

**“Estudios genéticos de genotipos de
Lolium multiflorum creciendo en suelo
halomórfico y no halomórfico”**

Tesina del alumno

PALACIOS, NATALIA SOLEDAD

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de:

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera: Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 01 de Junio de 2015

“Estudios genéticos de genotipos de
Lolium multiflorum creciendo en suelo
halomórfico y no halomórfico”

Tesina del alumno

PALACIOS, NATALIA SOLEDAD

Aprobada por el Tribunal Evaluador de Tesina

Lic. Maciel,
María Aurora

Ing. Agr.
Pistorale,
Susana

Dra. Mandolino,
Cecilia

MSc. Acuña,
Mariela
Directora

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Pergamino, 01 de Junio de 2015

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana, por ser el sostén de cada día y por no dejarme desanimar en ningún momento. Sé que sin su apoyo no podría haber llegado a esto.

A Maximiliano, por brindarme su amor y acompañarme desde el principio.

A mis amigas y compañeras de estudio, Guille, Eli, Sole, Mely, Ceci, Maga y Naty, por tanto años de compañía, charlas, trabajos, estudio y mates de por medio. Ustedes hicieron el camino más ameno.

A Mariela, por la paciencia, confianza y dedicación, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección.

A Adriana y Susana, por integrarme a sus grupos de trabajo y ayudarme en cada momento.

Al personal de la Sección Forrajeras de la EEA INTA Pergamino, por su colaboración en cada trabajo, especialmente a Lola, Ivana, Agustina, Catalina, Ada, Nelson, Javier, Baroni.

Al personal y becarios del Laboratorio de Biotecnología de EEA INTA Pergamino, por su colaboración y paciencia, especialmente a Dani, Vivi, Ceci, Marcelo.

A la UNNOBA, por formarme académicamente y en especial a cada uno de los profesores que me dejaron una enseñanza.

A todas las personas que de una u otra forma me animaron y se interesaron por mi trabajo.

RESUMEN

Argentina es, el tercer país con mayor superficie de suelos afectados por exceso de sales o halomorfismo, asimismo la ganadería a nivel nacional fue desplazada hacia áreas con este tipo de restricciones edáficas. Para aportar una posible solución a esta problemática sería necesario generar germoplasma de diversas especies forrajeras adaptadas a estos ambientes. *Lolium multiflorum* Lam. también conocido como raigrás anual diploide, se encuentra entre las especies forrajeras más valoradas a nivel país. Es una gramínea de ciclo otoño-inverno-primaveral, nativa de ambientes mediterráneos de Europa y África. Diversos estudios demuestran la importancia de realizar caracterización y evaluación de esta especie en condiciones de exceso de sales. Igualmente en la actualidad la caracterización morfológica es complementada con herramientas biotecnológicas, tales como los marcadores moleculares, para el estudio de la variabilidad genética. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la variabilidad genética a nivel molecular de seis poblaciones que fueron crecidas en condiciones halomórficas, y dieron origen a 12 familias de medio hermanos (FMH) las que se evaluaron a campo en condiciones no halomórficas. Los resultados demostraron la existencia de una alta variabilidad genética tanto intra e inter-poblacional como entre FMH. Cabe destacar que los valores obtenidos en la estimación de heredabilidad en sentido estricto evidenció un importante componente genético heredable lo que permitió la selección de varias FMH con muy buen comportamiento productivo. Asimismo, no se observó un patrón de agrupamiento o comportamiento de las FMH en función de la procedencia poblacional de las mismas. A pesar de estos resultados, como corolario se sugiere continuar con el estudio de las FMH selectas en condiciones halomórficas, si es que estas serán introducidas al programa de mejoramiento genético de la especie para ambientes halomórficos.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Taxonomía, distribución geográfica y descripción botánica de la especie.....	1
1.2 Aspectos genéticos de la especie.....	1
1.3 Aspectos agronómicos y productivos de la especie.....	2
1.4 Variabilidad genética en especies forrajeras.....	3
1.5 Marcadores morfológicos y moleculares.....	4
1.6 Asociación con endófitos.....	5
1.7 La salinidad y su tolerancia.....	6
2. HIPÓTESIS.....	9
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Estudio de poblaciones.....	10
3.1-1 Etapa a campo.....	10
3.1-2 Caracterización molecular.....	10
3.1-2.1 Material vegetativo y extracción de ADN.....	10
3.1-2.2 Cuantificación y dilución de ADN.....	11
3.1-2.3 Amplificación del ADN.....	11
3.1-2.4 Preparado, corrida, tinción, revelado y lectura de vidrios.....	13
3.1-3 Análisis estadístico de los resultados.....	14
3.1-3.1 Cuantificación de la variabilidad genética.....	14
3.1-3.2 Análisis de la estructura genética de la población.....	15
3.1-3.3 Distancia genética de Nei.....	17
3.1-3.4 Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA).....	17
3.1-3.5 Análisis Multivariado.....	18
3.1-3.5.1 Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP).....	18
3.1-3.5.2 Análisis de Cluster.....	18
3.2. Estudio de Familias de Medio Hermanos.....	19
3.2-1 Origen.....	19
3.2-2 Acondicionamiento en invernáculo.....	19
3.2-3 Trasplante a campo experimental.....	19
3.2-4 Caracteres evaluados.....	21
3.2-4.1 Caracteres vegetativos.....	21
3.2-4.2 Caracteres reproductivos.....	22
3.2-4.3 Determinación de infección endofítica.....	23
3.2-5 Análisis de la información.....	24
3.2-6 Prueba de distribución normal y transformación de variables.....	24
3.2-7 Análisis de la Variancia.....	25
3.2-8 Estimación de componentes de variancia.....	26
3.2-9 Estimación de la heredabilidad en sentido estricto.....	26

3.2-10 Estimaciones de correlaciones fenotípicas.....	27
3.2-11 Análisis Multivariado.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 Caracterización Molecular.....	29
4.1-1.1 Extracción y cuantificación de ADN.....	29
4.1-1.2 Amplificación del ADN.....	29
4.1-1.3 Productos amplificados.....	29
4.1-2 Cuantificación de la variabilidad genética.....	31
4.1-3 Descripción de alelos.....	33
4.1-4 Distancias genéticas de Nei.....	34
4.1-5 Análisis de la variancia molecular.....	35
4.1-6 Distancias genéticas por pares (PhiPT).....	35
4.1-7 Análisis multivariados.....	35
4.1-7.1 Análisis de coordenadas principales.....	35
4.1-7.2 Análisis de clúster jerárquico.....	38
4.2 Caracterización agronómica.....	40
4.2- 1 Caracteres Vegetativos.....	40
4.2- 2 Caracteres Reproductivos.....	46
4.2- 3 Determinación de endófito en semilla.....	49
4.2- 4 Análisis de la información.....	50
4.2- 4.1 Estimación de parámetros genéticos.....	50
4.2- 4.2 Correlaciones fenotípicas.....	50
4.2- 4.3 Análisis multivariados.....	52
5. DISCUSIÓN.....	56
5.1 Caracterización molecular.....	56
5.1-1 Cuantificación de la variabilidad genética.....	56
5.1-2 Comportamiento de los SSR.....	58
5.1-3 Distancias genéticas de Nei.....	59
5.1-4 Análisis de la variancia molecular.....	59
5.1-5 Análisis multivariados.....	60
5.2.1 Caracterización agronómica.....	60
5.2.2 Cuantificación de la variabilidad genética.....	60
5.2- 1 Caracteres Vegetativos.....	61
5.2- 2 Caracteres Reproductivos.....	64
5.2- 3 Determinación de endófito en semilla.....	68
5.2- 4 Correlaciones fenotípicas.....	69
5.2- 5 Análisis multivariados.....	70
6. CONCLUSIONES.....	72
7. CONSIDERACIONES FINALES.....	73
8. ANEXOS.....	74
9. BIBLIOGRAFÍA.....	79

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Taxonomía, distribución geográfica y descripción botánica de la especie

Lolium multiflorum Lam. se encuentra entre las especies forrajeras más valoradas en Argentina, también es denominado raigrás criollo o raigrás italiano. Esta especie pertenece al género *Lolium* el cual está formado por ocho especies (Terrell, 1968): *L. perenne* L., *L. multiflorum* Lam., *L. rigidum* Gaud., *L. remotum* Schrank, *L. temulentum* L., *L. persicum* Boiss. & Hoh., *L. subulatum* Vis. y *L. canariense* Steud.; estas se distinguen entre sí principalmente por los caracteres número de espiguillas, longitud de la gluma y longevidad (Bennett, 1997). De las ocho especies que conforman el género *Lolium*, solo dos son agrónomicamente importantes (*Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*), el resto son consideradas malezas (Monteverde, 2009).

Es una gramínea de ciclo otoño-inverno-primaveral, nativa de ambientes mediterráneos de Europa y África (Parodi, 1964); es una de las gramíneas forrajeras de mayor aporte al sistema ganadero tanto en ambientes de alta productividad, como en ambientes restrictivos. Se encuentra naturalizada y ampliamente difundida en la región templado-húmeda y su demanda ha crecido durante los últimos años en el mercado nacional de forrajes (Brizuela *et al.*, 1983; Marino *et al.*, 1995; Gutiérrez y Rossi, 1997; Piñeiro *et al.*, 2001; Arzadún, 2003; Carta *et al.*, 2003).

Se caracteriza por tener un follaje de color verde intenso, brillante y suave en la cara inferior y láminas opacas y ásperas en la cara superior, con una nervadura central bien marcada (Parodi, 1964), posee un sistema radicular denso y altamente ramificado.

1.2 Aspectos genéticos de la especie

Lolium multiflorum es diploide ($2n=2x=14$) con el tipo de reproducción alógama debido a que posee un sistema de autoincompatibilidad conformado por dos *loci* multialélicos (Cornish *et al.*, 1979). Tiene un bajo porcentaje de autogamia (7%) por lo que las poblaciones naturales y sintéticas son muy variables genéticamente (Castro *et al.*, 2003). La oferta de cultivares es cada vez más

profusa, existiendo tipos alternativos (“westerwolds”) e italianos (“bianuales”) (Vernengo *et al.*, 2006).

Los cultivares tetraploides ($2n=4x=28$) se obtuvieron mediante duplicación artificial del número cromosómico (Wit, 1958) mediante tratamientos químicos (colchicina) o por vía sexual (cruzamiento interploide) el cual es un método poco efectivo (Lamote *et al.*, 2002). Estos cultivares tetraploides se caracterizan por tener mayor producción de materia seca y mayor tamaño de semillas pero menor persistencia con respecto a los materiales diploides. Estos últimos se adaptan a una mayor diversidad de suelos que los tetraploides. Gracias a esta última característica del raigrás las poblaciones diploides se naturalizaron en los pastizales de la región templada húmeda y subhúmeda de Argentina, Uruguay, Chile y sur de Brasil.

1.3 Aspectos agronómicos y productivos de la especie

En general el raigrás anual es una especie de crecimiento otoño-invierno-primaveral, con una gran concentración de su producción de forraje a la salida de invierno y primavera. Tiene su máxima tasa de crecimiento entre los 20 y 25°C, y en condiciones de humedad adecuadas (750 mm anuales). Se ha comprobado que para expresar su máximo potencial requiere de suelos fértiles, profundos, con buen nivel de materia orgánica (3-5%) y textura de franca a franco-arcillosa, con un pH cercano a la neutralidad, aunque también se adapta fácilmente a otros tipos de suelos, llegando a tolerar suelos ácidos, a levemente alcalinos (Mazzanti *et al.*, 1992; Hannaway *et al.*, 1999).

Soporta defoliaciones más intensas que otras gramíneas anuales (Hannaway *et al.*, 1999) y sembrado hacia fin del verano, puede ser sometido a pastoreos con alta carga animal y corto período de utilización en otoño-invierno (Marino *et al.*, 1995; Gutiérrez y Rossi, 1997). Se ha demostrado (Andrés y Bertín, 1999; Wilkins y Humphreys, 2003) que la especie posee mayor palatabilidad y digestibilidad del forraje producido, comparativamente con otros verdeos de invierno (avena, cebada, centeno, triticale), lo que permite introducirla en los planteos intensivos de producción de leche y de carne, donde se prioriza la calidad sobre la cantidad de forraje.

En Argentina, el raigrás anual ha ido extendiendo su horizonte de cultivo llegando en la actualidad hasta la subregión subhúmeda pampeana (Amigone y Kloster, 1997; Méndez y Davies, 2002) y sur y centro de la mesopotamia (De Battista, 1998; Altuve, 2003). Encontrando las mejores condiciones ecológicas para desarrollar su máximo potencial productivo en la subregión templado-húmeda del este de la provincia de Buenos Aires (Vernengo *et al.*, 1986; Vernengo y Gils Carbó, 1991; Mazzanti *et al.*, 1992; Vernengo *et al.*, 1995; Andrés y Bertín, 1998).

1.4 Variabilidad genética en especies forrajeras

Para llevar a cabo un plan de mejoramiento genético es necesario conocer la variación genética heredable de la población en estudio, al estimar variancia fenotípica, variancia genotípica, variancia ambiental y heredabilidad en sentido estricto, se pueden delinear las diferentes etapas del programa de mejoramiento y establecer criterios a aplicar en el proceso de mejora de una especie (Gardner, 1963; Dudley y Moll, 1969).

La mayoría de las poblaciones de pasturas, ya sean nativas o naturalizadas, contienen abundante variación genética; la cantidad de esa variación depende del tipo e intensidad de selección que las poblaciones hayan experimentado previamente (Snaydon, 1978).

En contraste con las especies agrícolas donde la selección antrópica ha operado por miles de años, las especies forrajeras han experimentado una menor presión de selección en el desarrollo de cultivares (Monteverde, 2009).

Existen numerosos estudios de la variabilidad genética realizado en germoplasma de la especie adaptado a distintos ambientes, que demuestran la factibilidad de realizar selección y desarrollar cultivares superiores (Breese y Tyler, 1986; De Battista *et al.*, 2001; Giammaría, 2003; Andrés y Rosso, 2004; Andrés *et al.*, 2005; Acuña, 2009; Monteverde, 2009; Álvarez 2010).

1.5 Marcadores morfológicos y moleculares

Hasta la década del 60, la metodología más utilizada para el estudio de la variabilidad genética era la caracterización morfológica, por ser de fácil aplicación, de bajo costo y uso directo en el mejoramiento de la especie (Ferreira y Grattapaglia; 1998). Sin embargo, en los últimos años, la caracterización morfofisiológica ha sido complementada con herramientas biotecnológicas, tales como los marcadores moleculares (Kölliker *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2004; Bolaric *et al.*, 2005; Fjellheim y Rognli, 2005; King *et al.*, 2005; Lübberrstedt, 2005).

Las principales ventajas de los marcadores moleculares radica en que son precisos en la detección de la variabilidad a nivel de ADN, están ampliamente distribuidos en el genoma, no son influenciados por el ambiente y se pueden detectar en cualquier estado del desarrollo de la planta (Schlatter *et al.*, 2002). La mayoría de los estudios en especies forrajeras han utilizado RFLP y RAPD, y se han concentrado en perfiles de ADN en lugar del mapa genético básico de desarrollo y de detección gen/QTL. El desarrollo de marcadores con alta eficiencia tales como AFLP y SSR permiten una rápida construcción de mapas y análisis de caracteres específicos debido a que proveen un alto contenido de información polimórfica en comparación con los anteriores (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Forster *et al.*, 2001).

Entre los marcadores moleculares utilizados para la caracterización se destacan los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR o Simple Sequence Repeats). Estos marcadores son secuencias cortas de DNA, de 1 a 6 nucleótidos, repetidas en tándem, de copia única, son abundantes y suelen estar ubicados en regiones no codificantes (Forster *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Están flanqueadas por regiones conservadas no repetitivas y esparcidos por todo el genoma de organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002). Las principales ventajas recaen en que poseen altos índices de heterocigosidad, son codominantes y multialélicos (Schlatter *et al.*, 2002).

Los SSR permiten diferenciar los genotipos homocigotas de los genotipos heterocigotas (Ferreira y Grattapaglia, 1998) por lo que son particularmente aptos para realizar la evaluación y comparación de la variación genética dentro y entre especies cercanas (Morgante y Olivieri, 1993; Powell *et al.*, 1996). La desventaja más importante en el uso de estos marcadores es su elevado costo de desarrollo (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Zane *et al.*, 2002; Squirrel *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2006), aunque la transferencia de SSR desde especies relacionadas filogenéticamente puede hacer frente a este problema.

En raigrás anual se realizaron diferentes estudios de evaluación de diversidad genética mediante diferentes marcadores moleculares, AFLP (Guthridge *et al.*, 2001; Calsyn *et al.*, 2003) y RAPD (Castro *et al.*, 2003; Bolaric *et al.*, 2005). Jones *et al.*, (2001) optimizaron los métodos de evaluación y aislaron un gran número de SSR en *Lolium perenne*. Por otro lado Hirata *et al.*, (2006) desarrollaron SSR para raigrás anual, al igual que otros institutos han desarrollado SSR en *Lolium* y la secuencia de estos primers son de dominio público (Inoue y Cai, 2004; Warnke *et al.*, 2004; Studer *et al.*, 2006). Se han construido también varios mapas de ligamiento genético para el género *Lolium*, pero sobre todo para *L. perenne* (Bert *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2002 a,b; Studer *et al.*, 2010, 2012; Bartos *et al.*, 2011; Tomaszewski *et al.*, 2012; King *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2014).

La utilización conjunta de marcadores morfológicos y moleculares permite obtener interesantes alternativas para los programas de mejoramiento genético (Loss, 1994a; Forster *et al.*, 2001).

1.6 Asociación con endófitos

Los endófitos son hongos del género *Neotyphodium* que están presentes en muchas gramíneas, entre ellas, el raigrás anual. Ambos conforman una asociación simbiótica (Moon *et al.*, 2000) que no causa ningún tipo de síntoma externo y se transmite únicamente a través de las semillas de la planta ya infectada (Clay y Schardl, 2002). En esta asociación el hongo obtiene nutrientes, protección y propagación, mientras que induce una serie de respuestas fisiológicas,

bioquímicas y morfológicas en la planta (Bush *et al.*, 1997). El endófito se halla localizado en tallos y semillas y posee un tipo de propagación vertical dependiente del huésped debido a que ha perdido su capacidad de producir conidios y esporas sexuales (Lane *et al.*, 2000; Ravel *et al.*, 1997). Por otra parte, la infección del raigrás anual produce sustancias químicas como lolinas y peraminas que actúan como repelente natural disminuyendo el ataque por parte de insectos y nematodos sobre el hospedante, sin afectar la salud del ganado, contrariamente a lo que sucede en festuca alta y raigrás perenne, donde las sustancias producidas por el hongo son tóxicas y enferman al ganado (Sugawara *et al.*, 2006).

Los simbioses que se transmiten exclusivamente de forma vertical, como es el caso de *Neotyphodium*, poseen alta frecuencia de transmisión (Herre *et al.*, 1999; Gundel *et al.*, 2008), lo que se ha demostrado en Argentina (Nelson y Ward, 1990; De Battista, 2002; Medvescigh *et al.*, 2004). Esto lleva a suponer que la infección endofítica le confiere al raigrás anual características de tolerancia y/o buen comportamiento agronómico ante condiciones de estrés biótico y/o abiótico (Belesky, 1989; De Battista, 2005; Collabeli *et al.*, 2008; Rosso *et al.*, 2010), dentro de este último se enmarca el estrés halomórfico. Razones por las cuales se ha propuesto la manipulación y utilización de esta simbiosis para el mejoramiento genético de la especie.

1.7 La salinidad y su tolerancia

Argentina es, el tercer país con mayor superficie de suelos afectados por halomorfismo en el mundo, después de Rusia y Australia (Lavado y Taboada, 2009). Se define como suelos halomórficos a aquellos afectados por la presencia de sales, clasificándose en suelos salinos, suelos sódicos (alcalinos) y suelos salino-sódicos (Bonfils, 1966; Imbellone *et al.*, 2010).

Argentina posee mayor superficie de suelos sódicos en relación con la superficie agrícola (Taboada y Lavado, 2009; Imbellone *et al.*, 2010). En las últimas décadas, el incremento de la superficie afectada, tanto en áreas agrícolas como ganaderas de la región húmeda y sub-húmeda, fue

principalmente como consecuencia de periodos de lluvias excesivas, causando así, anegamiento, ascenso de la napa freática o ambos procesos conjuntamente.

La región pampeana cuenta con una superficie afectada por salinidad de aproximadamente 19,4 millones de hectáreas (ha) (Gorgas y Bustos, 2008).

La pampa inundable se caracteriza por presentar una gran proporción de suelos con asociaciones halomorfo-hidromorfo en las cuales el contenido de sodio puede variar notablemente.

La salinidad edáfica afecta al proceso de germinación de semillas y al crecimiento de las plantas de dos maneras (Rowell, 1992; Munns y Tester, 2008). Por un lado, reduce la capacidad de las plantas para absorber agua (disminuye la tasa de crecimiento y provoca cambios metabólicos similares a los generados por el estrés hídrico) (Hasegawa *et al.*, 2000; Epstein, 1979; Dodd & Donovan, 1999). En segundo término, algunos iones presentes en las sales pueden generar toxicidad y/o desbalance nutricional en los tejidos vegetales (Martín *et al.*, 2012; Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2005). Esto trae aparejado respuestas fisiológicas las cuales se observan en todos los niveles de organización de las plantas. Algunas estrategias incluyen cambios anatómicos de importancia (González *et al.*, 2014), tanto para mejorar la eficiencia en el uso de agua, como para reducir el efecto tóxico de las sales.

