): 22-30. doi:10.17138/tgft(11)22-30.
- Casler MD. 1999. Repeated measures vs. repeated plantings in perennial forage grass trials: an empirical analysis of precision and accuracy. *Euphytica*, 105: 33-42. doi:10.1023/A:1003476313826.
- Chase A. 1929. The North American species of *Paspalum*. Washington, EE.UU. US Government Printing Office. p. 310.
- Colono CM. 2020. Estudio de la función del gen PN_TGS1 en el desarrollo reproductivo vegetal. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina. <http://hdl.handle.net/2133/18989>.
- Coronel A, Costanzo M, Sacchi O. 2012. Variabilidad climática de los componentes del balance hídrico seriado en el sur de Santa Fe. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR*, (19): 7-11.
- Delgado L, Galdeano F, Sartor ME, Quarín CL, Espinoza F, Ortiz JPA. 2014. Analysis of variation for apomictic reproduction in diploid *Paspalum rufum*. *Annals of Botany*, 113(7): 1211-1218. doi:10.1093/aob/mcu056.
- Delgado L, Sartor ME, Espinoza F, Soliman M, Galdeano F, Ortiz JPA. 2016. Hybridity and autopolyploidy increase the expressivity of apospory in diploid *Paspalum rufum*.

Plant Systematics and Evolution, 302: 1471-1481. doi:10.1007/s00606-016-1345-z.
Drews GN, Koltunow AMG. 2011. The Female Gametophyte. The Arabidopsis book, American Society of Plant Biologists, 9: e0155. doi:10.1199/tab.0155.

Easlon HM, Bloom AJ. 2014. Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. Applications in plant sciences, 2(7): 1400033. doi:10.3732/apps.1400033.

Espinoza F, Urbani MH, Martínez EJ, Quarin CL. 2001. The breeding system of three *Paspalum* species with forage potential. Tropical Grasslands, 35(4): 211–217.

Gates RN, Mislevy P, Martin FG. 2001. Herbage accumulation of three bahiagrasses during the cool season. Agronomy Journal, 93: 112-117. doi:10.2134/agronj2001.931112x.

Gates RN, Quarin CL, Pedreira CGS. 2004. Bahiagrass. Warm-season (C4) grasses, 45: 651-680. doi: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr45.c19>

Hand ML, Koltunow AMG. 2014. The Genetic Control of Apomixis: Asexual Seed Formation. Genetics, 197(2): 441-450. doi:10.1534/genetics.114.163105.

Herman JJ, Sultan SE. 2011. Adaptive transgenerational plasticity in plants: case studies, mechanisms and implications for natural populations. Frontiers in plant science, 2: 102. doi:10.3389/fpls.2011.00102.

Herman JJ, Sultan SE. 2016. DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 283(1838): 20160988. doi:10.1098/rspb.2016.0988.

Holt EC, Bashaw EC. 1963. Factors affecting seed production of dallisgrass. Texas Agricultural Experiment Station, 1-8.

Koltunow AM. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilisation in ovules. The plant cell, 5(10): 1425-1437. doi:10.1105/tpc.5.10.1425.

Koltunow AM, Grossniklaus U. 2003. Apomixis: A Developmental Perspective. Annual review of plant biology, 54(1): 547-574. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.110901.160842>

Kumar S, Saxena S, Gupta MG. 2017. Marker-assisted screening of breeding populations of an apomictic grass *Cenchrus ciliaris* L. segregating for the mode of reproduction. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 17: 10-17. doi:10.1590/1984-70332017v17n1a2.

Martínez, EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA. 2001. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. Hereditas 135(1): 19–25. doi:10.1111/j.16015223.2001.00019.x

Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000. An efficient screen for the reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. The Plant Journal 21(1): 97-108. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x

Miles JW. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. Crop Science, 47: 238–249. doi: 10.2135/cropsci2007.04.0016IPBS

Mojzes A, Kalapos T, Kroel-Dulay G. 2021. Drought in maternal environment boosts offspring performance in a subordinate annual grass. Environmental and Experimental Botany, 187, 104472. doi:10.1016/j.envexpbot.2021.104472.