Se prevé que para el 2050 las necesidades de alimentos aumenten en un 70%. Esto requiere mejoras en la productividad con menos tierra y agua (Fischer *et al.*, 2010). Para esto es importante el desarrollo de cultivos de mayores rendimientos en suelos con alto contenido de sales y limitada cantidad de agua (Rahnama *et al.*, 2010). Esta situación promueve interés por la utilización de tierras afectadas por halomorfismo para el uso ganadero (CIRN-INTA, 2012). Para aportar la solución a esta problemática sería necesario generar germoplasma de diversas especies forrajeras adaptadas a estos ambientes y con una elevada producción primaria. Incrementar la información del

efecto de los ambientes estresantes sobre la implantación de especies forrajeras es clave para lograr incrementos de productividad (Bazzigalupi *et al.*, 2008).

Existen numerosos estudios en germoplasma de raigrás anual que demuestran la existencia de variabilidad genética para una amplia gama de caracteres morfológicos, fisiológicos y asociados a la germinación de semillas, en condiciones de suelo sin limitantes (Edwards y Emara, 1970; Rhodes, 1973; Castro *et al.*, 2003; Alonso, 2004, Acuña 2009; Monteverde, 2009, Álvarez, 2010, Nelson y Crowder, 2010;) y en condiciones de suelo con limitantes (Marcar, 1987; Ashraf, 1990, Nelson y Foster, 2009; Nelson y Crowder, 2010) como así también ha sido demostrada la variabilidad genética por estudios utilizando marcadores moleculares (Castro *et al.*, 2003; Studer *et al.*, 2006; Peter-Schmid *et al.*, 2008a; Peter-Schmid *et al.*, 2008b; Acuña, 2009).

Asimismo son varios los estudios que plantean a nivel internacional la importancia de trabajar en la caracterización y evaluación del raigrás anual ante condiciones de exceso de sales (Ashraf, 1990, Nelson y Foster, 2009; Nelson y Crowder, 2010). Si bien es sabido que la mayor parte de las plantas resultan más sensibles a la salinidad durante la germinación (Ayers y Haywar, 1948; Ayers, 1950; Lucero, 1970), varios autores sugieren que es importante evaluar la tolerancia a la salinidad en todas las etapas (Shannon 1979; Ashraf *et al.*, 1986 a, b; Bazzigalupi, 2014).

De este modo abordar la temática “halomórfica” en genotipos de raigrás anual diploide tanto de poblaciones como de familias de medio hermanos (FMH), caracterizados molecular y/o morfológicamente, resulta interesante no solo para incrementar el conocimiento de la especie en estas condiciones; sino también para poder brindar herramientas en futuros programas de mejoramiento genético de la especie, con la finalidad de obtener cultivares con muy buen comportamiento ante condiciones de estrés halomórfico.

2. HIPÓTESIS

Existe variabilidad genética a nivel molecular en las poblaciones y a nivel morfológico entre familias de medio hermanos (FMH).

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la variabilidad genética en las poblaciones y FMH e incrementar el conocimiento acerca de la especie y su comportamiento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a nivel molecular las 6 poblaciones que fueron evaluadas en condiciones halomórficas.

- Evaluar la variabilidad genética en caracteres morfológicos y reproductivos de interés agronómico en las 12 FMH.

- Estimar los parámetros genéticos en caracteres cuantitativos (varianza genética, varianza ambiental, varianza fenotípica, heredabilidad en sentido estricto) de las 12 FMH.

- Determinar la presencia o el porcentaje de infección de *Neotyphodium occultans*.

- Determinar correlaciones fenotípicas entre los caracteres morfológicos de las 12 FMH.

- Determinar si existe un patrón de agrupamiento o comportamiento de las 12 FMH en relación a la población que le dio origen.

- Seleccionar las FMH y los genotipos posibles para ser incorporados a futuros programas de mejoramiento genético de la especie.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudio de poblaciones

3.1-1 Etapa a campo

Se estudiaron cuatro poblaciones de *Lolium multiflorum* provenientes de colectas en campos salinos, del banco de germoplasma Pergamino y dos híbridos experimentales (Andriolo *et al.*, 2012). De aquí en más, los híbridos serán llamados poblaciones para unificar nomenclatura (cuadro 1). Estas poblaciones fueron evaluadas en el año 2012 en un suelo Natracualf típico con un pH=10; CE: 1,9dS/m (33°58' S; 60°35' O) en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, en planta aislada. Cada material estuvo representado por 10 plantas por repetición, luego en laboratorio se caracterizaron mediante la técnica de SSR (Acuña, 2009).

La caracterización morfológica a campo de las poblaciones no se llevó a cabo debido a que existió una alta mortandad de plantas; Lo que no permitió realizar el análisis estadístico de los datos. Solo sobrevivió el 20% de las plantas, de este modo, de las 36 plantas sobrevivientes que presentaron producción de semilla, se seleccionaron los mejores 12 genotipos de acuerdo a supervivencia y comportamiento general, obteniéndose así las 12 FMH (Acuña y Palacios, 2012).

Cuadro 1. Procedencia de las seis poblaciones.

Material	Origen
pob1	ARLM0027-BAP
Pob9	Colecta Campo Salino.
Pob10	Colecta Campo Pcia. San Juan.
Pob11	Colecta Campo Salino Pcia. Bs As.
Pob25*26	Híbrido experimental 25x29
Pob29*30	Híbrido experimental 29x30

3.1-2 Caracterización molecular

3.1-2.1 Material vegetativo y extracción de ADN

Para realizar la etapa de laboratorio se sembraron semillas de las 6 poblaciones en macetas y se mantuvieron en invernáculo sin calefacción. Se utilizó tejido verde fresco de plántulas individuales con al menos cuatro hojas (figura 1).



Figura 1. Plántulas utilizadas para extracción de ADN y tubo en proceso de extracción.

El material genómico se extrajo según protocolo Kleinhofs *et al.*, (1993) (anexo 1).

3.1-2.2 Cuantificación y dilución de ADN

Para la cuantificación y control de la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0,1µg/ml). Por pocillo se sembró un volumen de 2µl de muestra con 5µl de azul de bromo fenol (BPB) 1X. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 Volts/cm aproximadamente durante 30 minutos. Se cuantificó el ADN extraído, en forma visual comparando con muestras de ADN de concentración conocida y se visualizaron mediante transiluminador de luz ultravioleta UVP Modelo M-20.

Una vez cuantificadas las muestras del ADN extraído se procedió a realizar las diluciones de trabajo con TE 1/10 (1:Tris 10:EDTA) , llegándose a una concentración final de 20 ng/ml.

3.1-2.3 Amplificación del ADN

Los SSR se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de 12 individuos de cada una de las 6 poblaciones y se probaron 9 SSR. La temperatura de hibridación o annealing se calculó para cada par de primer mediante la fórmula:

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

Dónde:

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

G: cantidad de bases de Guanina

C: cantidad de bases de Citosina

A: cantidad de bases de Adenina

T: cantidad de bases de Timina

(Rybicki, 2005. <http://www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBiolManual>)

Cuando el SSR no amplificó se tomó la menor T_m del par de primer y a este se lo redujo en 5°C (Innis y Gelfand, 1990) (cuadro 2).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Veriti® Thermal Cyclers de Applied Biosystems mediante el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial a 95°C, durante 1 minuto
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización a 95°C, durante 15 segundos
 - Hibridación a temperatura de annealing de cada primer, durante 30 segundos
 - Extensión a 72° C, durante 30 segundos
- Extensión final a 72°C, durante 7 minutos.

Para la amplificación se probaron las temperaturas de annealing de cada SSR con la Mix de reacción (cuadro 3) y se llevaron a cabo en placas para PCR de 96 pocillos.

Cuadro 2. Lista de los *loci* evaluados, abreviatura, secuencias de cebadores flanqueantes, temperatura de annealing y temperatura utilizada para la amplificación. S/A: sin amplificación.

SSR	Autor	SSR abreviado	Secuencia Forward (5' - 3')	Secuencia Reverse (3' - 5')	T.annealing	T.utilizada
LPSSRH01A07	Jones <i>et al</i> ; 2001	A07	TGGAGGGCTCGTGGAGA AGT	RCGGTCCCACGCCTTGC	53°C	58
LPSSRH01H06		H06	ATTGACTGGCTTCCGTG TT	CGCGATTGCAGATTCTTG	49 °C	50
LPSSRH01D09		D09	CAAGTGCCACCATAGAT ACAA	CGTGAAGATCACTATAAACAC GA	55 °C	48
LPSSRK01A03		A03	GGACGAACTGCCGAGAC A	CGGGCATGGTGAGAAGGA	53 °C	46
TF2 NFFa002	Warnke <i>et al</i> ; 2004	A002	GCTCCAGCTTCTCCATC ATC	ACCAAGTCGTCCAAGTCAGC	57 °C	S/A
TF9 NFFa009		A009	TCCAACCCTAGATCCAC ACC	GGTGAACTCGTCGGTGATCT	57 °C	S/A
LM16	Studer <i>et al</i> ; 2006	LM16	CCATTGTGACCCAGTA ACA	TGCATAGACAGCCTCCTGAAT	55 °C	58
LM20		LM20	TATTGAGTTTATTTCGAA GGACCACC	TCTATGTCCAAAGCCTTACCA AGA	57 °C	S/A
LM26		LM26	AAGAAAATGCAATGTCT AAACAGATTAGTT	CGCCTCATGAACACTTTATAT ATTCTAGAA	63 °C	60

Cuadro 3. Composición de la mix de reacción.

Reactivo	Concentración
DNTPs	2 mM
Buffer	10X
Cl ₂ Mg	50mM
ADN	20 ng/μl
Primer (F+R)	12,5 mM
TAQ pol (Invitrogen™)	5 U/μl
H2O	

3.1-2.4 Preparado, corrida, tinción, revelado y lectura de vidrios

El armado de los geles y preparación de los vidrios se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 2). Los productos amplificados se separaron por electroforesis vertical en cubas de secuenciación en geles de poliacrilamida al 6% (19:1 acrilamida-bisacrilamida) de 0,4 mm de espesor en condiciones desnaturalizantes utilizando el equipo Sequi-Gen DNA Electrophoresis Cell, Bio-Rad (anexo 3).

Una vez finalizada la corrida electroforética, se separaron los vidrios y se procedió a la tinción de los mismos siguiendo el protocolo de tinción con plata para secuenciación de Promega Corp (anexo 4).

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

3.1-3 Análisis estadístico de los resultados

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

3.1-3.1 Cuantificación de la variabilidad genética

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

- **N:** número de individuos analizados por población.
- **Ne:** número efectivo de alelos por locus. Es una medida de diversidad e indica el tamaño de una población ideal en la cual dada las frecuencias alélicas existentes todos los individuos son totalmente diferenciados (Peakall y Smouse, 2006). Se calculó como:

$$Ne=1/(1-He)$$

Dónde: He, es la heterocigosis esperada de la población

- **pi:** frecuencia del alelo i^{mo}
 - **Alelos comunes:** se encuentran en una frecuencia por encima del 5% ($pi>0,05$)
 - **Alelos raros:** se encuentran en una frecuencia por debajo del 5% ($pi\leq 0,05$)

o **Alelos privados:** solo están presentes en una población, pueden o no ser alelos raros.

o **Alelos compartidos:** indistintamente de la frecuencia que se encuentre están presente en todas las poblaciones analizadas.

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

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

Dónde: N, es el tamaño de la muestra.

- **He:** heterocigosis esperada, es una estimación del poder discriminatorio de un locus. Tiene en cuenta el número de alelos y su frecuencia relativa. En este programa (Peakall y Smouse, 2006) la He es equivalente al contenido de información polimórfica (PIC), que es un parámetro utilizado para medir la capacidad discriminatoria de los *loci* es decir la variabilidad genética de cada SSR, según Anderson *et al.*, 1993:

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

Dónde: p_i , es la frecuencia alélica del i^{mo} alelo

N, el número de alelos observados

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

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

3.1-3.2 Análisis de la estructura genética de la población

Se determinó la estructura genética de cada población mediante los estadísticos F de Wright (Wright, 1951); este método es el más utilizado y se basa en la idea de que la subdivisión de una población lleva consigo un efecto similar a la endogamia, por lo tanto es posible medir este efecto

en términos de la reducción en la proporción de genotipos heterocigóticos, es decir en términos de heterocigosidad.

- **Estadísticos F de Wright:**

Mide la reducción de heterocigosis esperada con apareamiento al azar a cualquier nivel de jerarquía poblacional en relación a otro nivel más inclusivo de la misma. Los estadísticos F jerarquizados definidos a continuación son todos coeficientes de endogamia, pero se diferencian según la población de referencia. F_{is} se refiere a la endogamia en individuos (i), en relación con la de la subpoblación (s) a la que pertenecen; F_{st} se refiere a la endogamia en subpoblaciones (s), en relación con la de la población total de la que son una parte; F_{it} se refiere a la endogamia en individuos (i), en relación con la de la población total (t). Se calcularon de la siguiente forma:

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

$$F_{is} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Dónde: H_e , es la heterocigosis esperada por población.

H_o , es la heterocigosis observada por población.

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

$$F_{st} = \frac{H_t - H_e}{H_t}$$

Dónde: H_t , es la heterocigosis esperada en la población total.

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

$$F_{it} = \frac{H_t - H_o}{H_t}$$

3.1-3.3 Distancia genética de Nei

Existen diferentes medidas de distancia genética entre pares de poblaciones. La más usada es la distancia de Nei (1973, 1977). Este índice pretende estimar el número de mutaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original. La distancia fue calculada mediante GenAlEx.

3.1-3.4 Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA)

El Analysis of Molecular Variance – AMOVA- (Excoffier *et al.*, 1992), es un método para estimar la diferenciación de una población directamente de datos moleculares y evaluar hipótesis sobre dicha diferenciación. Es un método de partición de sumas de cuadrados, en el contexto de información molecular multivariada. Se puede entonces evaluar hipótesis sobre diferencias entre grupos y dentro de grupos.

En este trabajo, se estimó la variancia de los componentes intrapoblacionales e interpoblacionales mediante el AMOVA.

El modelo lineal utilizado fue:

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

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

La variancia total σ^2 es:

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

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

3.1.3.5 Análisis Multivariado

3.1-3.5.1 Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP)

El Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP), es una técnica multivariada de reducción de dimensión aplicable a datos provenientes de marcadores moleculares que opera sobre una matriz de distancias, por lo que es conveniente utilizarlo cuando los datos son de naturaleza binaria. Los resultados se representan en un Biplot realizado mediante el paquete estadístico Info-Gen.

3.1-3.5.2 Análisis de Cluster

El Análisis Jerarquizado o Cluster es una técnica de agrupamiento que se basa en las similitudes o distancias entre las observaciones o variables, para ello se utilizó como medida de distancia la Euclídea al cuadrado. Los resultados del agrupamiento se pueden observar a través de un dendrograma y el método empleado fue el average linkage. El mismo se realizó mediante análisis de conglomerados del paquete estadístico Info-Gen.

3.2. Estudio de Familias de Medio Hermanos

3.2-1 Origen

A partir de individuos seleccionados en la etapa de evaluación de poblaciones a campo por buen comportamiento frente al halomorfismo se generaron 12 FMH (cuadro 4). Las 12 FMH se estudiaron a campo en un suelo argiudol típico serie Pergamino, a su vez se examinó la presencia de infección endofítica con el hongo *Neotyphodium occultans*.

Cuadro 4. Procedencia de las 12 FMH.

FMH	Población de origen
1	Pob1
2	Pob9
3	Pob9
4	Pob9
5	Pob10
6	Pob10
7	Pob11
8	Pob11
9	Pob25*26
10	Pob25*26
11	Pob29*30
12	Pob29*30

3.2-2 Acondicionamiento en invernáculo

Las semillas fueron sembradas en speedling debidamente identificadas las cuales contenían una proporción de tres partes de tierra y una parte de arena, para permitir el correcto drenaje posterior al riego. Se mantuvieron en un invernáculo sin calefacción de INTA EEA Pergamino y se facilitó el crecimiento de cada planta (genotipo) hasta lograr el desarrollo de al menos 4 macollos.

3.2-3 Trasplante a campo experimental

El 17 de julio de 2013 se trasplantaron las plántulas al campo experimental de la EEA INTA Pergamino, en un suelo argiudol típico serie Pergamino pH=6,7; CE= 1,6dS/m (33°56'S y 60°33'O) en condiciones de planta espaciada y bajo un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA) con cuatro repeticiones. Se utilizó la técnica propuesta por Turesson (1922), la cual

permite despejar los efectos del ambiente sobre cada planta individual, y estimar con exactitud la expresión genética de cada carácter (figura 2).



Figura 2. Etapa a campo donde se puede observar la disposición en planta aislada y el DBCA con 4 repeticiones.

Cada FMH estuvo representada por 32 individuos de los cuales la mitad se destinaron a la medición de variables asociadas caracteres vegetativos y la otra mitad a caracteres reproductivos. Las plantas fueron dispuestas a 0,6 m entre sí y mantenido libre de malezas. Se fertilizó con una dosis de 100 Kg/ha de nitrógeno. La superficie total del ensayo fue de 190 m². Luego del trasplante las plantas fueron regadas para asegurar la implantación. En la figura 3 se muestran las condiciones climáticas registradas durante el periodo de evaluación.

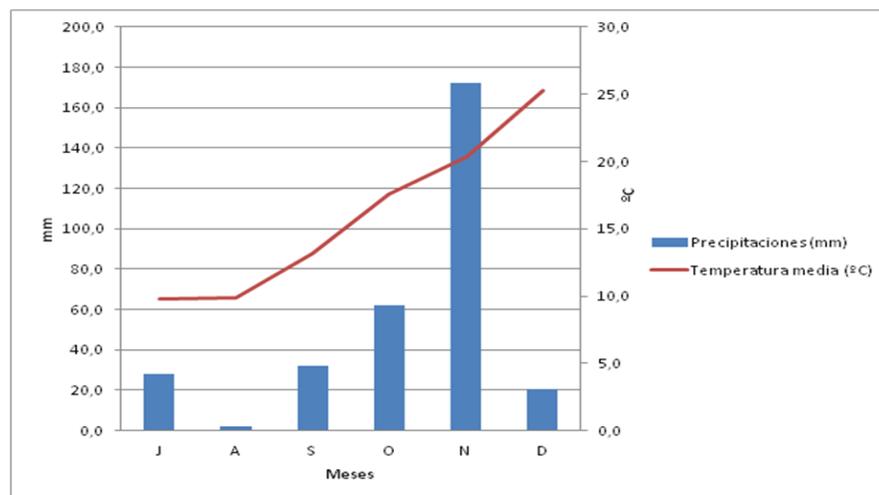


Figura 3. Temperatura media y precipitaciones registradas en la estación meteorológica INTA Pergamino durante los meses en que se llevó a cabo el ensayo a campo (julio –diciembre 2013).

3.2-4 Caracteres evaluados

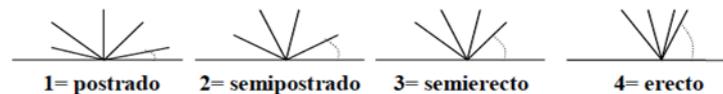
Se evaluaron tanto caracteres vegetativos como reproductivos en plantas individuales. Los primeros se tomaron desde el momento del trasplante a campo hasta el inicio de elongación del tallo (pasaje al estado reproductivo). Los caracteres reproductivos se tomaron desde el inicio de elongación del tallo hasta la cosecha de semillas.

3.2-4.1 Caracteres vegetativos

1. **Color:** el día 26/08/2013 se realizó la medición mediante escala visual (1: verde claro, 2: verde intermedio, 3: verde oscuro).

2. **Vigor:** el día 26/08/2013 se realizó la medición mediante escala visual (1: mala, 2: regular, 3: intermedia, 4: buena, 5: muy buena).

3. **Hábito de crecimiento:** el día 26/08/2013 se realizó la medición mediante escala visual (1: postrado, 2: semipostrado, 3: semierecto, 4: erecto).



4. **Número de macollos vegetativos por planta:** el conteo del número de macollos producido por cada planta se realizó los días 10/09 y 12/11 de 2013.

5. **Diámetro de planta:** el diámetro máximo sobre cada planta individual se midió en centímetros (cm) con regla graduada, entre los extremos de las hojas más largas de dos macollos opuestos. Esta medición se realizó los días 10/09, 29/10 y 12/11.

6. **Altura de planta:** se midió la altura de planta en cm, con una regla graduada los días 10/09, 29/10 y 12/11.

7. **Peso de materia seca por planta vegetativa:** se realizó la cosecha de cada planta individual a la altura del puño (6 cm) desde el nivel del suelo. Cada planta se secó a 60°C en estufa de aire forzado, durante al menos 48 horas hasta obtener peso constante. Posteriormente se procedió al pesaje. Esta medición se realizó los días 30/09 y 30/10.

3.2-4.2 Caracteres reproductivos

1. **Altura de planta reproductiva:** se midió la altura de planta en estado reproductivo en cm, con una regla graduada el día 26/11.
2. **Días al inicio de floración:** se contabilizó el número de días transcurridos desde el trasplante hasta el inicio de emergencia de las primeras espigas de cada planta.
3. **Número de espigas:** Luego de la cosecha individual de cada planta realizada el día 5/12, las espigas se secaron a temperatura ambiente y se procedió al conteo del número de macollos reproductivos.
4. **Número de espiguillas por espiga:** luego de la cosecha realizada el día 5/12 se tomaron 3 espigas por planta al azar y se determinó el promedio de espiguillas por espiga por planta.
5. **Largo de hoja bandera:** el día 09/11 se tomaron 3 mediciones al azar de hojas bandera por planta, y se determinó el largo promedio en cm desde la lígula hasta el extremo de la misma. Los tres valores obtenidos se promediaron para obtener el dato por planta.
6. **Ancho de hoja bandera:** para la medición el día 09/11 las hojas bandera medidas en el ítem anterior se doblaron al medio y se determinó el ancho en cm.
7. **Largo de espigas:** se tomaron mediciones sobre 3 espigas al azar y se midió el largo en cm. Los tres valores obtenidos se promediaron para obtener el dato por planta.
8. **Peso total de semillas:** luego de la cosecha realizada el día 5/12, se realizó la trilla de espigas por planta. Se procedió a la limpieza manual mediante zarandas con el fin de eliminar las semillas vanas (vacías) y material inerte que contamine la muestra (glumas, resto de raquis, etc.). Las semillas obtenidas de cada planta se pesaron obteniendo así el rendimiento de semilla de cada planta en gramos (g).
9. **Peso de mil semillas:** del total de semillas producidas por cada planta se tomó una muestra de 100 semillas puras, las cuales fueron pesadas y el valor obtenido se multiplicó por 10 para obtener el peso de 1000 semillas en g.

En los cuadros 5 se pueden observar las variables medidas con su correspondiente abreviatura y fecha de medición.

Tipo de carácter	Variable	Abreviatura	Fecha de medición
Vegetativo	Color	Color	26/08
	Vigor	Vigor	26/08
	Hábito de crecimiento	Hab	26/08
	Numero de macollos 1	Nma1	10/09
	Numero de macollos 2	Nma2	12/11
	Diámetro de planta 1	Dia1	10/09
	Diámetro de planta 2	Dia2	29/10
	Diámetro de planta 3	Dia3	12/11
	Altura de planta 1	Alt1	10/09
	Altura de planta 2	Alt2	29/10
	Altura de planta 3	Alt3	12/11
	Peso seco 1	Psec1	30/09
	Peso seco 2	Psec2	30/10
	Peso seco acumulado	Psac	(Psec1+Psec2)
Reproductivo	Altura de planta	Altr	26/11
	Días al inicio de floración	Flor	Desde el 15/09
	Número de espigas	Nesp	05/12
	Número de espiguillas por espigas	Neesp	05/12
	Largo de hoja bandera	Lhb	09/11
	Ancho de hoja bandera	Ahb	09/11
	Largo de espigas	Lesp	05/12
	Peso total de semillas	Psem	05/12
	Peso de mil semillas	Pmil	05/12

Cuadro 5. Abreviaturas para los caracteres vegetativos y reproductivos, y fechas de medición.

3.2-4.3 Determinación de infección endofítica

Se evaluó la presencia o ausencia de endófito en 3 semillas de cada FMH. Para esto, las semillas se sumergieron en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5% y se las dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Luego, las semillas se lavaron con agua corriente sin flujo violento, para esto se colocaron en un colador tipo de té y se dejó fluir suavemente el agua, luego se las colocó en un contenedor con agua hasta la preparación para evitar su desecamiento.

Para realizar el preparado se tomó de a una semilla por vez, se removieron las glumelas con ayuda de pinzas y/o pinches, se colocó el cariopse sobre un portaobjetos, se aplastó y dispersó con espátula y se colocó sobre ellas una gota de colorante azul de anilina al 0,4%. Rápidamente se colocó una gotita de ácido láctico al 50%. Luego de 30 minutos se colocó el cubreobjetos, se retiró el exceso de colorante con un papel secante y se procedió al análisis mediante microscopio óptico.

En cada portaobjetos se colocaron 3 semillas para facilitar el procesamiento manteniendo la individualidad de cada muestra.

En el análisis microscópico se rastreó la presencia de hifas contorneadas, no ramificadas y ubicadas entre las células (figura 4).

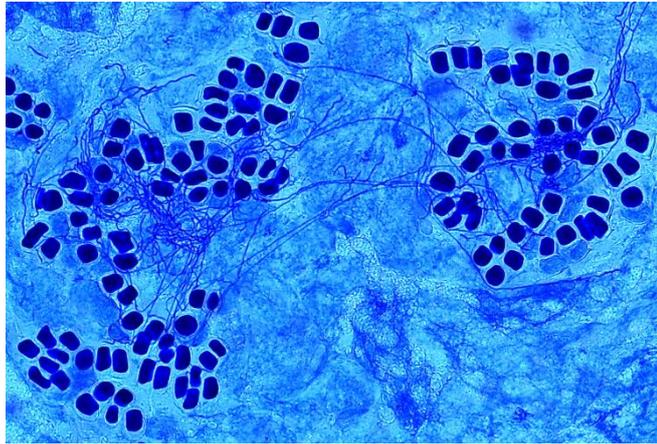


Figura 4. Imagen al microscopio óptico de células vegetales e hifas del endófito.

3.2-5 Análisis de la información

Los datos obtenidos en las etapas vegetativa y reproductiva, fueron sometidos a distintos tipos de análisis estadísticos. En primera instancia se realizaron los análisis correspondientes para comprobar los supuestos de normalidad, luego se procedió a realizar el análisis de variancia, comparación de medias (LSD/LSR), correlaciones entre variables (Pearson), y análisis multivariado (componentes principales, análisis de conglomerados) mediante el paquete estadístico Infostat.

3.2-6 Prueba de distribución normal y transformación de variables

Para determinar la distribución que presentaban las variables se utilizó el test de normalidad a través del test estadístico W de Shapiro-Wilk. Cuando las variables no cumplieron con el supuesto de normalidad se procedió a realizar la transformación adecuada para el tipo de variable (cuadro 6).

Cuadro 6. Variables transformadas y funciones empleadas.

Variable	Transformación
Número de macollos 1	Raíz cuadrada
Número de macollos 2	Raíz cuadrada
Peso seco 2	Raíz cuadrada
Peso seco acumulado	Raíz cuadrada
Peso total de semillas	Raíz cuadrada

Las variables ancho de hoja bandera y largo de espigas fueron descartadas debido a que a pesar de ser transformadas no se obtuvo una distribución normal.

3.2-7 Análisis de la Variancia

Se realizó el análisis de la variancia mediante el paquete estadístico Infostat, este método permite comparar el comportamiento promedio de las FMH para los diferentes caracteres, y se basa en la partición de la variación observada, descomponiéndola en fuentes de variación independientes (cuadro 7).

Para analizar la significancia de las variancias de los caracteres medidos entre las familias se utilizó un modelo de bloques completamente aleatorizado:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Dónde: Y_{ij} = respuesta observada en la j -ésima repetición de la i -ésima familia evaluada.

μ = media general.

A_i = componente de la variancia debido a familias.

B_j = componente de la variancia debido a repeticiones.

ε_{ij} = componente de la variancia debido al error experimental.

Cuadro 7. Fuentes de variación, grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM) y esperanza de cuadrados medios (E(CM)), para cada componente de la variancia en el análisis entre familias.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	E(CM)
Repeticiones	r-1	SC repeticiones	SC repeticiones/(r-1)	
Entre familias	f-1	SC familias	SC familias/(f-1)	$\sigma^2 e + r\sigma^2 f$
Error	(r-1)(f-1)	SC error	SC error/ (r-1).(f-1)	$\sigma^2 e$
Total	fr-1	SC total		

Dónde: r : número de repeticiones y/o bloques.

f : número de familias.

σ_f^2 : variancia familiar.

σ_e^2 : variancia de error.

Con el fin de detectar cuales familias difirieron significativamente en la media de los caracteres evaluados, se realizó la prueba t para la diferencia mínima significativa (LSD/LSR) mediante el paquete estadístico Infostat.

3.2-8 Estimación de componentes de variancia

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

$$\sigma_{fmh}^2 = (CM_f - CM_e)/r$$

Dónde: σ_{fmh}^2 : variancia genética de las familias de medio hermanos.

CM_f : cuadrado medio de las familias de medio hermanos.

CM_e : cuadrado medio del error experimental.

r : número de repeticiones.

3.2-9 Estimación de la heredabilidad en sentido estricto

Se define heredabilidad en sentido estricto (h^2) al cociente de la variancia genética aditiva (σ_a^2) sobre la variancia fenotípica (σ_p^2):

$$h^2 = \sigma_a^2 / \sigma_p^2$$

La heredabilidad expresa la porción de la variancia total que es atribuible a los efectos medios de los genes y esto es lo que determina el grado de parecido entre parientes. La heredabilidad posee un papel predictivo en el estudio genético ya que expresa la confiabilidad del valor fenotípico como indicación del valor reproductivo. El mejoramiento tradicional mide únicamente los valores fenotípicos de los individuos, pero es el valor reproductivo el que determina su influencia en la siguiente generación. Por tanto, si el mejorador selecciona individuos para que

sean progenitores de acuerdo a sus valores fenotípicos, el éxito en cambiar las características de la población puede predecirse únicamente a partir del conocimiento del grado de correspondencia entre los valores fenotípicos y los reproductivos. Este grado de correspondencia es medido a través de la heredabilidad (Falconer, 1989).

La variancia familiar (σ_f^2) representa la variancia genética entre las familias de medio hermanos, la cual es igual a la covariancia entre medios hermanos (covMH). Esta puede ser utilizada para estimar la variancia aditiva (σ_a^2), ya que

$$\sigma_f^2 = \text{cov (MH)} = 1/4 \sigma_a^2$$

La variancia aditiva puede estimarse como

$$\sigma_a^2 = 4\sigma_f^2$$

Las estimaciones de heredabilidad en sentido estricto se realizaron en base a los componentes de la variancia del análisis de la media de la parcela (Nguyen y Sleper, 1983), según la fórmula:

$$h^2 = \frac{\sigma_f^2}{(\sigma_f^2 + \sigma_{e/r}^2)}$$

Dónde, r son las 4 repeticiones, σ_e^2 es la variancia del error que expresa la variación ambiental entre repeticiones y σ_f^2 es la variancia genética existente entre familias de medio hermanos.

3.2-10 Estimaciones de correlaciones fenotípicas

La asociación entre dos caracteres que pueden ser directamente observados es la correlación de valores fenotípicos o correlación fenotípica. Esta se determina a través de la medición de dos caracteres en un número de individuos de la población, se realiza para conocer el grado de asociación entre los caracteres para ser utilizados en futuros procesos de selección. Fue realizada

con el paquete estadístico Infostat mediante el coeficiente de correlación de Pearson, el cual mide la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las variables originales y asume valores en el intervalo $[-1;1]$ y el signo indica la dirección de la asociación.

3.2-11 Análisis Multivariado

Los análisis multivariados que se aplicaron fueron: Análisis de Componentes Principales y Análisis Jerarquizado (Clúster) mediante el paquete estadístico Info-Gen.

El Análisis de Componentes Principales se basa en la transformación de un conjunto de variables cuantitativas originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales. El objetivo es poder condensar la información, en unas pocas componentes principales que expliquen la mayor variabilidad posible.

El Análisis Jerarquizado o Clúster es una técnica de agrupamiento que se basa en las similitudes o distancias entre las observaciones o variables. Para ello se utilizó como medida de distancia la Euclídea al cuadrado. Los resultados del agrupamiento se pueden observar a través de un dendrograma y el método empleado fue el del centroide no ponderado Ward, el cual promedia todas las distancias entre pares de familias ajustando por las covariancias.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización Molecular

4.1-1.1 Extracción y cuantificación de ADN

El protocolo empleado, permitió lograr ADN en cantidad y calidad suficiente para generar los productos de amplificación definidos y reproducibles. Los valores que se obtuvieron oscilaron entre 50-200 ng/ μ l (Figura 5).

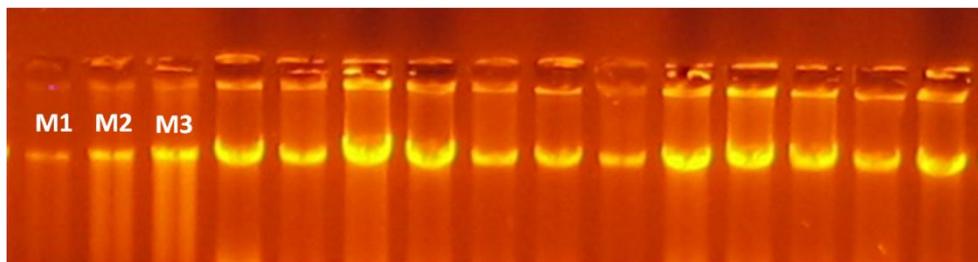


Figura 5. Cuantificación con bromuro de etidio del ADN extraído. M1=50ng/ μ l, M2=100ng/ μ l y M3=150ng/ μ l.

4.1-1.2 Amplificación del ADN

Del total de los 9 SSR propuestos para la evaluación molecular se logró amplificar 5 de ellos (cuadro 2), para estos 5 SSR se ajustó la temperatura de amplificación, dado a que en ningún caso la temperatura utilizada coincidió con la temperatura de annealing calculada (Rybicki, 2005). El SSR A07 amplificó pero no se pudo obtener la cantidad de individuos necesarios para el análisis, por lo cual tampoco se tuvo en cuenta.

4.1-1.3 Productos amplificados

Todos los SSR que amplificaron fueron polimórficos. La cantidad de alelos observados se muestra en el cuadro 8, en total fueron 22 alelos en las seis poblaciones con los cinco SSR utilizados con un rango de tres a ocho alelos por SSR.

El SSR H06 fue el que presentó un mayor número de alelos (ocho), mientras que los SSR D09 y LM26 fueron los que presentaron un menor número de alelos (tres). El SSR LM16 fue el de menor peso molecular (145-159 pb) y el SSR D09 fue el mayor tamaño (260-306 pb).

Cuadro 8. Microsatélite (SSR), número (Nº) de alelos, tamaño en pares de bases (pb).

SSR	Nº de alelos	Tamaño (pb)
H06	8	161-183
D09	3	260-306
A03	4	234-268
LM16	4	145-159
LM26	3	213-251

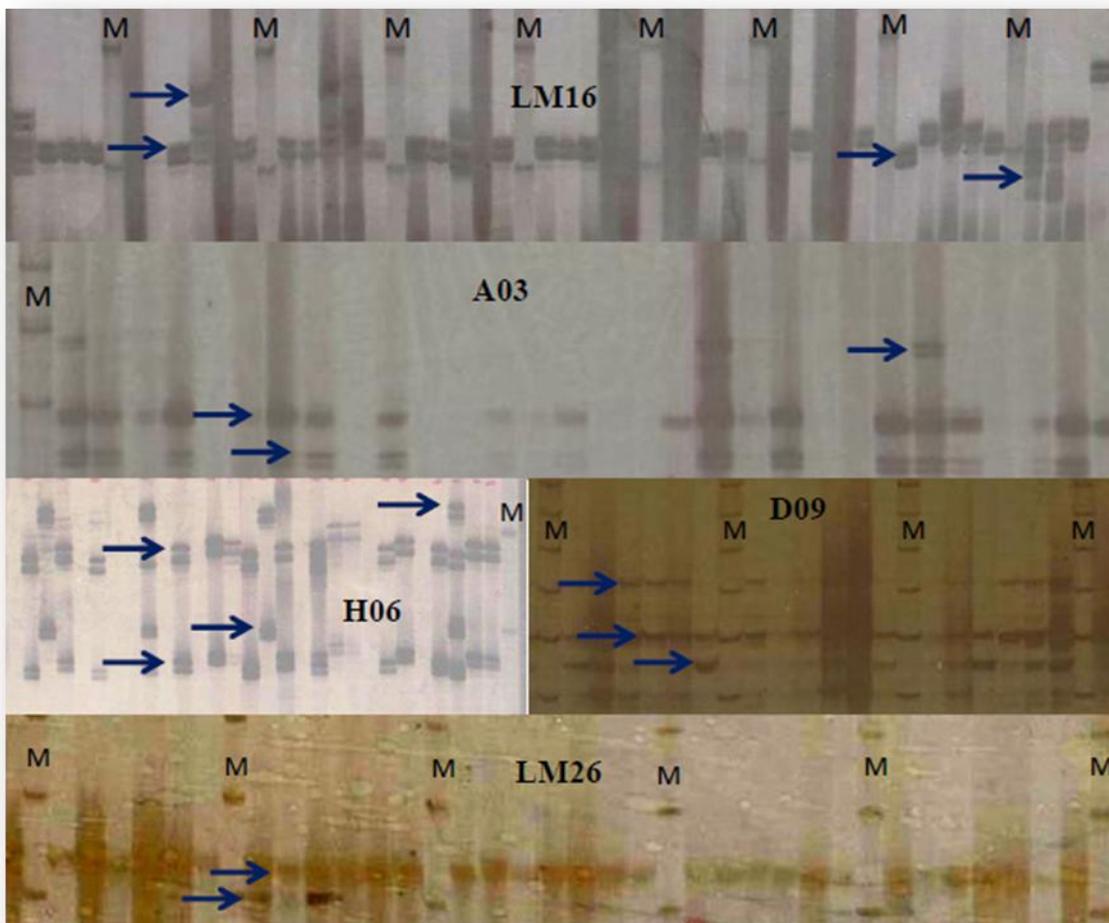


Figura 6. Patrón de bandas para cada SSR. Las flechas indican algunos de los alelos encontrados.

M: marcador de peso molecular de 25 pb.

4.1-2 Cuantificación de la variabilidad genética

Se analizaron estadísticamente los productos de amplificación generados por los SSR utilizados en las seis poblaciones estudiadas (cuadro 9). La media del número efectivo de alelos por SSR fue de 2,194 con un rango desde 2,050 (pob9) a 2,364 (pob29*30). La heterocigosis observada (H_o) presentó gran variabilidad, con promedio de 0,433 y un rango desde 0,267 (pob10) a 0,617 (pob25*26). Mientras que la heterocigosis esperada (H_e) presentó una media de 0,455 con un mínimo de 0,388 (pob11) y un máximo de 0,517 (pob29*30) (cuadro 9).

Cuadro 9. Estadística descriptiva para todos los microsatélites (SSR), muestra por población (N), número de alelos efectivos por locus (N_e), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e).

Población	N	N_e	H_o	H_e
1	12	2,292	0,467	0,458
9	12	2,050	0,467	0,444
10	12	2,103	0,267	0,430
11	12	2,069	0,317	0,388
25*26	12	2,289	0,617	0,495
29*30	12	2,364	0,467	0,517
Promedio	12	2,194	0,433	0,455

Todas las poblaciones fueron polimórficas. El porcentaje de polimorfismo promedio de las poblaciones analizadas fue de 93,33. El rango varió entre 80% (pob10 y pob11) y 100% (pob1, 9, 25*26 y 29*30) (Cuadro 10). Se observaron también las frecuencias alélicas para todos los alelos de todas las poblaciones (cuadro 11).

Cuadro 10. Porcentajes de polimorfismo en las poblaciones y media.

Población	% de polimorfismo
1	100%
9	100%
10	80%
11	80%
25*26	100%
29*30	100%
Promedio	93.33%

Cuadro 11. Frecuencia alélicas para todos los alelos de todas las poblaciones.

Pob.	Alelo	LM16	D09	LM26	A03	H06
1	1	0,000	0,292	0,083	0,250	0,083
	2	0,833	0,708	0,000	0,375	0,208
	3	0,083	0,000	0,917	0,042	0,000
	4	0,083			0,333	0,208
	5					0,125
	6					0,000
	7					0,000
	8					0,375
9	1	0,333	0,083	0,125	0,167	0,000
	2	0,625	0,833	0,083	0,792	0,167
	3	0,042	0,083	0,792	0,042	0,042
	4	0,000			0,000	0,292
	5					0,375
	6					0,042
	7					0,000
	8					0,083
10	1	0,083	0,167	0,000	0,167	0,042
	2	0,833	0,625	0,000	0,417	0,042
	3	0,083	0,208	1,000	0,000	0,167
	4	0,000			0,417	0,000
	5					0,500
	6					0,125
	7					0,042
	8					0,083
11	1	0,000	0,167	0,000	0,292	0,000
	2	0,750	0,792	0,000	0,708	0,000
	3	0,125	0,042	1,000	0,000	0,167
	4	0,125			0,000	0,000
	5					0,292
	6					0,083
	7					0,250
	8					0,208
25*26	1	0,083	0,042	0,000	0,333	0,042
	2	0,792	0,750	0,208	0,458	0,333
	3	0,042	0,208	0,792	0,083	0,167
	4	0,083			0,125	0,333
	5					0,083
	6					0,000
	7					0,000
	8					0,042
29*30	1	0,333	0,125	0,167	0,000	0,000
	2	0,667	0,750	0,125	0,167	0,083
	3	0,000	0,125	0,708	0,167	0,250
	4	0,000			0,667	0,167
	5					0,250
	6					0,250
	7					0,000
	8					0,000
Nº de alelos por SSR		4	3	3	4	8

Con respecto a la heterocigosidad de cada población para los SSR utilizados (cuadro 12) se puede decir que:

- Para el locus A03, se encontró un F_{is} negativo -0,009, un valor de F_{it} de 0,172, el mayor valor de F_{st} que fue de 0,179 y el menor N_m promedio (1,148).
- Para el locus D09, se encontró un valor promedio negativo de F_{is} -0,223 el cual fue el menor valor encontrado para todos los marcadores. A la vez se obtuvo el menor valor de F_{it} -0,173, el menor valor de F_{st} 0,040 y el mayor número de migrantes 5,957.
- Para el locus H06, se observó que todos los valores fueron intermedios, siendo, el F_{is} 0,180, el F_{it} igual a 0,268, el F_{st} 0,107 y un N_m de 2,086.
- El locus LM16 presentó el mayor valor de F_{is} promedio 0,235, un F_{it} de 0,292, el cual también fue el mayor valor encontrado, un F_{st} de 0,074 y un N_m igual a 3,118.
- El locus LM26 tuvo valores intermedios para todos los estadísticos. El F_{is} promedio fue negativo -0,100, presentó un F_{it} de 0,007 y un F_{st} de 0,097, para el N_m el valor fue igual a 2,328.