Nogler GA. 1984. Gametophytic Apomixis. En Johri BM (Eds.), Embryology of Angiosperms Berlin. Springer-Verlag. p. 475–518.

Ortiz, JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD, Quarín CL. 1997. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. Theoretical and applied genetics, 95: 850-856. doi:10.1007/s001220050635.

Ortiz JPA, Pessino SC, Bhat V, Hayward MD, Quarín CL. 2001. A Genetic Linkage Map of Diploid *Paspalum notatum*. Crop Science, 41(3): 823-830. doi:10.2135/cropsci2001.413823x.

Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany*, 112(5): 767-787. doi:10.1093/aob/mct152.

Pessino SO, Ortiz JP. 2010. Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. En Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L (Ed.). *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina. INTA. p. 403-420.

Quarin CL. 1986. Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromyorrhizon*. *Euphytica*, 35: 515–522. doi:10.1007/BF00021860.

Quarin CL, Burson BL. 1991. Cytology of Sexual and Apomictic *Paspalum* Species. *Cytologia*, 56(2): 223-228. doi: <https://doi.org/10.1508/cytologia.56.223>.

Quarin CL. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter*, 5: 8–15.

Quarin CL, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC, Bovo OA. 2001. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*, 13: 243-249. doi: <https://doi.org/10.1007/s004970100070>

Quero Carrillo QR, Enríquez Quiroz JF, Morales Nieto CR, Jiménez LM. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales: revisión. *Revista mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(1): 25-42.

Rebozzio RN, Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F. 2011. Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. *Biologia Plantarum*, 55: 391-395. doi:10.1007/s10535-011-0062-2.

Sailer C, Schmid B, Grossniklaus U. 2016. Apomixis Allows the Transgenerational Fixation of Phenotypes in hybrid plants. *Current Biology*, 26(3): 331–337. doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.045.

Schmidt A, Schmid MW, Grossniklaus U. 2015. Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development*, 142(2): 229-241. doi:10.1242/dev.102103.

Schulz RR, Zilli AL, Brugnoli EA, Marcón F, Acuña AA. 2023. Structural and Morphogenetic Characteristics in *Paspalum notatum*: Responses to Nitrogen Fertilization, Season, and Genotype. *Plants*, 12(14): 2633. doi:10.3390/plants12142633.

Silvertown J. 2008. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International journal of plant sciences*, 169(1): 157-168. doi: 10.1086/523357.

Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA. 2004. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 186–191. doi: 10.1007/s00122-004-1614-z.

Savidan Y. 2000. Apomixis: genetics and breeding. En Janick J (Ed.) *Plant breeding reviews*. Dordrecht, Kluwer Academic Publ. p. 13-86. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470650158.ch2>

Soliman M, Bocchini M, Stein J, Ortiz JPA, Albertini E, Delgado L. 2021. Environmental and Genetic Factors Affecting Apospory Expressivity in Diploid *Paspalum rufum*. *Plants*, 10(10): 2100. doi.org/10.3390/plants10102100.

Upton GJG. 1992. Fisher's exact test. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (Statistics in Society)*, 155(3) 395-402. doi: <https://doi.org/10.2307/2982890>.

Urbani MH, Acuña CA, Doval DW, Sartor ME, Galdeano F, Blount AR, Quarín CL. 2017. Registration of 'Boyero UNNE' bahiagrass. *Journal of Plant Registrations*, 11(1): 26-32. doi: 10.3198/jpr2016.04.0021crc.

Valls JFM, Iob Boldrini I, Longhi-Wagner HM, Miotto STS. 2009. Patrimônio Florístico dos Campos: potencialidades de uso e a conservação de seus recursos genéticos: En: Pillar VD, Muller SC, de Souza Castilhos ZM, Ávila Jacques AV (Eds.). *Campos*

Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília. Ministério do Meio Ambiente. p. 139-154.

Warmke HE. 1954. Apomixis in *Panicum maximum*. American Journal of Botany, 5-11. <http://www.jstor.org/stable/2438575>.

Whittle CA, Otto SP, Johnston MO, Krochko JE. 2009. Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. Botany, 87(6): 650–657. doi:10.1139/B09-030.

Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC. 1979. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. Canadian Journal of Botany, 57(15): 1668–1672. doi: 10.1139/b79-204.