Cuadro 12. Estadísticos de Wright. Se observa el F_{is} promedio por SSR dentro de poblaciones, entre poblaciones (F_{it}), el índice de fijación (F_{st}) y el número de migrantes (N_m).

SSR	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
A03	-0,009	0,172	0,179	1,148
D09	-0,223	-0,173	0,040	5,957
H06	0,180	0,268	0,107	2,086
LM16	0,235	0,292	0,074	3,118
LM26	-0,100	0,007	0,097	2,328
Promedio	0,017	0,113	0,099	2,927

4.1-3 Descripción de alelos

La mayor frecuencia alélica ($p_i \geq 0,8$), de los 22 alelos que se encontraron, fueron para D09 en la pob9, en el SSR LM16 (pob1 y pob10) y en LM26 (pob1, pob10 y Pob11) (Cuadro 11). En cuanto a los alelos compartidos seis estuvieron presentes en todas las poblaciones (27,27% del total

de los alelos). La mayor frecuencia alélica promedio ($p_i=0,87$) la presentó el alelo tres del SSR LM26. La menor frecuencia promedio la presentó el alelo uno del SSR D09 (Cuadro 13).

Cuadro 13. Alelos compartidos por todas las poblaciones para cada SSR y frecuencias alélicas promedio.

SSR	Alelo	p_i promedio
LM16	2	0,75
LM26	3	0,87
D09	1	0,15
	2	0,74
A03	2	0,49
H06	5	0,27

Los SSR D09, A03 y H06 presentaron alelos raros ($p_i < 0,05$). Los SSR D09 y A03 presentaron solo un alelo raro en las pob11 y pob9 respectivamente, mientras que H06 presentó alelos raros en las pob9 (dos), pob10 (tres) y en la pob25*26 (dos) (cuadro 11). No se encontraron alelos privativos en ningún caso.

4.1-4 Distancias genéticas de Nei

El promedio de los valores de distancias genéticas de Nei entre los pares de poblaciones fue 0,131, con valores extremos de 0,268 y 0,082. Las poblaciones que presentan mayor similitud a través de todos los *loci* son la Pob1 con la 25*26, la Pob9 con la Pob11 y la Pob10 con la Pob11. Las poblaciones que presentan mayor distancia son la Pob11 y Pob29*30, seguidas de las Pob9 y Pob29*30 (cuadro 14).

Cuadro 14. Distancias genéticas de Nei entre las poblaciones.

	1	9	10	11	25*26	29*30
1	0,000					
9	0,139	0,000				
10	0,085	0,132	0,000			
11	0,093	0,082	0,082	0,000		
25*26	0,082	0,086	0,125	0,109	0,000	
29*30	0,169	0,220	0,108	0,268	0,184	0,000

4.1-5 Análisis de la variancia molecular

El Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA) muestra que existió variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones ($p < 0,001$). El 15% de la variancia genética molecular se encontró entre las poblaciones y el 85% dentro de las poblaciones o lo que es lo mismo la variación entre individuos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de la variancia molecular entre y dentro de las seis poblaciones. G.L: grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: cuadrado medio, Var est: variancia estimada.

	GL	SC	CM	Var. Est.	Porcentaje	Probabilidad
Entre poblaciones	5	39,833	7,967	0,447	15	0,001
Dentro de poblaciones	66	171,750	2,602	2,602	85	
total	71	211,583		3,049	100	

4.1-6 Distancias genéticas por pares (PhiPT)

Las distancias genéticas de a pares PhiPT rondan entre 0,074 (Pob10/Pob11) y 0,279 (Pob11/Pob29*30). La única distancia PhiPT que no fue significativa fue la de Pob1/Pob10 (0,071) (cuadro 16).

Cuadro 16. Distancia genética entre pares de poblaciones (PhiPT).

	Pob1	Pob9	Pob10	Pob11	Pob25*26	Pob29*30
Pob1	0,000	0,002	0,066	0,006	0,022	0,006
Pob9	0,178	0,000	0,003	0,016	0,015	0,001
Pob10	0,071	0,145	0,000	0,046	0,007	0,028
Pob11	0,113	0,100	0,074	0,000	0,001	0,001
Pob25*26	0,093	0,109	0,137	0,154	0,000	0,002
Pob29*30	0,171	0,085	0,085	0,279	0,194	0,000

Nota: Debajo de la diagonal se encuentran los valores de distancia genética PhiPT. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades basadas en 999 permutaciones. (Significativo para valores de $p < 0,05$).

4.1-7 Análisis multivariados

4.1-7.1 Análisis de coordenadas principales

El Análisis de Coordenadas Principales (ACoorP) estimado mediante la distancia genética Euclídea al cuadrado, muestra que las primeras dos coordenadas principales explicaron el 84% de la variación total (cuadro 17, figura 7).

Cuadro 17. Autovalores de la matriz de correlación, proporción que explica cada autovalor y proporción acumulada.

Lambda	Valor	Proporción	Proporción acumulada
1	4750,02	0,71	0,71
2	861,68	0,13	0,84
3	480,28	0,07	0,92
4	349,83	0,05	0,97
5	209,94	0,03	1,00

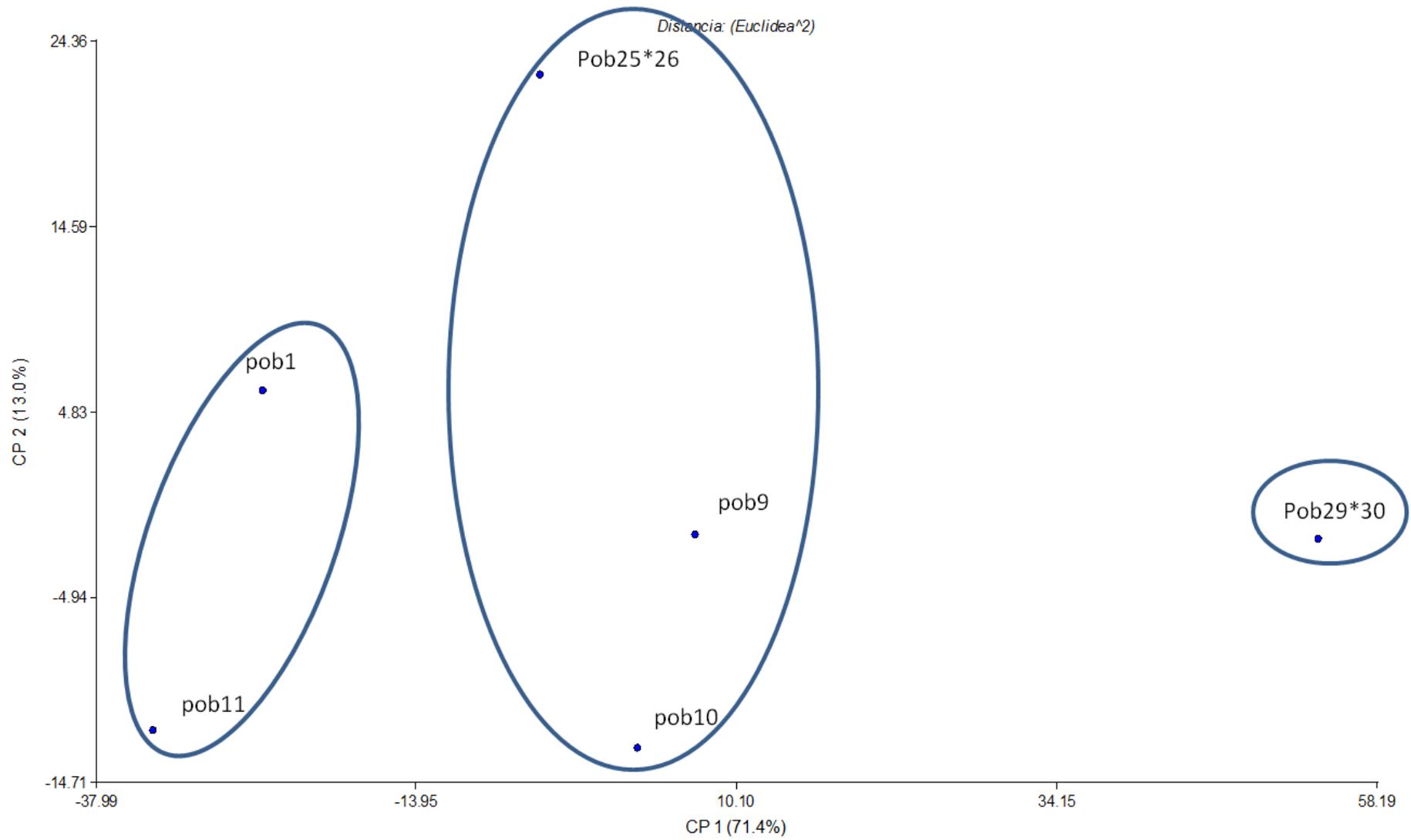


Figura 7. Análisis de Coordenadas Principales de las 6 poblaciones basado en la distancia genética Euclídea al cuadrado. CP1 y CP2 son la primera y segunda coordenadas principales, respectivamente.

La primera coordenada explicó el 71,4% de la variabilidad encontrada, demostrando que la pob29*30 se diferenció notablemente del resto. Seguida por las Pob10, Pob9 y Pob25*26 que presentaron una posición intermedia con respecto a la primera coordenada. A nivel de la segunda coordenada, se diferenciaron las Pob1 y Pob25*26 de las demás.

4.1-7.2 Análisis de clúster jerárquico

El Análisis de Clúster jerárquico (Figura 8) obtenido a partir de la matriz de distancias genéticas Euclídea al cuadrado, mostró tres grupos si se toma como punto de corte el valor del 50% (34,07). El primer grupo lo conforma la Pob29*30. En el segundo grupo encontramos a Pob25*26, Pob10 y Pob9. Las Pob1 y Pob11 conforman el último grupo. Esta disposición obtuvo una correlación cofenética igual a 0,85.

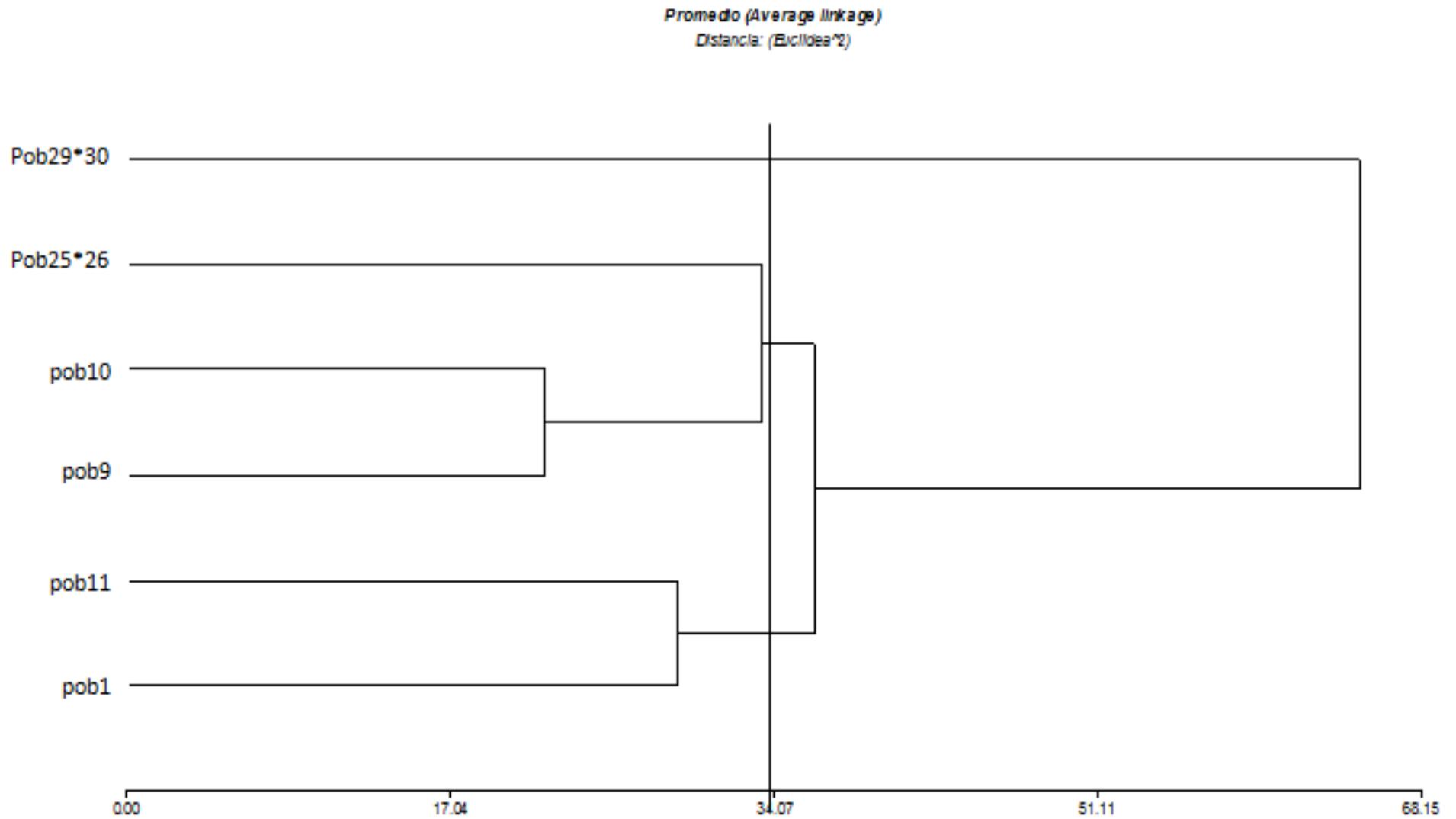


Figura 8. Análisis de Cluster de las 6 poblaciones analizadas a partir de la matriz de distancias genéticas Euclídea al cuadrado.

4.2 Caracterización agronómica

4.2- 1 Caracteres Vegetativos

En el cuadro 18, se presenta el comportamiento promedio y la estadística descriptiva de las 12 familias de medio hermanos de raigrás anual: media, desvío estándar, máximo, mínimo, coeficiente de variación y significancia (valor p), para todos los caracteres vegetativos estudiados. Mientras que en el cuadro 19, se observa el comportamiento promedio por FMH para los caracteres vegetativos. Se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) para la mayoría de las variables vegetativas analizadas, con excepción del peso seco 2 y peso seco acumulado.

Cuadro 18. Comportamiento promedio de las 12 FMH de *Lolium multiflorum* en caracteres vegetativos evaluados en condiciones de planta aislada. Media, desvío estándar, mínimo, máximo, coeficiente de variación y significancia (valor p).

Variable	Media	Desvío estándar	Coeficiente de variación	Mínimo	Máximo	Valor p
Alt1 (cm)	15,55	4,42	28,43	1,40	29,50	0,0001
Dia1 (cm)	33,03	8,61	26,06	7,00	59,00	0,0096
Nma1	35,52	2,37	66,36	19,00	87,00	0,0003
Psec1 (g)	2,49	1,31	52,76	0,10	6,07	0,0336
Alt2 (cm)	44,48	8,42	18,92	22,00	65,50	<0,0001
Dia2 (cm)	83,30	15,29	18,36	44,00	135,50	<0,0001
Nma2	118,59	4,28	36,1	27,00	264,00	0,0053
Psec2 (g)	16,97	1,10	64,82	2,19	47,33	Ns
Alt3 (cm)	39,39	6,97	17,68	19,50	58,00	<0,0001
Dia3	72,81	12,70	17,45	38,00	106,00	0,0001
Psac (g)	19,18	1,27	67,08	0,22	53,29	Ns

Ns: no significativa; Abreviaturas ver cuadro 5.

Cuadro 19. Medias aritméticas de los caracteres vegetativos para cada FMH de *Lolium multiflorum* evaluados en condiciones de planta aislada.

FMH	Dia1	Alt1	Nma1	Dia2	Alt2	Psec1	Psec2	Alt3	Dia3	Nma2	Psac
1	33,45	15,16	42,25	86,84	45,66	2,77	18,23	41,68	77,06	117,51	20,98
2	30,01	15,38	25,70	81,05	43,25	2,14	15,37	42,78	78,25	105,88	17,31
3	32,82	15,08	50,27	81,72	43,94	2,75	18,32	41,63	78,88	129,73	21,07
4	32,66	15,30	41,60	76,66	40,09	2,27	13,32	38,27	68,81	127,24	15,60
5	40,91	20,54	38,81	96,59	51,66	3,35	23,62	40,94	74,19	111,30	26,83
6	35,87	17,11	31,92	89,25	48,78	2,68	16,81	38,22	71,50	94,48	19,36
7	34,77	17,41	37,09	90,44	48,03	2,97	17,89	40,29	73,94	107,12	20,70
8	32,73	15,44	31,25	81,69	44,91	2,39	15,60	40,11	72,69	121,44	17,89
9	28,55	14,03	27,56	85,27	43,77	1,69	16,32	39,31	73,87	115,56	16,16
10	31,34	13,76	25,70	87,33	48,07	2,11	16,32	42,68	79,47	105,27	18,23
11	30,81	13,41	36,72	70,91	37,03	2,22	15,52	32,57	61,56	128,14	17,56
12	32,51	14,01	42,64	72,19	38,78	2,49	17,39	34,36	64,00	164,10	19,80
Media	33,03	15,55	35,52	83,30	44,48	2,49	16,97	39,39	72,81	118,59	19,18
LSD/LSR	5,76	2,84	0,96	9,51	5,18	0,89	0,54	4,50	8,25	1,92	0,62

Nota: LSD (diferencias mínimas significativas: $\alpha=0,05$); LSR (cocientes mínimos significativos $\alpha=0,05$); Abreviaturas ver cuadro 5.

➤ Color de planta

La mayor frecuencia de plantas presentó un color intermedio (63%), seguido por un color oscuro (21%). El menor porcentaje correspondió a plantas con color claro (17%).

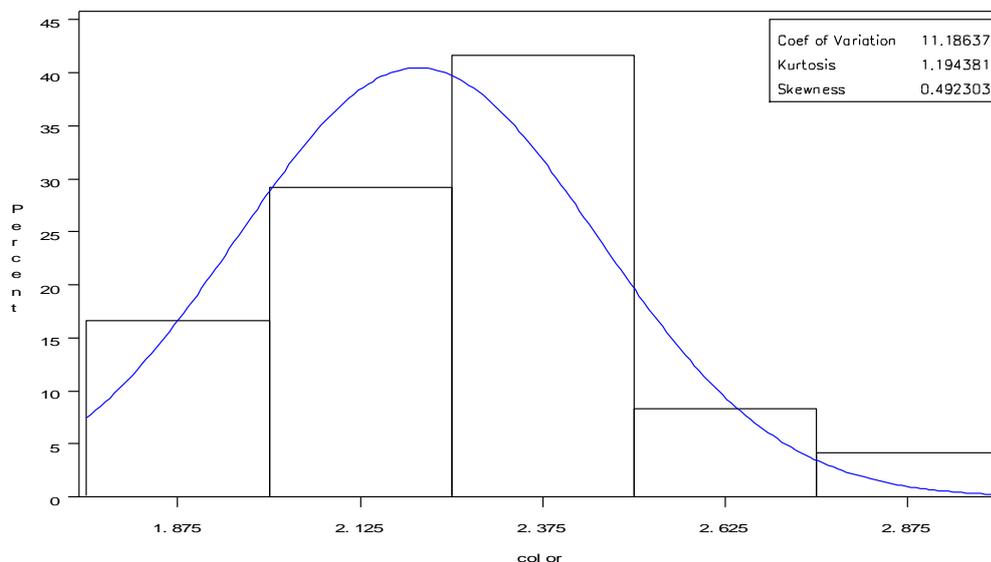


Figura 15. Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el carácter color en las 12 FMH.

➤ Vigor de planta

El mayor porcentaje de plantas mostraron un vigor de crecimiento intermedio y bueno (29% y 29%), seguido por un vigor malo y muy bueno (19% y 19%). El menor porcentaje correspondió a plantas con vigor muy malo (4%).

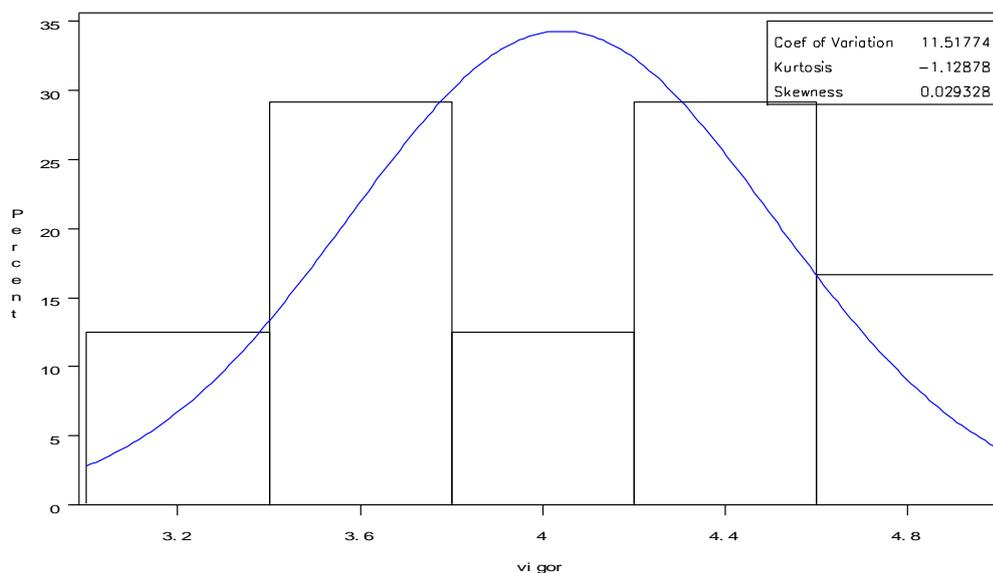


Figura 15. Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el carácter vigor en las 12 FMH.

➤ Hábito de crecimiento

El mayor porcentaje de plantas mostró un hábito de crecimiento semipostrado (60%), seguido por un hábito postrado (23%). Los porcentajes menores correspondieron a plantas con hábito semierecto (13%) y erecto (4%).

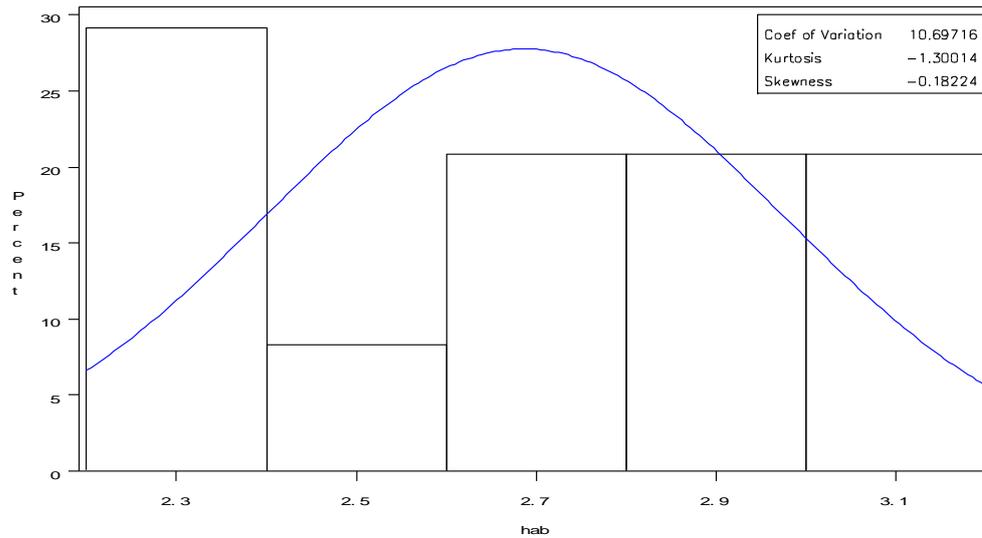


Figura 15. Distribución de frecuencia en porcentaje de plantas (%) para el hábito de crecimiento en las 12 FMH.

➤ **Número de macollos vegetativos 1**

La media del número de macollos vegetativos 1 por planta fue de 35,52 considerando todas las familias, con un rango de 19 a 87 (Cuadro 20), se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las familias (Cuadro 18). La FMH3 logró el mayor número de macollos vegetativos 1 promedio (50,27) mientras que las FMH 2 y FMH10 presentaron el menor número de macollos 1 promedio (25,7) (Cuadro 19).

➤ **Número de macollos vegetativos 2**

La media del número de macollos vegetativos 2 por planta fue de 118,59 considerando todas las familias, con un rango de 27 a 264 (Cuadro 18), se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las familias (Cuadro 18). La FMH12 logró el mayor número de macollos vegetativos 2 promedio (164,10) mientras que la FMH6 presentó el menor número de macollos 2 promedio (94,48) (Cuadro 19).

➤ **Diámetro de planta 1**

El diámetro promedio de planta 1 de las FMH fue 33,03 cm, con un rango de 7 a 59 cm (Cuadro 18). Este carácter también evidenció diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre FMH (Cuadro

18). La FMH5 logró el mayor diámetro 1 (40,91 g) mientras que la FMH9 logró el menor diámetro (28,55 g).

➤ **Diámetro de planta 2**

El diámetro promedio de planta 2 de las FMH fue 83,30 cm, con un rango de 44 a 135,5 cm (Cuadro 18). Este carácter evidenció diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre FMH (Cuadro 18). La FMH5 logró el mayor diámetro 2 (96,59 g) mientras que la FMH11 logró el menor diámetro (70,91 g). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 33% logró entre 86 y 96 cm de diámetro.

➤ **Diámetro de planta 3**

El diámetro promedio de planta 3 de las FMH fue 72,81 cm, con un rango de 38 a 106 cm (Cuadro 18). Este carácter también evidenció diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre FMH (Cuadro 18). La FMH10 logró el mayor diámetro 1 (79,47 g) mientras que la FMH11 logró el menor diámetro (61,56 g). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 33% logró entre 70 y 77 cm de diámetro.

➤ **Altura de planta 1**

La altura media de planta 1, entre todas las FMH, fue de 15,55 cm, con un rango que osciló entre 1,4 y 29,5 cm (Cuadro 18). Se encontró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 18). La FMH5 logró la mayor altura (20,54 cm), mientras que la FMH11 presentó la menor (13,41 cm) (Cuadro 19). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 44% logró entre 15 y 18 cm de altura.

➤ **Altura de planta 2**

La altura media de planta 2, entre todas las FMH, fue de 44,48 cm, con un rango que osciló entre 22 y 65,5 cm (Cuadro 18). Se encontró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 18). La FMH5 logró la mayor altura (51,66), mientras que la FMH11 presentó la menor

(37,03) (Cuadro 19). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 38% logró entre 42 y 47cm de altura.

➤ **Altura de planta 3**

La altura media de planta 3, entre todas las FMH, fue de 39,39 cm, con un rango que osciló entre 19,5 y 58 cm (Cuadro 18). Se encontró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 18). La FMH 2 logró la mayor altura (42,78 cm), mientras que la FMH 11 presentó la menor (32,57 cm) (Cuadro 19). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 35% logró entre 35 y 40cm de altura.

➤ **Peso seco 1**

La media del peso de materia seca al primer corte por planta fue 2,49 g, con un rango que osciló entre 0,10 a 6,07 g (Cuadro 18). Este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 18). La FMH5 logró el mayor peso de materia seca 1 promedio (3,35 g), mientras que la FMH9 presentó el menor valor (1,69g). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 35 % logró entre 2 y 3g de materia seca.

➤ **Peso seco 2**

La media del peso de materia seca al segundo corte por planta fue 16,97 g, con un rango que osciló entre 2,19 a 47,33 g (Cuadro 18). Este carácter no presentó diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 18). La FMH5 logró el mayor peso de materia seca 2 promedio (23,62 g), mientras que la FMH4 presentó el menor valor (13,32 g). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 48% logró entre 3 y 4g de materia seca.

➤ **Peso seco acumulado**

La media del peso de materia seca acumulado fue 19,18 g, con un rango que osciló entre 0,22 a 53,29 g (Cuadro 18). Este carácter no presentó diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 18). La FMH5 logró el mayor peso de materia seca acumulado promedio (26,83 g), mientras

que la FMH4 presentó el menor valor (15,60 g). Del total de las plantas analizadas en todas las FMH el 50% logró entre 3 y 4g de materia seca.

4.2- 2 Caracteres Reproductivos

En el cuadro 20, se presenta el comportamiento promedio de las 12 FMH de raigrás anual: media, desvío estándar, máximo, mínimo, coeficiente de variación y nivel de significancia (valor p), para todos los caracteres reproductivos estudiados. En el cuadro 21 se observa el comportamiento promedio por FMH de raigrás anual para los caracteres reproductivos. Se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para casi todos los caracteres analizados excepto para la variable peso total de semillas y días a floración.

Cuadro 20. Comportamiento promedio de las 12 FMH de *Lolium multiflorum* en caracteres reproductivos evaluados en condiciones de planta aislada. Media, desvío estándar, mínimo, máximo, coeficiente de variación y significancia (valor p).

Variable	Media	Desvío estándar	Coeficiente de variación	Mínimo	Máximo	Valor p
Flor	82,35	15,18	18,44	40,75	106,25	Ns
Altr	81,45	12,40	15,22	22,70	45,00	<0,0001
Lhb	13,8	2,96	21,43	5,83	112,00	0,0022
Nesp	132,77	49,00	37,00	11,00	281,00	0,0002
Nesp	23,41	3,72	15,88	13,33	33,33	0,0039
Psem	11,56	1,51	13,19	0,08	42,51	Ns
Pmil	1,91	0,27	14,06	1,27	2,80	<0,0001

Ns: no significativa; Abreviaturas ver cuadro 5.

Cuadro 21. Medias aritméticas de los caracteres reproductivos de las 12 FMH de *Lolium multiflorum* evaluados en condiciones de planta aislada.

FMH	Flor	Altr	Lhb	Nesp	Neesp	Psem	Pmil
1	87	83,20	14,07	119,93	22,78	10,50	1,85
2	80,94	82,73	13,62	123,53	22,11	11,09	1,74
3	88,19	83,91	11,98	116,50	24,98	11,70	1,92
4	78,63	80,13	13,64	131,75	25,21	13,47	1,82
5	74,63	80,94	13,31	139,25	22,69	10,89	1,99
6	77,71	87,73	14,05	131,47	21,53	12,32	1,90
7	84,35	90,06	12,82	121,75	24,12	12,25	1,98
8	88,69	86,13	15,88	94,31	25,31	10,56	1,96
9	74,69	77,97	14,79	162,00	20,83	15,92	1,93
10	81,44	81,78	15,44	122,88	23,21	8,01	1,78
11	89,63	76,13	13,71	164,75	23,69	10,69	2,20
12	82,38	67,25	12,31	163,63	24,19	12,11	1,79
Media	82,35	81,45	13,80	132,77	23,41	11,56	1,91
LSD/LSR	24,13	7,92	1,95	32,16	2,51	0,76	0,17

LSD: (diferencias mínimas significativas: $\alpha=0,05$); **LSR:** (cocientes mínimos significativos $\alpha=0,05$); para ver abreviaturas dirigirse al cuadro 5.

➤ **Altura de planta reproductiva**

La altura media de planta reproductiva, entre todas las FMH, fue de 81,45 cm, con un rango que osciló entre 22,70 a 45,00 cm (Cuadro 20). Se encontró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 20). La FMH7 logró la mayor altura (90,06 cm), mientras que la FMH12 presentó la menor (67,25 cm) (Cuadro 21).

➤ **Fecha de floración**

La fecha de floración promedio fue de 82 días desde el trasplante (Cuadro 20), oscilando entre 75 y 90 días, no se evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las FMH (Cuadro 20). Sin embargo pudo observarse una tendencia de la FMH 11 como la más tardía y las FMH 5 y FMH9 como las más tempranas (cuadro 21, figura 9).

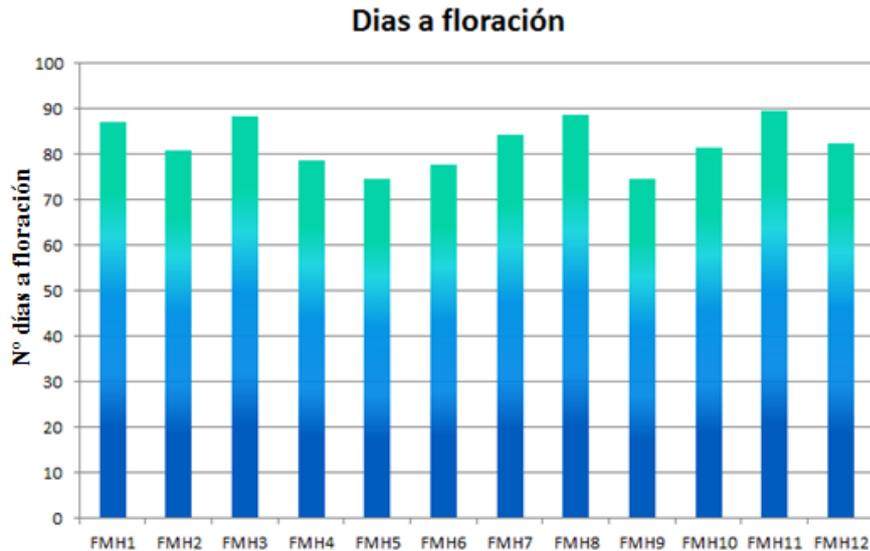


Figura 9. Promedio para cada FMH de los días a floración.

➤ **Número de espigas**

La media del número de espigas por planta fue de 132,77 considerando todas las FMH, con un rango de 11 a 281 (Cuadro 20), se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 20). La FMH 12 logró el mayor número de espigas por planta promedio (163,63) mientras que la FMH 8 presentó el menor número de espigas por planta (94,31) (Cuadro 21).

➤ **Número de espiguillas por espiga**

La media del número de espiguillas por espiga fue de 23,41 considerando todas las FMH, con un rango de 13,33 a 33,33 (Cuadro 20), se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 20). La FMH8 logró el mayor número de espiguillas por espiga promedio (25,31) mientras que la FMH9 presentó el menor número de espiguillas por espiga (20,83) (Cuadro 21).

➤ **Largo de hoja bandera**

El largo de hoja bandera medio por planta, entre todas las FMH fue de 13,80 cm, con un rango que osciló entre 5,83 y 112,00 cm (Cuadro 20). Se encontró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las FMH (Cuadro 20). La FMH8 logró el mayor largo de hoja bandera (15,88 cm), mientras que la FMH3 presentó la menor (11,98 cm) (Cuadro 21).

➤ **Peso total de semillas**

La media del peso total de semillas por planta fue de 11,56 g, con un rango que osciló entre 0,08 a 42,51 g (Cuadro 20). Este carácter no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las FMH (Cuadro 20). Sin embargo se observó una tendencia de la FMH9 como la de mayor peso total de semillas (15,92 g) y la FMH10 la de menor peso total de semillas por planta (8,01 g) (Cuadro 21).

➤ **Peso de mil semillas**

La media del peso de mil semillas por planta fue de 1,91 g, con un rango que osciló entre 1,27 a 2,80 g (Cuadro 20). Este carácter presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre FMH (Cuadro 20). La FMH11 fue la de mayor valor (2,20 g), mientras que la FMH2 presentó el menor peso de mil semillas por planta (1,74 g) (Cuadro 21).

4.2- 3 Determinación de endófito en semilla

En el cuadro 22 se observa que el análisis de endófito evidenció que un 17 % de las FMH presentaron infección del 100% del hongo *Neotyphodium occultans* (FMH 8 y FMH9), el 8% de las FMH presentaron una infección intermedia y el 75% de las FMH fueron libres de infección del hongo endófito (FMH: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 11).

Cuadro 22. Porcentaje de presencia de infección con *Neotyphodium occultans* para cada FMH

FMH	% de infección
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	100
9	100
10	0
11	0
12	50*

*Nota: La FMH 12 se realizó por duplicado debido a que presentaba infección en algunos preparados.

4.2- 4 Análisis de la información

4.2- 4.1 Estimación de parámetros genéticos

A continuación se presentan los componentes de la variancia (variancia fenotípica, variancia genotípica, variancia ambiental) y heredabilidad en sentido estricto (h^2). Para todas las variables estudiadas la variancia ambiental fue superior a la variancia genética (Cuadro 23).

Cuadro 23. Variancia fenotípica (σ^2f), variancia genética (σ^2g), variancia ambiental (σ^2e) y heredabilidad en sentido estricto (h^2) de los caracteres.

Carácter	σ^2e	σ^2g	σ^2f	h^2
Alt1	6,93	2,24	9,17	0,56
Dia1	32,18	2,03	34,21	0,20
Nma1	8128,83	860,25	14277,86	0,31
Psec1	0,81	0,01	0,82	0,02
Alt2	24,36	12,19	36,55	0,66
Dia2	81,07	35,50	116,57	0,63
Nma2	816402,60	7881,89	984718,83	0,08
Alt3	22,50	4,29	26,80	0,43
Dia3	69,54	14,31	83,85	0,45
Altr	59,38	20,31	79,69	0,57
Lhb	1,90	0,88	2,78	0,64
Nesp	761,98	269,60	1031,58	0,58
Neesp	6,43	0,47	6,90	0,22
Pmil	0,02	0,01	0,03	0,66

Nota: Abreviaturas ver cuadro 5.

Las estimaciones de h^2 oscilaron entre 0,024 (psec1) y 0,66 (alt2 y pmil). Las variables Pmil, Nesp, Lhb, Altr, Dia2, Alt2 y Alt1 presentaron una alta heredabilidad. Las variables Dia3, Alt3 y Nma1 presentaron una heredabilidad media. Por último las variables Neesp, Nma2, Psec1 y Dial1 presentaron una heredabilidad baja.

4.2- 4.2 Correlaciones fenotípicas

En el análisis general se observó algunas correlaciones fenotípicas significativas (Cuadro 24).

- en cuanto a la producción de materia seca, Psec1 presentó una correlación positiva con Vigor ($r=0,70$; $p<0,0001$), con Dia1 ($r=0,87$; $p<0,0001$), Alt1 ($r=0,81$; $p<0,0001$), Dia2 ($r=0,66$; $p<0,0001$), Alt2 ($r=0,62$; $p<0,0001$), Psec2 ($r=0,79$; $p<0,0001$), Psac ($r=0,86$; $p<0,0001$).

Psec2 tuvo una correlación positiva y significativa tanto con Dia1 ($r=0,79$; $p<0,001$), Alt1 ($r=0,71$; $p<0,001$), Dia2 ($r=0,72$; $p<0,001$), Alt2 ($r=0,72$; $p<0,001$), Psac ($r=0,98$; $p<0,001$). Por último el Psac presentó una correlación positiva y significativa con Vigor ($r=0,6$; $p<0,0001$), Dia1 ($r=0,85$; $p<0,0001$), Alt1 ($r=0,76$; $p<0,0001$), Dia2 ($r=0,71$; $p<0,0001$) y Alt2 ($r=0,7$; $p<0,0001$).

- Psem presentó una correlación positiva y significativa con Psac ($r=0,53$; $p<0,0001$) y Nesp ($r=0,56$; $p<0,0001$).
- Nma1 presentó una correlación positiva y significativa con el Psec1 ($r=0,65$; $p<0,001$) y Vigor ($r=0,66$; $p<0,001$).
- Pmil solo presentó correlación significativa y negativa con Alt3 ($r=-0,33$; $p<0,05$).
- Nesp tiene una correlación significativa y positiva con el Psem ($r=0,56$; $p<0,001$) y Psac ($r=0,45$; $p<0,001$).
- Neesp tiene una correlación significativa y positiva con el Nma1 ($r=0,36$; $p<0,05$), Psec1 ($r=0,35$; $p<0,0001$), Psem ($r=0,42$; $p<0,005$) y Psac ($r=0,30$; $p<0,05$).
- La fecha de floración no se relacionó significativamente con ninguna de las otras variables.

Cuadro 24. Coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia. Sobre la diagonal se encuentran las probabilidades estadísticas; bajo la diagonal se encuentran los valores de correlación entre variables.

	Vig	Dia1	Alt1	Dia2	Alt2	Psec1	Alt3	Dia3	Psec2	Psac
Vig	1,00					<0,001				
Dia1		1,00	0,00	<0,001		0,00			<0,001	0,00
Alt1		0,88	1,00	<0,001	<0,001	<0,001			<0,001	<0,001
Dia2		0,74	0,75	1,00	0,00				<0,001	<0,001
Alt2			0,73	0,94	1,00				<0,001	<0,001
Psec1	0,70	0,87	0,81			1,00			<0,001	0,00
Alt3							1,00			
Dia3							0,94	1,00		
Psec2		0,79	0,71	0,72	0,72	0,79			1,00	
Psac		0,85	0,76	0,71	0,70	0,86			0,98	1,00

Nota: solo se muestran las correlaciones mayores a 0,70 y con $p<0,01$. Abreviaturas cuadro 5. (Cuadro completo de correlaciones en anexo 5)

4.2- 4.3 Análisis multivariados

Se realizó el análisis de componentes principales con el objeto de resumir y agrupar toda la información previamente analizada. Se consideraron 12 variables: vigor, diámetro 1, altura 1, diámetro 2, diámetro 3, número de macollos 2, largo hoja bandera, altura planta reproductiva, número de espigas, peso de semillas, peso de mil semillas y peso seco acumulado.

El 64% de la variabilidad entre las 12 FMH es explicada por dos autovalores, y el 75% por tres autovalores (Cuadro 25). La figura 10 muestra la distribución de las familias a través de las componentes 1 y 2. La componente principal 1 (Prin1) (figura 10) explica el 38,8% de la variación y la segunda componente explica el 25,6% de la variación. Con respecto a la componente principal 1 la variable que explicó mayoritariamente su variabilidad fueron Alt1 y Dia2 (cuadro 26). Las FMH8, FMH9 y FMH10 fueron las que presentaron mayor Alt1 y Dia2. Al tomar la componente principal 2 (Prin2) (figura 10) se observa que la variable Lhb explica la mayor variabilidad (Cuadro 26). Las FMH2 y FMH5 presentaron mayor Lhb (coeficiente de correlación cofenética: 0,93).

Cuadro 25. Autovalores de la matriz de correlación, proporción que explica cada autovalor y proporción acumulada.