Zilli AL, Acuña AC, Schulz RR, Brugnoli EA, Guidalevich V, Quarín CL, Martínez EJ. 2018. Widening the Gene Pool of Sexual Tetraploid Bahiagrass: Generation and Reproductive Characterization of a Sexual Synthetic Tetraploid Population. Crop Science, 58(2): 762–772. doi:10.1111/aab.12507.

Zuloaga FO, Morrone O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del sur austral (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). San Isidro. Instituto de Botánica Darwinion. p. 302.

8. ANEXO

Tabla 8.1. Comparación interanual de los parámetros vegetativos y reproductivos entre las poblaciones A1 agrupadas (2018-19 y 2019-20).

Valores medios	A1-2018-19	A1-2019-20
Altura 1 (cm)	17,49 ± 3,4	13,97 ± 3,26 ***
Altura 2 (cm)	27,26 ± 4,91	21,72 ± 4,47 ***
Altura 3 (cm)	26,23 ± 4,45	22,73 ± 4,25 ***
Macollos 1 (N°)	9,15 ± 4,79	10,39 ± 5,76
Macollos 2 (N°)	55,43 ± 15,59	58,25 ± 22,3
Macollos 3 (N°)	67,7 ± 16,89	96,65 ± 31,03 ***
IAF (cm ²)	358,59 ± 115,38	440,58 ± 161,19 **
L Racimo (cm)	14,13 ± 1,92	11,76 ± 1,09 ***
L Tallo (cm)	60,8 ± 7,42	39,31 ± 8,44 ***

Diferentes colores indican diferencias significativas de manera que las celdas con mayor intensidad de grises implican mayores valores absolutos; ** 0.001 < p < 0.01 y *** p < 0.001.

Tabla 8.2. Comparación interanual de los parámetros vegetativos y reproductivos de las poblaciones A1 entre las campañas 2018-19 y 2019-20.

Valores medios	A1-1 2018-19	A1-1 2019-20	A12 2018-19	A12 2019-20	A13 2018-19	A13 2019-20
Altura 1 (cm)	14,83 ± 2,11	12,4 ± 3,18 *	19,6 ± 2,06	13,45 ± 3,73 ***	18,05 ± 3,07	15,22 ± 2,45 **
Altura 2 (cm)	25,78 ± 4,54	24,73 ± 4,48	29,18 ± 4,46	22,85 ± 3,51 ***	28,05 ± 5,3	18,33 ± 2,99 ***
Altura 3 (cm)	24,2 ± 4,35	24,23 ± 4,14	27,45 ± 4,43	20,4 ± 3,01 ***	27,05 ± 4,05	24,03 ± 4,56 *
Macollos 1 (N°)	6,75 ± 3,75	13,4 ± 6,42 **	9,35 ± 4,39	5,5 ± 3,19 ***	11,35 ± 5,16	12,33 ± 4,54
Macollos 2 (N°)	47,75 ± 15,8	80 ± 22,35 ***	62,15 ± 10,26	43,8 ± 15,68 ***	56,4 ± 17,01	56,4 ± 14,25
Macollos 3 (N°)	61,8 ± 17,83	125,21 ± 28,49 ***	71,15 ± 15,74	76,47 ± 22,15	70,15 ± 16,27	95,72 ± 23,73 ***
IAF (cm ²)	310,84 ± 107,98	593,6 ± 169,43 ***	383,29 ± 89,39	369,19 ± 119,68	380,33 ± 135,9	397,21 ± 111,99
L Racimo (cm)	13,97 ± 1,46	12,3 ± 1,13 ***	14,41 ± 2,42	11,81 ± 1,09 ***	14,02 ± 1,82	11,2 ± 0,85 ***
L Tallo (cm)	59,08 ± 4,6	47,01 ± 5,09 ***	63,1 ± 7,98	39,14 ± 6,52 ***	60,23 ± 8,78	33,08 ± 7,44 ***

Diferentes colores indican diferencias significativas de manera que las celdas con mayor intensidad de grises implican mayores valores absolutos; * 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01 y *** p<0.001.

Tabla 8.3. Comparación intra-poblacional en la misma campaña.