Lambda	Valor	Proporción	Prop. Acumulada
1	4,65	0,39	0,39
2	3,07	0,26	0,64
3	1,32	0,11	0,75
4	1,10	0,09	0,85
5	0,89	0,07	0,92
6	0,50	0,04	0,96
7	0,31	0,03	0,99
8	0,8	0,01	0,99
9	0,3	2,9E-03	1,00
10	0,3	2,2E-03	1,00
11	1,8E-03	1,5E-04	1,00
12	0,00	0,0	1,00

Cuadro 26. Autovectores (e) correspondientes a la CP1 (e1) y a la CP2 (e2) para las variables analizadas.

variables	e1	e2
Vigor	0,26	-0,37
Dia1	0,36	-0,28
Alt1	0,40	-0,20
Dia2	0,42	0,06
Dia3	0,26	0,36
Nma2	-0,30	-0,30
Lhb	-3,4E-03	0,39
Altr	0,35	0,24
Nesp	-0,26	-0,31
Pmil	0,04	-0,27
Psem	-0,07	-0,21
Psac	0.32	-0,31

Además se realizó el análisis jerarquizado mediante el método Ward. Al tomar la distancia arbitraria del 50% de la distancia total se observó la formación de 4 grupos (figura 11):

- FMH 3, FMH 4, FMH 7 y FMH 12;
- FMH 5 y FMH 2;
- FMH 8;
- FMH1, FMH 6, FMH 9, FMH10 y FMH 11.

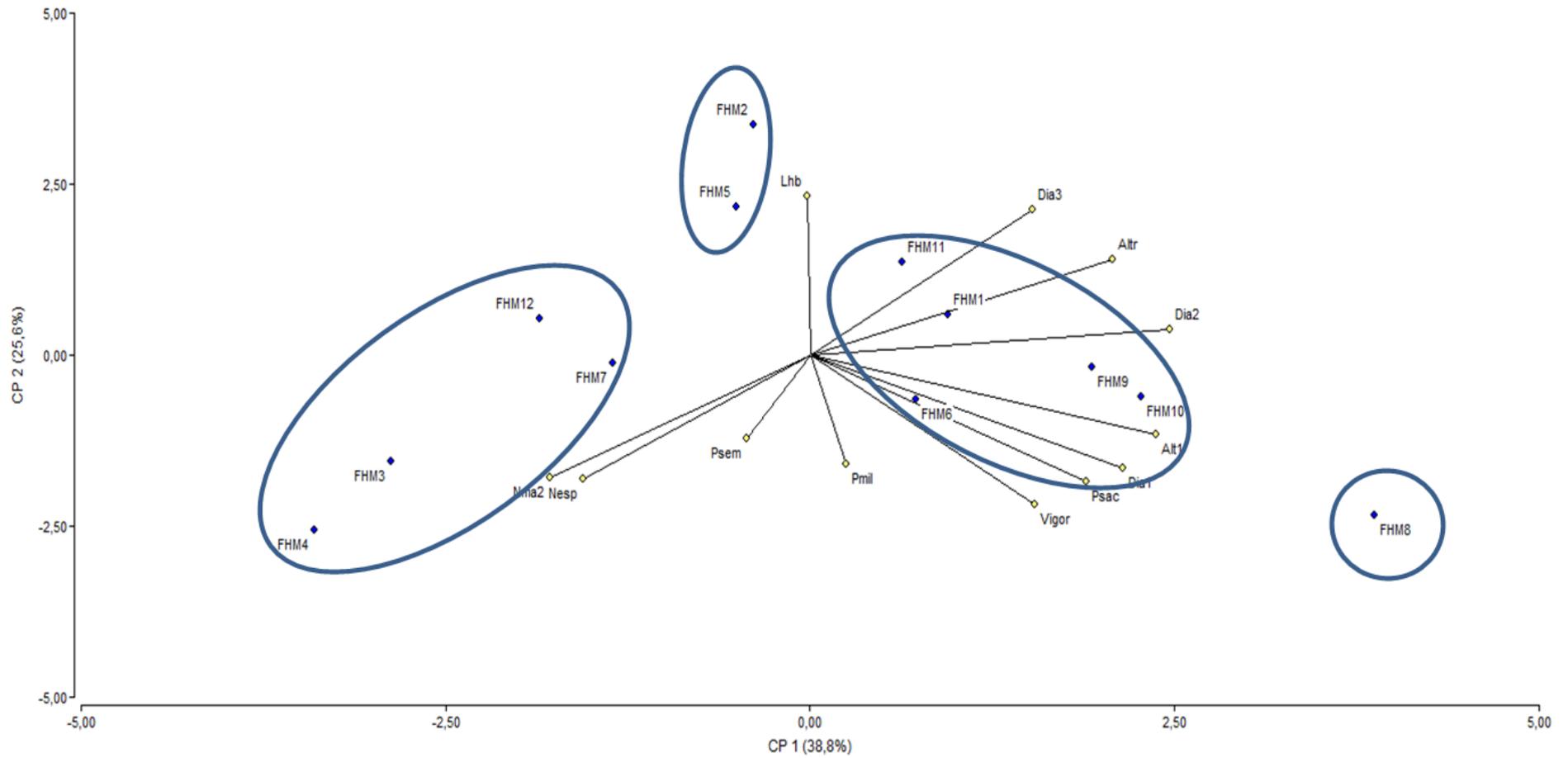


Figura 10. Análisis de componentes principales (Prin1, Prin2), con 12 variables y 12 familias de medio hermanos en estudio.

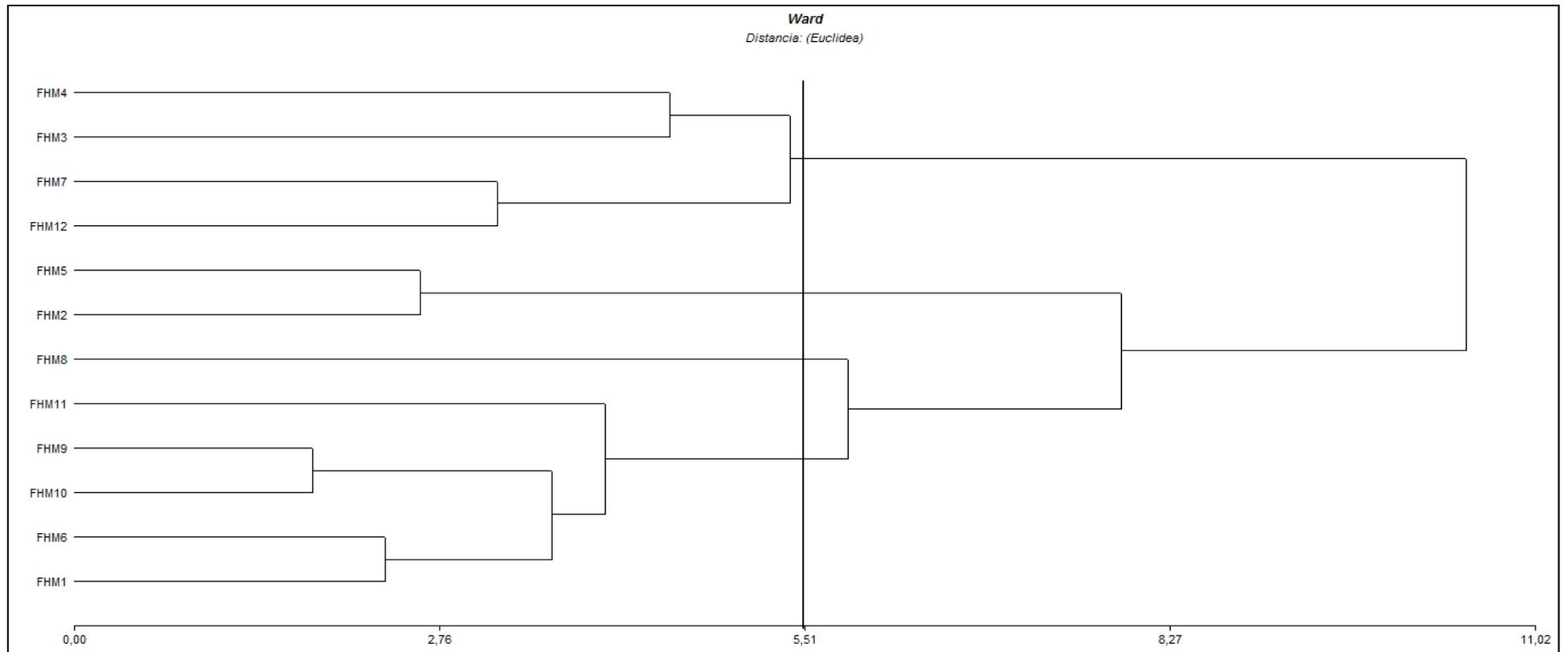


Figura 11. Análisis de cluster mediante el método de Ward para las 12 familias de medio hermanos en estudio.

5. DISCUSIÓN

5.1 Caracterización molecular

La primer parte del estudio se enfocó en caracterizar molecularmente a las seis poblaciones que dieron origen a las 12 FMH. De los nueve SSR propuestos se logró caracterizar a las poblaciones con cinco SSR (H06, D09, A03, LM16 y LM26).

5.1-1 Cuantificación de la variabilidad genética

El número de alelos efectivos indica el tamaño de una población ideal en la cual dada las frecuencias alélicas existentes todos los individuos son totalmente diferenciados (Peakall y Smouse, 2006). El mayor número de alelos efectivos promedio fue de la Pobl1 (2,292). Esto determina que con el estudio de sólo tres individuos se logra detectar las diferencias alélicas (cuadro 9). Este resultado es coincidente con Acuña (2009), aunque en otras especies tales como el maíz, los valores pueden ser superiores (Barcaccia *et al.*, 2003).

Según Labate *et al.*, (2003) habría una tendencia a la endogamia dentro de las poblaciones cuando la heterocigosidad observada (H_0) es inferior a la heterocigosidad esperada (H_e). En este caso las Pobl10, Pobl11 y Pobl29*30 presentaron un valor de H_0 inferior a la H_e (cuadro 9), lo que no estaría sucediendo en las demás poblaciones. Así mismo, Acuña (2009) encontró que 87% de las poblaciones estudiadas presentaron un valor H_0 inferior a H_e . La mayor diferencia entre los estimadores H_0 - H_e fue encontrada en la Pobl10 (H_0 : 0,267; H_e : 0,430). Aunque en poblaciones de la misma especie se encontraron diferencias mayores entre los mismos (Acuña, 2009), en *Lolium perenne* se detectaron diferencias aún más grandes. Así también, se observaron menores diferencias en *Lolium rigidum* (Oliveira y López, 1999).

La estructura poblacional puede estudiarse mediante los estadísticos F de Wright. A través de ellos se puede decir que el SSR D09 fue el que menor valor de F_{IS} obtuvo (-0,223), lo que deja a la vista un exceso de heterocigotos (cuadro 12). Por otro lado Acuña (2009) al estudiar sus poblaciones obtuvo un valor de F_{IS} levemente por debajo de cero (-0,045), detectando valores similares entre los heterocigotos observados y los esperados. Por otro lado y de manera opuesta el SSR LM16 presentó un F_{IS} de 0,235, dando evidencia de un déficit de heterocigotos (Warren *et al.*, 1998; Oliveira y López, 1999). Es importante tener en cuenta que uno de los principales factores a la hora de determinar la estructuración poblacional es el sistema reproductivo (Loveless y Hamrick, 1984).

El mayor nivel de consanguinidad se observó en el SSR LM16 (F_{it} : 0,292), lo que estaría revelando una disminución en el número de heterocigotos en la población (cuadro 12) para ese locus, concordando con el valor de F_{IS} observado anteriormente. Para el SSR D09 tanto los valores de F_{IS} como F_{it} fueron negativos indicando un exceso de heterocigotos. Acuña (2009) de manera contraria detectó para este SSR, que la población estaría en equilibrio. El SSR LM26 obtuvo valores de F_{IS} y F_{it} cercanos a cero, por lo que se podría llegar a inferir que la población estaría en equilibrio, al menos para ese locus. Al observar el valor F_{IS} promedio (0,017) se puede decir que las poblaciones se encuentran cercanas al equilibrio, lo que ya fue reportado en la especie por otros autores (Hayward y Mc Adam, 1977, Oliveira *et al.*, 1997; Oliveira y López, 1999). Mientras que si observamos el valor de F_{st} (0,099), se puede decir que existe escasa variación entre las poblaciones (9,9%). Valores similares a estos se encontraron en poblaciones y cultivares de *Lolium* (Oliveira y López, 1999; Kubik *et al.*, 2001; Acuña, 2009).

Cuando se consideró la proporción de diversidad entre poblaciones con relación a la diversidad total, que se expresa como $F_{st}/(1-F_{st})$ (Nei, 1977), se encontró que el 11% de la diversidad genética total fue debido a la variación entre las poblaciones, mientras que el 89% restante fue por la variación dentro de ellas. El elevado valor de N_m promedio (2,927) coincide con el resultado anterior indicando un predominio del flujo génico por sobre la posible deriva génica producida por el muestreo poblacional. Barcaccia *et al.*, (2003) sugieren que un valor mayor a 1 de N_m indicaría baja diferenciación entre poblaciones; Acuña (2009) obtuvo resultados similares.

5.1-2 Comportamiento de los SSR

El 60% de los SSR utilizados para el análisis presentaron alelos raros ($p_i \leq 0,05$) (cuadro 11). En ningún caso se encontraron alelos privativos, contrariamente a lo observado por Acuña (2009). En total se encontraron 22 alelos para todos los SSR (cuadro 11) de los cuales el 27,27% estuvieron presentes en todas las poblaciones (cuadro 11). Todos los SSR fueron polimórficos (cuadro 10), contrariamente a lo demostrado por Jones *et al.*, (2001) que encontró que los SSR D09 y A03 eran monomórficos. Acuña (2009) encontró la misma cantidad de alelos para el SSR D09 y tres alelos más para el SSR A03 que en este trabajo (cuadro 11). Con respecto al SSR H06 se determinó la presencia de ocho alelos mientras que otros autores (Jones *et al.*, 2001 y Acuña, 2009) encontraron cantidades menores (cuatro) y mayores (nueve), respectivamente. En cuanto al SSR LM26, se encontró 4 alelos (cuadro 11), mientras que Studer *et al.*, (2006) encontraron que el número se duplicaba, y triplicaban para este mismo SSR. Con respecto al tamaño en pares de bases (pb) hubo coincidencia con los reportados anteriormente por Jones *et al.*, (2001) y Studer *et al.*, (2006).

Las frecuencias alélicas mayores ($p_i \geq 0,8$) se presentaron en la Pob1 con el SSR LM16 (alelo 2) y LM26 (alelo 3). En la Pob9 con el SSR D09 (alelo 2), en la Pob10 con

el SSR LM16 (alelo 2). Algo muy interesante es que las Pob10 y Pob11 fueron monomórficas para el SSR LM26 (cuadro 11). Estas elevadas frecuencias alélicas indican una posible fijación de los alelos en las poblaciones.

5.1-3 Distancias genéticas de Nei

La medida de distancia de Nei fue desarrollada para estimar el número de codones diferentes por locus para proteínas y la divergencia en el tiempo entre dos especies muy emparentadas sobre el supuesto de neutralidad para la selección (Balzarini *et al.*, 2010). En este estudio se detectó una distancia promedio entre pares de poblaciones igual a 0,131. Las poblaciones más similares fueron la Pob1 con la Pob25*26 (0,082), la Pob9 con la Pob11 (0,082) y la Pob10 con la Pob11 (0,082). Por el contrario, las poblaciones más diferenciadas fueron Pob11 y Pob29*30 (cuadro 14) (Nei, 1973, 1977). Oliveira y Charmet (1988) encontraron una distancia de Nei promedio menor (0,057) en poblaciones de *Lolium prene*.

5.1-4 Análisis de la variancia molecular

Se sabe que las especies forrajeras alógamas, como el raigrás anual, presentan una elevada variabilidad a nivel molecular (Huff, 1997; Forster *et al.*, 2001). El Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA) mostró diferencias significativas entre las poblaciones ($P=0,001$) (cuadro 15). De la variación encontrada, el 85% correspondió a la variabilidad dentro de las poblaciones, mientras que el 15% restante correspondió a la variación entre poblaciones (cuadro 15). Este resultado está fuertemente apoyado por los datos obtenidos por otros autores (Peter-Schmid *et al.*, 2008; Acuña, 2009). Y se condice con la variabilidad genética estudiada a nivel morfo-fisiológico, encontrado en numerosos estudios que abordaron la temática en la especie (Andrés *et al.*, 2006).

Cuando se comparan las poblaciones de a pares y se tiene en cuenta la significancia estadística (PhiPT) (cuadro 16), se observa que las Pob10 y Pob11 son las más similares (0,077), y las Pob11 y Pob29*30 son las que más difieren (0,279). Este resultado es similar al obtenido mediante las distancias genéticas de Nei (cuadro 16), pero este análisis avala esas distancias a través de la significancia estadística (cuadro 16). Para la distancia observada entre las poblaciones Pob1 y Pob10, no se observaron diferencias significativas, siendo el valor de menor distancia presentado (0,071).

5.1-5 Análisis multivariados

Para poder resumir toda la información analizada se realizaron Análisis de Coordinadas Principales (ACoorP) y de Clústers (AC). El ACoorP explicó el 84% de la variabilidad encontrada con 2 componentes (figura 7), un valor muy elevado en comparación a Acuña (2009) que con dos componentes explicó el 49,7% de variabilidad. El AC permitió formar 3 grupos tomando la distancia del 50%. La Pob29*30 quedó aislada de las demás, mientras que hubo un grupo formado por tres poblaciones (9, 10 y 25*26) y otro formado por 2 poblaciones (1 y 11) (figura 8). Contrariamente a lo observado por Acuña (2009) quien logró discriminar el 70% de las poblaciones a través de 4 SSR, en el presente estudio se logró discriminar el 100% de las poblaciones con 5 SSR (figura 7).

5.2.1 Caracterización agronómica

La segunda parte del estudio se enfocó en caracterizar morfo-fisiológicamente las 12 FMH que fueron derivadas de las seis poblaciones evaluadas en el suelo sódico.

5.2.2 Cuantificación de la variabilidad genética

La existencia de variabilidad genética en caracteres productivos es necesaria para el mejoramiento genético de cualquier especie forrajera. Esto permite la selección

y generación de nuevos cultivares (Ceccarelli, 2015). Las forrajeras alógamas, entre las que se encuentra *Lolium multiflorum*, presentan variabilidad genética alta entre y dentro de poblaciones (Tyler *et al.*, 1987; Schultze-Kraft, 1990, Andrés, 2006) debido predominantemente al sistema reproductivo.

En términos generales para la mayoría los caracteres analizados tanto vegetativos como reproductivos existió variabilidad genética significativa entre las FMH (cuadro 18 y cuadro 20), y esto coincide con trabajos anteriores en la especie (Edwards y Emara, 1970; Rhodes, 1973; Alonso, 1991; Andrés y Bertín, 1998; Andrés, 1999; Andrés *et al.*, 2000; De Battista *et al.*, 2001; Rosso y Andrés, 2001; Rosso, 2002; Castro *et al.*, 2003; Giammaría, 2003; Alonso, 2004; Castaño *et al.*, 2004; Andrés *et al.*, 2005, Monteverde y De Battista, 2008; Acuña, 2009; Álvarez, 2010).

5.2- 1 Caracteres Vegetativos

Color de hoja

El color de hoja está determinado por el contenido de clorofila en el mesófilo y el grosor de la cutícula (Black, 1975; Esau, 1987), características relacionadas con la actividad fotosintética y la tolerancia a condiciones de estrés en diversas especies vegetales (Fahn, 1982). En este estudio la mayor proporción de plantas (63%) presentaron un color intermedio. Igualmente, Giammaria (2003) detectó que el 92% de las plantas presentaron un color verde brillante (intermedio).

Vigor de planta

El vigor inicial es un carácter importante debido a que determina indirectamente la velocidad de crecimiento de las plántulas, por lo tanto es un factor relevante en la competencia con otras plantas y en la implantación de una pastura y está asociado a la acumulación de materia seca posterior. Estudios anteriores han demostrado que existe

una importante variabilidad genética para este carácter tanto entre poblaciones naturalizadas (Rosso y Andrés, 2001) como entre cultivares comerciales (Andrés *et al.*, 2000; Giammaria, 2003). Entre las FMH estudiadas, la mayor proporción de plantas obtuvo un vigor inicial intermedio y bueno. La FMH 3 fue la que presentó mayor vigor inicial.

Hábito de crecimiento

En plantas forrajeras la estructura del canopeo está determinada por el hábito de crecimiento y por la disposición de las hojas, y condiciona el manejo de las pasturas (Pearson e Ison, 1994). La intensidad de pastoreo, frecuencia de defoliación y competencia (Snaydon, 1978) afectan al hábito de crecimiento. Los genotipos con hábito de crecimiento postrado sobreviven mejor que los de tipo erecto en sistemas con defoliaciones continuas y frecuentes (Davies, 1960; Smeatham, 1972; Seaney, 1974), aunque no sean los de mayor productividad (Cooper y McColl, 1966; Rhodes, 1971). En el caso de *L. multiflorum* este carácter se relacionaría con la capacidad de evitar el consumo de estructuras reproductivas favoreciendo la producción de semillas bajo pastoreo, de la cual dependen las poblaciones para su perpetuación, mientras que los cultivares comerciales son multiplicados en sistemas agrícolas. En este estudio se encontró que el 60% de las plantas presentaron hábito semipostrado. Estos resultados son coincidentes con los detectados por otros autores en poblaciones naturalizadas (Alonso, 1991; Rosso, 2002), en los que expresan que la mayoría de las poblaciones naturalizadas argentinas de raigrás anual diploide tienen este tipo de crecimiento en estado vegetativo.

Número de macollos vegetativos

El número de macollos vegetativos y el peso de los macollos son los principales determinantes el rendimiento de forraje en una pastura (Jewis, 1972; Zarrouh, 1983).

Rashal y Kholms (1983) sostienen que el número de macollos podría utilizarse como carácter para la selección indirecta del rendimiento de materia seca siendo éste un carácter confiable. En este estudio se detectó diferencias significativas entre las FMH para las dos mediciones realizadas (Nma1 y Nma2). Estudios anteriores encontraron resultados similares (Hume, 1991; Castro *et al.*, 2003; Alvarez, 2010). Contrariamente, Acuña (2009) no encontró diferencias significativas entre las poblaciones en estudio.

Se encontró que Nma1 presentaba una heredabilidad media ($h^2=0,31$) y Nma2 una heredabilidad baja ($h^2=0,08$). Otros estudios encontraron resultados similares tanto en FMH de cultivares tetraploides (Giammaría, 2003), como en poblaciones naturalizadas (Alonso, 1991; Acuña, 2009). Álvarez (2010) encontró que la heredabilidad para el carácter era alta ($h^2>0,69$) en dos grupos de floración (temprana-tardía) en FMH.

Diámetro de planta

El diámetro de planta en especies forrajeras es una variable a considerar en los programas de mejoramiento. En este trabajo se detectó diferencias significativas en las tres mediciones realizadas (Dia1, Dia2 y Dia3) (cuadro 18). La heredabilidad para este carácter fue baja (0,20) para Dia1, intermedia para Dia3 (0,45) y alta para Dia2 (0,63). Álvarez (2010) detecto una heredabilidad alta (h^2 : 0,61 tempranas; h^2 : 0,65 tardías) para las FMH evaluadas.

Altura de planta

La altura de la planta, es un carácter muy utilizado en los descriptores de cultivares de especies gramíneas ya que es un indicador indirecto de la cantidad de materia seca producida. Esta variable puede ser modificada a través del manejo de la pastura, de la fertilización y de la competencia con otras especies (Snaydon, 1978). En

este estudio se encontraron diferencias significativas para el carácter en las tres mediciones realizadas (Alt1, Alt2 y Alt3) (cuadro 18) contrariamente a lo expresado por Acuña (2009) en sus poblaciones de estudio. Se detectaron heredabilidades altas para Alt1 y Alt2 ($h^2=0,56$ y $h^2=0,66$ respectivamente), mientras que para Alt3 la heredabilidad fue intermedia (0,43).

Peso seco

La producción de materia seca es una de las variables de mayor valor en los programas de selección de especies forrajeras y está fuertemente afectada por las condiciones ambientales debido a que es un carácter poligénico. El peso de materia seca es el principal índice de productividad en raigrás anual (Rashal y kholms, 1983). El raigrás anual diploide tiene un ciclo de producción de forraje otoño-inverno-primaveral, y contribuye a mejorar la oferta invernal de forraje de calidad (Fernández *et al.*, 2003).

En este estudio se encontró diferencias significativas entre las FMH en solo una de las mediciones realizadas (Psec1) (cuadro 18). Las FMH 1, 4, 6, 8 y 10 presentaron valores superiores a la media general. La h^2 para Psec1 fue baja (0,02) con respecto a lo encontrado por otros autores (England, 1975; Bugge, 1984; De Battista *et al.*, 2001; Giammaría, 2003; Álvarez, 2010). Se debe tener en cuenta que el carácter es de tipo poligénico y altamente influenciado por el ambiente. De Battista *et al.*, (2001) estimó la heredabilidad en sentido estricto y detectó una alta influencia ambiental.

5.2- 2 Caracteres Reproductivos

Altura de planta reproductiva

La altura de planta es una variable muy afectada por el ambiente, en suelos de buena fertilidad, sin restricciones hídricas y sin competencia, las plantas expresan su máximo potencial genético (Guillet, 1984). En este trabajo se encontraron diferencias

significativas entre las FMH estudiadas (cuadro 20) y se detectó una alta heredabilidad en sentido estricto (0,57) (cuadro 23).

Fecha de floración

La fecha de floración está determinada por el fotoperíodo, la temperatura y las precipitaciones (Rhebergen, 1985; Ernst, 1987) y en raigrás anual además por el manejo de la defoliación (Bendersky, 2009). La uniformidad en la fecha de floración constituye un requisito indispensable para lograr cultivares con características uniformes (Fehr, 1987) y es uno de los factores de mayor importancia para la obtención de altos rendimientos de semilla debido a que los materiales más tardíos tienden a presentar una menor producción de semilla (Studer *et al.*, 2008). Un retraso en la fecha de floración podría mantener por un período de tiempo mayor un alto valor nutritivo, alto valor de digestibilidad y alto valor de palatabilidad de forraje (McLean y Watson, 1992). El desarrollo de materiales de raigrás con distintas fechas de floración es habitual en los programas de mejoramiento de esta especie. Por otro lado, el desarrollo de materiales tempranos tendría utilidad para la utilización del raigrás como cultivo de cobertura en rotaciones agrícolas. En el presente estudio no se detectó variabilidad significativa entre las FMH (cuadro 20). Aunque si una tendencia, donde las FMH5 y FMH9 fueron las más tempranas y la FMH11 la más tardía. A pesar de esto, varios autores indicaron la posibilidad de obtener sintéticas bien definidas por fecha de floración, mediante la aplicación de selección sobre este carácter (Acuña *et al.*, 2009; Ré *et al.*, 2009; Álvarez, 2010).

Número de espigas

En la mayoría de las especies forrajeras el número de macollos reproductivos y la cantidad de macollos vegetativos están altamente correlacionadas (Smith *et al.*, 1994), y el primero es uno de componentes más importante del rendimiento de semilla

en forrajeras templadas (Ceron, 1993; Barufaldi 1999; Guillén, 2002) y en raigrás anual (Beltramino *et al.*, 2005). Elgersma *et al.*, (1989) sostienen que en determinados cultivares de raigrás anual el número de inflorescencias podría ser un factor limitante para obtener altos rendimientos de semilla, mientras que Bugge (1984) encontró que el número de espigas es el componente de rendimiento más afectado por el ambiente en raigrás anual.

En este estudio se encontró diferencias significativas para el carácter entre las FMH (cuadro 20). El valor de heredabilidad encontrado fue alto (0,58) en comparación con el reportado por Gramaría (2003). Álvarez (2010) detectó heredabilidades en promedio similares (0,66 tempranas; 0,46 tardías) para dos grupos de floración en FMH.

Número de espiguillas por espiga

Lamarck (1778) describió a *Lolium multiflorum* por su elevado número de flores en cada espiguilla. Según Inda Aramendía (2005) se caracteriza por tener espiguillas de 11 a 22 flores. El carácter número de espiguillas por espiga resulta ser uno de los caracteres que más discriminan poblaciones de *Lolium multiflorum* (Casañas *et al.*, 1980). En este estudio se detectaron diferencias significativas entre las FMH para dicho carácter, y el promedio fue de 23,41 espiguillas por espigas. El valor promedio es similar al máximo número con el cual Lamarck (1778) describe a la especie. Se detectó una heredabilidad baja (0,22) para dicho carácter.

Largo de hoja bandera

Uno de los factores que controlan la producción de materia seca en las gramíneas forrajeras es el área foliar, la cual está definida por el tamaño y número de hojas (determinado principalmente por el ancho y largo de las láminas foliares) (Borrajo

et al., 2000). El área foliar determina en definitiva la utilización de la energía lumínica (Sugiyama *et al.*, 1985).

En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en cuanto a largo de hoja bandera y su heredabilidad fue baja (0,64) en relación a las encontrada por Álvarez (2010) para dos grupos de floración en FMH (0,87 tempranas; 0,78 tardías).

Peso total de semillas

Uno de los caracteres más importantes para los programas de mejoramiento de especies forrajeras es el peso total de semillas ya que es indicativo del éxito en la difusión del nuevo cultivar, dado que la forma de comercialización de los mismos es a través de ellas. Este carácter está directamente asociado al rendimiento de semillas, es altamente dependiente del ambiente y ha sido muy bien estudiado (Bugge, 1984; Elgersma *et al.*, 1989; Bertín, 2004). El rendimiento de semillas está determinado entre otros factores por un elevado número de espigas y de inflorescencias (Elgesma *et al.*, 1989). No se detectó diferencias significativas en el carácter, pero se encontró que la FMH9 fue la que presentó mayor peso total de semillas., Alvarez (2010) detectó diferencias para el carácter entre dos grupos de floración en FMH y valores de heredabilidad intermedia (0,54 tempranas; 0,53 tardías).

Peso de mil semillas

El peso de mil semillas es otro de los componentes importante para la determinación del rendimiento en semilla. En algunas especies la asociación entre el peso de mil semillas y el vigor inicial de las plántulas y su sobrevivencia es positiva (Twamley, 1967, 1974; Raja y Bean, 1979; Schaal y Smith, 1980). Varía según la especie y entre cultivares dentro de la misma especie. Sin embargo no siempre esta

relación es directa, ya que en algunos casos no se relaciona con una germinación diferencial (Andrés y Guillen, 2001).

En el presente estudio se encontró diferencias significativas entre las FMH. Bertín (2004) también encontró variabilidad en el peso de mil semillas en cultivares y sintéticas experimentales de raigrás anual. En general los cultivares de raigrás anual diploides logran menor peso de mil semillas que los tetraploides, y escasamente superan los 2 gramos.

El valor de heredabilidad encontrado es alto (0,66) y similar al encontrado por Álvarez (2010) para el grupo de floración temprana. Estos resultados también coinciden con los realizados en FMH de raigrás anual diploide (Acuña *et al.*, 2009) y en FMH de cultivares de raigrás anual tetraploide (Giammaría, 2003).

5.2- 3 Determinación de endófito en semilla

Las poblaciones naturalizadas en la pampa húmeda y subhúmeda presentan en su mayoría una alta incidencia y nivel de infección endofítica (Medvescigh *et al.*, 2004, Colabelli *et al.*, 2007 y Gundel *et al.*, 2008). En este estudio se encontró que el 75 % de las FMH estuvieron libres de *Neotyphodium occultans*. Se sabe que este porcentaje de infección está por debajo de lo esperado, aunque Monteverde (2009) reportó resultados similares a estos. Una posible causa podría relacionarse con la manipulación y conservación de las semillas ya que la viabilidad del hongo disminuye con la edad de la semilla en forma mucho más pronunciada que el poder germinativo (De Battista, 2002).

Diversos estudios han mostrado que la asociación *Neotyphodium*/gramíneas modifica la adaptación y el crecimiento de hospedante (Malinowski *et al.*, 2005). Las plantas infectadas obtuvieron valores mayores al promedio en las variables peso seco acumulado y peso de mil semillas.

5.2- 4 Correlaciones fenotípicas

El grado de asociación entre dos caracteres es un procedimiento utilizado comúnmente en los programas de mejoramiento genético de plantas (Lande y Price, 1989) debido a que en general los objetivos del mejoramiento abarcan más de un carácter en forma simultánea, haciéndose imprescindible el conocimiento de cómo se correlacionan los mismos. La asociación puede explicarse tanto por efectos genéticos como por efectos ambientales o por ambos. El ambiente puede aumentar o disminuir los causales genéticos de la correlación (Mariotti, 1986).

En este estudio solo se discuten las correlaciones fenotípicas mayores a 0,7 y significativas ($p < 0,05$). Desde el punto de vista del mejoramiento genético del rendimiento de forraje, las asociaciones de mayor importancia son las encontradas entre los caracteres peso seco 1 que se correlacionó fuertemente con peso seco 2 y peso seco acumulado, lo cual es esperado.

Cabe destacar que el vigor inicial de planta se correlacionó significativamente con el peso seco 1, lo que también fue observado por Monteverde (2009) en el estudio de poblaciones y cultivares. Esto puede facilitar las mediciones de biomasa de planta, debido a que estas son costosas, laboriosas y destructivas, siendo de mucha utilidad la realización de selección indirecta por caracteres de más fácil medición y menor costo. Se detectó también que en todos los casos diámetro y altura estaban correlacionadas altamente entre sí.

Algo muy interesante fue que diámetro 1 estaba altamente correlacionado con el peso seco 1, peso seco 2 y peso seco acumulado, por lo que podría tomarse como un buen indicador de producción de forraje.

En cuanto a los caracteres de producción de semillas se observó que peso de semillas presentó una correlación positiva y significativa con peso seco acumulado ($r=0,53$) y Número de espigas ($r=0,56$). Esta última correlación está fuertemente apoyada por estudios realizados con anterioridad en diversas especies forrajeras (Ceron, 1993; Barufaldi, 1999; Guillen, 2002). Por otro lado, peso de semillas se correlacionó con la variable número de espiguillas por espiga (0,42). Debido a que la variable número de espigas presentó una heredabilidad alta se podría realizar selección para este carácter y así aumentar el peso total de semillas producidas.

5.2- 5 Análisis multivariados

En este análisis se tomaron 12 variables de las 21 estudiadas, debido a la existencia de correlaciones muy altas ($>0,70$) que no permitían una buena discriminación entre las familias.

El análisis de componentes principales permitió discriminar las 12 FMH. La CP1 explico el 38,8% de la variabilidad y la CP2 un 25,6%. La CP1 estuvo ponderada principalmente por las variables altura 1 y diámetro 2 (cuadro 26), mientras que la CP2 discrimino principalmente por la variable largo de hoja bandera (cuadro 26). De este modo las FMH3, FMH4, FMH7 y FMH12 fueron las que presentaron mayor número de espigas y peso de semillas. Las FMH2 y FMH5 obtuvieron los mayores valores de largo de hoja bandera y tuvieron un comportamiento intermedio con respecto a los caracteres vegetativos. Las FMH 1, 6, 9, 10 y 11 tuvieron mejores comportamientos en cuanto a los caracteres vegetativos. La FMH8 quedo aislada de las demás por su mejor comportamiento en cuanto a los caracteres vegetativos.

En este caso, el peso seco acumulado tiene un peso importante en cuanto a la generación de variabilidad, pero no tanto como las variables altura 1 y diámetro 2,

contrariamente a lo encontrado por Castro *et al.*, (2003) y Álvarez (2010) donde las variables de mayor peso fueron producción de materia seca y producción de semillas.

En el Análisis de clúster se pudo discriminar cuatro grupos de familias que coinciden con los formados en el análisis de componentes principales.

Es interesante destacar que el agrupamiento de las FMH no dependió de la procedencia poblacional de los materiales, corroborando la gran variabilidad intrapoblacional que se observó en los estudios moleculares (Cuadro 15).

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten elaborar las siguientes conclusiones:

✓ La caracterización molecular de las 6 poblaciones analizadas permitió detectar una importante variabilidad genética entre poblaciones y dentro de poblaciones. La mayor diversidad genética se detectó dentro de las poblaciones (85%). Los marcadores utilizados permitieron discriminar el 100% las poblaciones.

✓ La caracterización morfológica de las 12 FMH realizada a campo en condición de planta espaciada, permitió detectar una importante variabilidad genética entre FMH para la mayoría de los caracteres morfo-fisiológicos estudiados.

✓ Los valores obtenidos en la estimación de la heredabilidad en sentido estricto de la mayoría de las variables analizadas, sugiere la existencia de un componente genético heredable importante que permitiría seleccionar esos caracteres y permitiría incorporar algunas familias de medios hermanos al programa de mejoramiento de raigrás anual diploide.

✓ La infección endofítica fue menor a la esperada.

✓ Se detectaron correlaciones fenotípicas elevadas con significancia estadística.

✓ No se observó un patrón de agrupamiento o comportamiento de las FMH en función de la procedencia poblacional de las mismas.

✓ Si el objetivo del programa de selección es la obtención de cultivares superiores en producción de forraje y de semilla, las familias 6, 8, 9 y 10 serían las indicadas por sus elevadas productividades en peso seco y producción de semillas.

7. CONSIDERACIONES FINALES

- ✓ Las 6 poblaciones que dieron origen a las 12FMH (Clico 0), deberían haberse evaluado y caracterizado a campo en las condiciones halomórficas mencionadas en el presente trabajo. Por cuestiones ambientales, principalmente anegamiento, existió una gran mortandad de plantas limitando la realización de los análisis estadísticos necesarios para la caracterización de las mismas.
- ✓ Las FMH evaluadas en este estudio (Ciclo 01) se caracterizaron en condiciones no limitantes, *i.e.* no halomórficas, principalmente para medir el potencial productivo. Sin embargo las FMH seleccionadas en este estudio (Ciclo 02), deberían ser evaluadas en condiciones halomórficas para determinar su comportamiento productivo en este tipo de suelos. También se debería replantear el diseño del ensayo, con un mayor número de plantas por FMH y mayor cantidad de repeticiones, intentando de este modo evitar una posible pérdida sustancial en el número de plantas y así limitar nuevamente los análisis estadísticos.

8. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo Kleinhofs *et al.*, (1993):

1. Colocar material fresco en microtubos de 2 ml y estos dentro de Nitrógeno líquido. Moler las muestras sin que se descongelen con un vástago de punta cónica.
2. Agregar 600µl de buffer de extracción (sin CTAB ni SDS) cuya composición se detalla en la (cuadro 2) a 65°C en cada tubo.
3. Incubar en baño de agua a 65°C durante 10 minutos.
4. Agregar 75µl de SDS y 75µl de CTAB, calientes.
5. Incubar en baño de agua a 65° C, durante 30 minutos.
6. Agregar 750µl de cloroformo.
7. Mezclar suavemente mediante inversiones durante 10 minutos.
8. Centrifugar a 12.000 rpm, durante 30 minutos.
9. Extraer la fase acuosa (\pm 670µl) y colocarlo en un microtubo de 1,5 ml.
10. Agregar un volumen igual de cloroformo.
11. Mezclar suavemente mediante inversiones, durante 10 minutos.
12. Centrifugar a 12.000 rpm, durante 30 minutos.
13. Extraer la fase acuosa y colocarlo en un microtubo de 1,5 ml.
14. Precipitar el ADN con isopropanol frío, agregando un 60% del volumen correspondiente a la fase acuosa. Mezclar suavemente.
15. Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm.
16. Descartar la fase acuosa.

Lavados de pellets:

17. Agregar 1 ml de etanol 70%.
18. Centrifugar.
19. Descartar la fase acuosa y realizar el segundo lavado con etanol al 70%.
20. Centrifugar y descartar la fase acuosa.
21. Dejar secar el pellet hasta evaporación total del etanol al 70%.
22. Resuspender el ADN con 40µl de TE 1X.

Cuadro 1. Composición del buffer de extracción (*agregado después de calentar a 65°C)

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

Anexo 2

Armado de los geles y preparación de los vidrios.

Los vidrios se trataron especialmente con la finalidad de adherir el gel a uno sólo de ellos. Para esto, se trató el vidrio con solución adherente (3µl Bind Silane, 5µl ácido acético glacial 0,5%, 950µl etanol) y la cuba se trató con solución repelente de agua (Rain X®), se colocaron espaciadores entre el vidrio y la cuba, se sujetaron con clamps (sujetadores). Se distribuyó 70ml de la solución fresca de poliacrilamida con 330µl de APS (persulfato de amonio) y 33µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), controlando que no se formen burbujas durante el proceso. Finalmente se colocó el peine con los dientes orientados hacia la parte superior del gel, para marcar el frente. El peine se sujetó con broches. Se dejó polimerizar como mínimo durante dos horas.

Anexo 3

Corrida electroforética.

El gel fue sometido a una pre-corrída en buffer TBE (11% tris base, 6% ácido bórico, 0,6% EDTA 0,5M) de dos concentraciones distintas (0,5X arriba y 1X abajo). Previo a la siembra, se agregó a las muestras amplificadas buffer de carga (200µl EDTA 0,5M, 9,6ml formamida y 300µl colorante-azul bromofenol y xilenocianol) y se desnaturalizó por calentamiento a 94°C durante 5 minutos, enfriando posteriormente a 0°C para evitar la unión de las cadenas. El volumen de siembra fue de 2µl por calle.

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

Anexo 4

Protocolo de tinción con plata para secuenciación de Promega Corp:

1. Colocar el vidrio con el gel en una bandeja de plástico y cubrir con solución fijadora (10% ácido acético glacial). Agitar bien durante 20 minutos o hasta que no queden rastros de colorante.
2. Enjuagar el gel 3 veces durante 2 minutos por vez con agua bidestilada con agitación. Dejar el gel fuera del agua unos segundos escurriéndose antes de transferirlo al próximo paso.

3. Transferir el gel a otra bandeja con la solución de tinción (2 litros agua bidestilada + 2gr nitrato de plata AgNO_3 + 3ml formaldehído 37%) y agitar durante 30 minutos. Sacar el gel de la bandeja y dejarlo escurrir unos segundos.
4. Colocar brevemente (no más de 10 segundos) en una bandeja limpia con agua bidestilada, escurrirlo y colocarlo inmediatamente en la bandeja con solución de revelado fría (1L agua bidestilada, 30g carbonato de sodio (Na_2CO_3), dejarlo enfriar a 10°C e inmediatamente antes de usarlo agregar 1,5ml formaldehído 37% y 200 μl tiosulfato.