Valores medios	A1-1 2018-19	A1-2 2018-19	A1-3 2018-19	A1-1 2019-20	A1-2 2019-20	A1-3 2019-20	A2-1 2019-20	A2-2 2019-20	A2-3 2019-20
Altura 1 (cm)	14,83 ± 2,11	19,6 ± 2,06	18,05 ± 3,07 *	12,4 ± 3,18	13,45 ± 3,73	15,22 ± 2,45 *	14,55 ± 3,02	14,22 ± 2,75	15,17 ± 3,96
Altura 2 (cm)	25,78 ± 4,54	29,18 ± 4,46	28,05 ± 5,3 *	24,73 ± 4,48	22,85 ± 3,51	18,33 ± 2,99 ***	23,7 ± 4,53	20,4 ± 2,69	21,15 ± 3,47 **
Altura 3 (cm)	24,2 ± 4,35	27,45 ± 4,43	27,05 ± 4,05 *	24,23 ± 4,14	20,4 ± 3,01	24,03 ± 4,56 **	23,13 ± 4,01	21,87 ± 3,77	22 ± 4,38
Macollos 1 (N°)	6,75 ± 3,75	9,35 ± 4,39	11,35 ± 5,16 *	13,4 ± 6,42	5,5 ± 3,19	12,33 ± 4,54 ***	9,95 ± 2,54	13,91 ± 4,63	17,25 ± 5,17 **
Macollos 2 (N°)	47,75 ± 15,8	62,15 ± 10,26	56,4 ± 17,01 *	80 ± 22,35	43,8 ± 15,68	56,4 ± 14,25 ***	83,3 ± 15,3	58 ± 15,61	67,85 ± 17,67 ***
Macollos 3 (N°)	61,8 ± 17,83	71,15 ± 15,74	70,15 ± 16,27	125,21 ± 28,49	76,47 ± 22,15	95,72 ± 23,73 ***	125,35 ± 35,39	101 ± 30,31 *	109,9 ± 32,09
IAF (cm ²)	310,84 ± 107,98	383,29 ± 89,39	380,33 ± 135,9 **	593,6 ± 169,43	369,19 ± 119,68	397,21 ± 111,99 ***	484,97 ± 140,31	365,04 ± 134,46	315,43 ± 79,75 **
L Racimo (cm)	13,97 ± 1,46	14,41 ± 2,42	14,02 ± 1,82	12,3 ± 1,13	11,81 ± 1,09	11,2 ± 0,85 *	11,52 ± 1,36	12,12 ± 1,13	11,35 ± 0,86 *
L Tallo (cm)	59,08 ± 4,6	63,1 ± 7,98	60,23 ± 8,78	47,01 ± 5,09	39,14 ± 6,52	33,08 ± 7,44 ***	43,98 ± 11,53	46,13 ± 6,11	36,6 ± 5,94 **

Diferentes colores indican diferencias significativas de manera que las celdas con mayor intensidad de grises implican mayores valores absolutos; * 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01 y *** p<0.001. Celdas y números resaltados en diferentes tonos de grises indican valores intermedios.

Tabla 8.4. Análisis intergeneracional entre las generaciones A1vs A2 agrupadas durante la campaña 2019-20.

Valores medios	A1	A2
Altura 1 (cm)	13,97 ± 3,26	14,65 ± 3,27
Altura 2 (cm)	21,72 ± 4,47	21,75 ± 3,85
Altura 3 (cm)	22,73 ± 2,25	22,33 ± 4,03
Macollos 1 (N°)	10,39 ± 5,76	13,81 ± 5,19 ***
Macollos 2 (N°)	58,25 ± 22,3	69,72 ± 19,1 **
Macollos 3 (N°)	96,65 ± 31,03	112,08 ± 33,67 *
IAF (cm ²)	440,58 ± 161,19	391 ± 140,09
L Racimo (cm)	11,76 ± 1,09	11,66 ± 1,16
L Tallo (cm)	39,31 ± 8,43	42,23 ± 9,12

Diferentes colores indican diferencias significativas de manera que las celdas con mayor intensidad de grises implican mayores valores absolutos; * 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01 y *** p<0.001.

Tabla 8.5. Análisis intergeneracional entre cada una de las poblaciones A1vs A2 durante la campaña 2019-20.

Valores medios	A1-1	A2-1	A1-2	A2-2	A1-3	A2-3
Altura 1 (cm)	12,4 ± 3,18	14,55 ± 3,02 *	13,45 ± 3,73	14,22 ± 2,75	15,22 ± 2,45	15,17 ± 3,96
Altura 2 (cm)	24,73 ± 4,48	23,7 ± 4,53	22,85 ± 3,51	20,4 ± 2,69 *	18,33 ± 2,99	21,15 ± 3,47 *
Altura 3 (cm)	24,23 ± 4,14	23,13 ± 4,01	20,39 ± 3,01	21,87 ± 3,77	24,03 ± 4,56	22 ± 4,38
Macollos 1 (N°)	13,4 ± 6,42	9,95 ± 2,54	5,5 ± 3,19	13,91 ± 4,63 ***	12,33 ± 4,54	17,25 ± 5,17 **
Macollos 2 (N°)	80 ± 22,35	83,3 ± 15,3	43,8 ± 15,68	58 ± 15,61 **	56,4 ± 14,25	67,85 ± 17,67 *
Macollos 3 (N°)	125,21 ± 28,49	125,35 ± 35,39	76,47 ± 22,15	101 ± 30,31 **	95,72 ± 23,73	109,9 ± 32,09
IAF (cm ²)	593,6 ± 169,43	484,97 ± 140,31 *	369,19 ± 119,68	365,04 ± 134,46	397,21 ± 111,99	315,43 ± 79,75 *
L Racimo (cm)	12,3 ± 1,13	11,52 ± 1,36	11,81 ± 1,09	12,12 ± 1,13	11,25 ± 0,85	11,35 ± 0,86
L Tallo (cm)	47,01 ± 5,09	43,98 ± 11,53	39,14 ± 6,52	46,13 ± 6,11 *	33,08 ± 7,44	36,6 ± 5,94

Diferentes colores indican diferencias significativas de manera que mayor intensidad de grises implican mayores valores absolutos; * 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01 y *** p<0.001.

Tabla 8.6. Comparación cuantitativa del comportamiento reproductivo de A1 con Boyero-UNNE.

	TOTAL	N° SEA (%)	N° SES (%)	N° SEA+SES (%)	N° SEA _{tot} ² (%)	N° SES _{tot} ³ (%)
A1 total	788	479 (61) ***	99 (13) ^{ns}	135 (17) ^{ns}	614 (78) **	234 (30) *
Boyero-UNNE	55	47 (86)	4 (7)	4 (7)	51 (93)	8 (15)

¹AB: Ovarios abortados

²SEA_{tot}: Número de ovarios que contienen tanto SEA solos como SEA acompañados por SES

³SES_{tot}: Número de ovarios que contienen tanto SES solos como SES acompañados por SEA

* 0.01<p<0.05, ** 0.001<p<0.01 y *** p<0.001. ^{ns} diferencias no significativas.

Tabla 8.7. Prueba de Kruskal Wallis de la PP entre cada campaña con respecto a igual período histórico.

Variable	PP	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Campaña1	PP1	6	101,97	42,13	92,95	0,03	0,8777
Campaña 2	PP2	6	58,38	33,44	64,25	5,77	0,0152
Histórico	PPhist	6	104,50	22,84	110,44		

Tabla 8.8. Prueba de Kruskal Wallis de las PP entre campañas.

Variable	PP	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Campaña1	PP1	6	101,97	42,13	92,95	2,08	0,1797
Campaña 2	PP2	6	58,38	33,44	64,25		

Tabla 8.9. Comparación de las temperaturas medias entre campaña.

Variable	Temp	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Campaña1	Temp1	6	19,97	3,08	20,60	0,52	0,5130
Campaña 2	Temp2	6	20,46	3,96	22,65		

Tabla 8.10. Comparación entre las temperaturas medias de cada campaña y el histórico en igual período.

Variable	Temp	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Campaña1	Temp1	6	19,97	3,08	20,60	0,10	0,8182
Campaña 2	Temp2	6	20,46	3,96	22,65	0,10	0,7587
Histórico	TempHist	6	20,18	3,75	21,50		