Anexo 5

Cuadro 2. Coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia.

	vig	dial	alt1	nma1	dia2	alt2	psec1	alt3	dia3	nma2	lhb	altr	nesp	neesp	pmil	flor	psec2	psem	Psac
vig	1.00	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	ns	ns	0.01	ns	0.05	ns	ns	<0,001	0.02	<0,001
dial	0.62	1.00	0.00	<0,001	<0,001	<0,001	0.00	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,001	<0,001	0.03	ns	ns	<0,001	<0,001	0.00
alt1	0.64	0.88	1.00	0.01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,001	0.02	ns	ns	ns	<0,001	<0,001	<0,001
nma1	0.66	0.49	0.37	1.00	0.04	ns	<0,001	ns	ns	<0,001	ns	ns	0.03	0.01	ns	ns	<0,001	0.02	<0,001
dia2	0.44	0.74	0.75	0.29	1.00	0.00	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,001	ns	ns	ns	ns	<0,001	0.01	<0,001
alt2	0.44	0.68	0.73	0.26	0.94	1.00	<0,001	<0,001	<0,001	ns	0.02	<0,001	ns	ns	ns	ns	<0,001	0.01	<0,001
psec1	0.70	0.87	0.81	0.65	0.66	0.62	1.00	<0,001	<0,001	0.04	ns	<0,001	<0,001	0.01	ns	ns	<0,001	<0,001	0.00
alt3	0.15	0.42	0.47	0.21	0.62	0.65	0.46	1.00	0.00	ns	0.01	<0,001	ns	ns	0.02	ns	<0,001	0.03	<0,001
dia3	0.14	0.42	0.46	0.19	0.65	0.69	0.47	0.94	1.00	ns	0.02	<0,001	ns	ns	ns	ns	<0,001	0.01	<0,001
nma2	0.16	0.16	0.01	0.41	-0.06	-0.10	0.30	0.05	0.09	1.00	ns	ns	ns	0.02	ns	ns	0.02	ns	0.02
lhb	0.01	0.17	0.17	-0.07	0.27	0.34	0.16	0.37	0.33	-0.13	1.00	<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
altr	0.37	0.50	0.56	0.19	0.55	0.58	0.46	0.61	0.58	-0.21	0.50	1.00	ns	0.03	ns	ns	0.02	<0,001	0.01
nesp	0.23	0.45	0.33	0.32	0.18	0.10	0.41	-0.04	-0.02	0.15	0.13	0.01	1.00	0.52	ns	ns	<0,001	<0,001	<0,001
neesp	0.29	0.31	0.24	0.36	0.02	0.08	0.35	0.23	0.21	0.33	0.16	0.32	0.10	1.00	ns	ns	ns	0.003	0.04
pmil	0.20	0.04	0.10	0.04	0.02	0.03	0.01	-0.33	-0.24	0.06	-0.04	0.04	0.11	0.06	1.00	ns	ns	ns	ns
flor	0.10	-0.01	-0.09	0.11	-0.13	-0.11	-0.05	-0.13	-0.11	-0.05	0.09	0.06	-0.08	0.15	-0.02	1.00	ns	ns	ns
psec2	0.55	0.79	0.71	0.51	0.72	0.72	0.79	0.48	0.57	0.33	0.11	0.32	0.44	0.26	0.11	-0.04	1.00	<0,001	0.00
psem	0.32	0.47	0.45	0.33	0.37	0.39	0.47	0.31	0.35	0.16	0.27	0.43	0.56	0.42	0.17	0.09	0.53	1.00	<0,001
psac	0.60	0.85	0.76	0.56	0.71	0.70	0.86	0.48	0.56	0.33	0.11	0.36	0.45	0.30	0.10	-0.01	0.98	0.53	1.00

Nota: sobre la diagonal nivel de significancia, bajo la diagonal Coeficiente de correlación. Ver abreviaturas en cuadro 5.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M.L. y Palacios, N.S., 2012. Caracterización de cuatro poblaciones y dos híbridos de raigrás anual diploide. XIV Reunión Anual sobre Forrajeras. <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/articulos/raigras-salinidad-t4507/p0.htm>
- Acuña, M.L., 2009. Variabilidad genética en poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* Lam. Tesis de Magister en Mejoramiento Genético Vegetal INTA-UNR.
- Alonso, S. 1991. Variabilidad en poblaciones de *Lolium multiflorum* Lam. naturalizadas en los pastizales de la provincia de Buenos Aires. Tesis Ms. Sc. UNMDP, Escuela de Posgrado en Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, pp 32.
- Alonso, S., 2004. Evaluation of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) populations naturalized in the flooding pampa of Argentina: I-Morphological and physiological characters at juvenile stage. *Genetics Resources and Crop Evolution*. 51: 747-758.
- Altuve, S. M., 2003. Evaluación de cultivares de ryegrass en el centro de Corrientes. *GÉNESIS*. 15(48):16-17.
- Álvarez, G.I., 2010. Estimación de parámetros genéticos en familias de medio hermanos de raigrás anual diploide (*Lolium multiflorum* Lam.). Tesis Licenciatura en Genética. Universidad Nacional de Misiones.
- Amigone, M.A. y Kloster, A.M., 1997. Verdeos de invierno. En invernada bovina en zonas mixtas, Agro 2 de Córdoba. Capítulo II: 37-56. INTA, Centro Regional Córdoba, EEA INTA Marco Juárez.
- Andrés, A. 1999b. Comportamiento frente a la roya de la hoja de cultivares comerciales de raigrás anual. *Revista de Tecnología Agropecuaria*. 4,10: 2-6. INTA. EEA Pergamino.
- Andrés, A. 2006. La mejora de la productividad, calidad y persistencia de las pasturas cultivadas a través de la genética. *3º Simposio Nacional de Sistemas Ganaderos en Siembra AAPRESID*.
- Andrés, A. y Bertín, O., 1998. Aspectos productivos y sanitarios de cuatro cultivares tetraploides de raigrás anual. *Revista de Tecnología Agropecuaria*. 3(9):30-32. INTA. EEA Pergamino
- Andrés, A. y Bertín, O., 1999. Interacción genotipo-ambiente en la producción de semilla de pasto ovillo: efecto del riego. *Actas XXIX Congreso argentino de genética. XXXII Congreso de la sociedad de genética de Chile. III Jornadas chileno-argentinas de genética*.
- Andrés, A. y Guillen, R., 2001. Variabilidad en el crecimiento de plántulas de agropiro alargado con diferentes peso de mil semillas. *Journal of basic and Applied Genetics*. *Actas XXX Congreso Argentino de Genética. IV Jornadas Argentino Uruguayas de Genética*. Pp 106-107.
- Andrés, A. y Rosso, B., 2004. Variabilidad genética en poblaciones naturalizadas de raigrás anual diploide. *Revista Argentina de Producción Animal. Actas Congreso de Producción Animal*.

- Andrés, A., Ivancovich, A. y Perez, A. 2000. Selección por resistencia a la roya de la corona (*Puccinia coronata*) de familias de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.). Revista de Tecnología Agropecuaria. 5,15: 54-56. INTA. EEA Pergamino.
- Andrés, A., Rosso, B., De Batista, J. y Acuña, M., 2005. Genetic variability between adapted populations of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Argentina. Molecular breeding for the genetic improvement of forage crops and turf. Proceedings of the 4 international symposium on the molecular breeding of forage and turf, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress, July 2005, Aberystwyth, Wales. pp. 275.
- Andrés, A., Rosso, B., De Battista, J y Acuña, M., 2005. Genetic variability between adapted populations of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) in Argentina. Molecular breeding for the genetic improvement of forage crops and turf. Proceedings of the 4th International symposium on the molecular breeding of forage and turf, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress. Pp:275.
- Andriolo J.H., García, M.V., Acuña. M.L., 2012. Evaluación del rendimiento de semilla en cruzamientos de poblaciones naturalizadas de raigrás anual. Journal of Basic & Applied Genetics. Suppl. Vol XXIII (1). pp: 257
- Aramendía, L., 2005. El género *Lolium*. Claves dicotómicas. Revista. Real Academia de Ciencias. Zaragoza. 60: 143–155.
- Arzadún, M., 2003. Curvas de producción de raigrás anual en Coronel Suárez 2002. GÉNESIS. 15(48):19-21.
- Ashraf, M., 1990. Selection for salt tolerance and its genetics basis in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)
- Ashraf, M., Mcneilly T. y Bradshaw A.D., 1986b. The response of selected salt-tolerant and normal lines of four grass species to NaCl in sand culture. New Phytology 104:453-461.
- Ashraf, M., Mcneilly, T. y Bradshaw, A.D., 1986a. Heritability of sodium chloride tolerance in seven grass species. Euphytica. 35:935-940.
- Ayers, A.D. y Haywar H.E., 1948. A method for measuring the affects of soil salinity and seed germination with observations on several crops plants. Soil SCI. Amer. Proc. 13: 224-226.
- Ayers, A.D., 1950. Seed germination as affected of soil moisture and salinity. Agr. 44:82-84.
- Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I., Di Rienzo, J., 2010. Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen. Encuentro Grupo Editor. Córdoba, Argentina.
- Barcaccia, G., Lucchin, M y Parrini, P., 2003. Characterization of a flint maize (*Zea mays* var *indurata*) Italian landrace, II. Genetic diversity and relatedness assessed by SSR and Inter-SSR molecular markers. Genetics Resources and Crop Evolution. 50: 253-271.
- Bartos, J., Sandve, S.R., Kölliker, R., *et al.*, 2011. Genetic mapping of DArT markers in the Festuca-*Lolium* complex and their use in freezing tolerance association analysis. Theor Appl Genet 122: 1133–1147.

- Barufaldi, M., 1999. Variabilidad genética en poblaciones adaptadas de *Dactylis glomerata* L. Tesis de Maestría. Curso de Posgrado en Mej. Genético Vegetal. INTA-UNR, pp. 87.
- Bazzigalupi, O., Pistorale, S.M. y Andres, A.N., 2008. Tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). Cien. Inv. Agr. 35(3): 277-285.
- Bazzigalupi, O; Acuña, M; Amendola, C; Pistorale, S., 2014. Comportamiento germinativo de raigrás anual diploide (*Lolium multiflorum* Lam.) en soluciones salinas. III Congreso RAS-Red Argentina de Salinidad. pp. 53.
- Belesky, D.P., Stringer, W.C. y Hill, N.S., 1989. Influence of endophyte and water regime upon tall fescue accessions. I. Growth characteristics. Anal of Botan. 63: 91-608.
- Beltramino, H.J., Medvescigh, J.C., De Battista, J.P. y Costa, M.C., 2005. Efecto del hongo endófito *Neotyphodium occultans* en la producción de semilla de raigrás anual. Revista Ciencia Agropecuaria 9(1): 25-31.
- Bendersky, D., 2009. Pautas para el manejo de pastoreo de raigrás. EEA INTA Mercedes, Corrientes, Argentina.
- Bennett, S.J., 1997. A phenetic analysis and lateral key of the genus *Lolium* (Gramineae). Genetic Resources and Crop Evolution 44:63-72.
- Bert, P.F., Charmet, G., Sourdille, P., Hayward, M.D., Balfourier, F., 1999. A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. Theor Appl Genet 99: 445-452.
- Bertín, O., 2004. Componentes de rendimiento y producción de semilla de raigrás anual. <http://www.aapa.org.ar/congresos/2004/PpPdf45.PDF>
- Black, C.C., Goldstein, L.D., Ray, T.B., Kestler, D.P. y Mayne, B.C., 1975. The relationship of plant metabolism to internal leaf and cell morphology and the efficiency of CO₂ assimilation. Burris, R. H. and Black, C. C. (eds.). CO₂ Metabolism and plant productivity. University Park Press. Baltimore, USA. 113-139 pp.
- Bolaric, S., Barth, S., Melchinger, A. y Posselt, U., 2005. Molecular characterization of genetic diversity in european germplasm of perennial ryegrass. Euphytica, 146, 39.
- Bonfils, C.G., 1966. Rasgos principales de los suelos pampeanos. INTA. 66 pp.
- Borrajo, C., Alonso, S. y Echeverria, H., 2000. Efecto del nitrógeno sobre el área foliar y la longitud foliar en materiales de agropiro. Revista Argentina de Producción Animal Vol. 20 Supl. 1. 23° Congreso Argentino de Producción Animal. Corrientes. Pp 152-153.
- Breese, E. y Tyler, B., 1986. Patterns of variation and the underlying genetic and cytological architecture in grasses with particular referente to *Lolium* spp. In: Styles, B.T. ed Intraespecific classification of wild and cultivated plants, pp. 53-69.
- Brizuela, M., Cahuepe, M., Cid, M., Viviani Rossi, E., Fernandez Greco, R.C. y Yagueddu, C., 1983. Estimación de la composición botánica de la dieta de vacunos en un pastizal natural. II Efecto del animal y periodo de muestreo. Rev. Animal 10, pp. 395-403.

- Bugge, G. 1984. Heritability estimates for forage yield, ear emergence and quality characteristics of the dry matter in *Lolium multiflorum* Lam. Z. Pflanzenzucht. 92: 321-327.
- Bush, L.P., Wilkinson, H.H., Schardl, C.L., 1997. Bioprotective alkaloids of grass fungal endophyte symbioses. Plant Physiol. 114(1): 1-7.
- Calsyn, E., Ghesquiere, A., Baert, J. y De Riek, J., 2003. Study of genetic diversity between and within ryegrass populations of the ECP/GR collection by means of AFLP markers. Report of the 8th meeting of ECP/GR. Working Group on Forages, Linz Oostenrijk, 122-131.
- Carta, H., Rillo, S., Richmond, P. y Ventimiglia, L., 2003. Manejo del nitrógeno en Raigrás. En: Experimentación en campos de productores. Resultados campaña 2002/03. 11-15.
- Casañas, F., Bosch, LL., Ruiz de Villa, M.C., Clavero, A., 1980. Separació de set varietats comercials de *Lolium multiflorum*, Var. WesterWoldicum mitjançant la consideració simultània de 15 caràcters morfològics. ARX IUS de l'Esc. d'Agric. de Barcelona.
- Castaño, J., Bertín, O., De Battista, J., Costa, M. y Andrés, A., 2004. Interacción genético ambiental en la productividad de cultivares de raigrás anual. 27° Congreso Argentino de Producción Animal.
- Castro, C., Oliveira, A., Carvalho, F., Maia, M., Mattos, L., y Freitas, F., 2003. Morphological and molecular characterization of italian ryegrass populations. Crop Breeding and Applied Biotechnology. 3(4) pp 245-254.
- Ceccarelli, S., 2015. Efficiency of plant breeding. Crop Science, vol 55, pp 87-97.
- Cerono, J. 1993. Variabilidad genética e identificación varietal en *Festuca arundinaceae* Schreb. cultivar "El Palenque MAG". Tesis de Maestría. Curso de Postgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. INTA-UNR, pp. 78.
- CIRN/INTA., 2012. Informe final de ensayo con QUICK-SOL. Servicio técnico del Centro de Investigaciones en Recursos Naturales/INTA Castelar a empresa AGRINEXUS s.a.
- Clay, K., Schardl, C., 2002. Evolutionary origin and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. Am. Nat. 160:99-127.
- Colabelli, M.N., 2008. Endófitos fúngicos en una Colección de *Lolium multiflorum* Lam. Revista análisis de semillas. 8(2):26.
- Colabelli, M.N., Clausen, A.M., De Battista, J.P., Costa, M., Torres, M.S., Ré, A., González Wetzell, V., Peretti, A., Pinget, D. y Medvescigh, J. 2007. Incidencia de endófitos tipo *Neotyphodium* en forrajeras nativas y naturalizadas e impacto agronómico en *Lolium multiflorum* Lam. en la Argentina. PROCISUR. Avances de Investigación en Recursos Genéticos en el Cono Sur II. Pp. 45-55.
- Cooper, JP y Mc Coll, D., 1966. Energy conversion in the grass plant. Rep. Welsh PI. Breed Stn pp. 12-13.
- Cornish, M.A., Hayward, M.D. y Lawrence, M., 1979. Self-incompatibility in ryegrass. I. Genetic control in diploid *Lolium perenne* L. Heredity 43:95-106.
- Davies, W., 1960. The Grass Crop. Spon, London.

- De Battista J.P., 2002. El endófito de raigrás anual. Actas de la Reunión Anual de Forrajeras. El pasto: el recurso más barato. INTA EEA Pergamino. CD Rom.
- De Battista, J., Andrés, A., Giammaria, S. y Costa, M., 2001. Genetic variation and genotype by environment interaction of crown rust resistance in annual rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.). Proceedings of the XIX International Grassland Congress. Brazzil, pp. 489-490.
- De Battista, J.P. y COSTA, M.C., 1998. Producción y calidad de forraje en *Bromus auleticus*. Efecto de la frecuencia de defoliación y la fertilización nitrogenada INTA EEA C. del Uruguay. Inf. Téc. N.º 4: 66-70.
- De Battista, J.P., 2005. *Neotyphodium* research and application in South America. In: *Neotyphodium* in Cool Season Grasses. C. Roberts, C. West, and D. Spiers (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. Pp. 63-69.
- Diaz, M., Echenique, V., Schrauf, G., Cardone, S., Polci, P., Lutz, E. y Spangenberg, G., 2004. Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras. RIA, 33(3):77-104, INTA.
- Dodd, G. y Donovan, L., 1999. Waterpotential and ionic effects on germination and seedling growth of cold desert shrubs. American Journal of Botany. 86(8): 1146-1153.
- Dudley J. y Moll R., 1969. Interpretation and use of estimates of heritability and genetics variances in plant breeding. Crop. Science 9, pp. 257-262.
- Edwards, K. y Emará, Y., 1970. Variation in plant development within a population of *Lolium multiflorum*. Heredity 25:179-194.
- Elgesma, A., Den Nijs, A. y Van Eeuwijk., 1989. Genetic variation for seed yield components of Westerwold ryegrass (*Lolium multiflorum* var. Westerwoldicum). Netherlands Journal Agricultural Science 37: 119-127.
- England, F., 1975. Heritabilities and genetic correlations for yield in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) grown at different densities. J. Agric. Sci. Camb. 84: 153-158.
- Eptein, E., 1979. Responses of plants to saline environments. Basic Life Sci. 14:7-21.
- Ernst, W.H.O., 1987. Population differentiation in grassland vegetation. En: J. Van Andel y col.(eds). Disturbance in grasslands. pp 214-228. Dr W. Junk Publishers. Dordrecht.
- Esau, K., 1987. Anatomía de las Plantas con Semillas. Editorial Hemisferio Sur. 512p
- Excoffier, L., Smouse, P., Quattro, J., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Genetic Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics 131:479-491.
- Fahn, A., 1982. Plant Anatomy. Ed. Third. pp. 181-191.
- Falconer, D.S., 1989. Introducción a la genética cuantitativa. Compañía Editorial Continental. México 383 pp.
- Fehr, W., 1987. Principles of cultivar development: Theory and Technique. Macmillan Publishing Company. Iowa State University. Vol 1. 536pp.
- Fernández, E., Arzadún, M., Jobbagi, E., e Ibarra, C., 2003. Producción de raigrás anual según fecha de siembra y genotipo. 26º Congreso Argentino de Producción Animal

- Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D., 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA, 220 pp.
- Fischer, R.A., Byerlee, D. y Edmeades, G.O., 2010. Can technology deliver on the yield challenge to 2050? Expert Meeting on How to feed the World in 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations Economic and Social Development Department. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLE_F2050_Technology.pdf
- Fjellheim, S. y Rognli, O., 2005. Molecular diversity of local Norwegian meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) populations and Nordic cultivars-consequences for management and utilization. Theor. Appl. Genet. 111:640-650.
- Forster, J.W., Jones, E.S., Kolliker, R., Drayton, M.C., Dumsday, J., Dupal, M.P., Guthridge, K.M., Mahoney, N.L., van Zijll de Jong, E. y Smith, K.F., 2001. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. Molecular breeding crops. G. Spangenberg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 99:101-133.
- Gardner, C., 1963. Estimates of genetics parameters in cross fertilizing plants and their implications in plant breeding. In: W. Hanson and H. Robinson (eds.). "Statistical genetics and plant breeding". N. A. S., N. R. C. Publ. 1982. Washington, D.C.
- Giammaria, S.L., 2003. Interacción genotipo por ambiente en caracteres morfofisiológicos y patométricos de familias de medios hermanos de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.). Tesis de Máster, UNR-INTA.
- Gonzalez, A.J., Dadet, M.C., Lagraña, A.A., Acuña, M.L., Pistorale, S.M., 2014. Análisis estructural de hojas de "raigrás anual" (*Lolium multiflorum* Lam.) en condiciones halomórficas. 37° Cong. AAPA – 2nd Joint Meeting ASAS-AAPA – XXXIX Cong. de la Sociedad Chilena de Prod. Animal. Simposio de Recursos genéticos, Mej. genético y biotecnología de especies forrajeras.
- Gorgas, J. y Bustos M., 2008. Dinámica y evaluación de los suelos de Córdoba con problemas de drenaje, salinidad y alcalinidad. La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria. Editorial Universidad Católica de Córdoba, Pp. 47-62.
- Guan, X., Hirata, M., Ding, C., Xu, N., Yuyama, N., Tan, L., Fu, Y., Wang, J. y Cai, H., 2014. Genetic linkage map of *Lolium multiflorum* Lam. constructed from a BC₁ population derived from an interspecific hybridization, *L. multiflorum* X *L. temulentum* L. X *L. temulentum*. Japanese Society of Grassland Science. Grassland Science, 60, 142–149
- Guillén, R., 2002. Variabilidad genética en caracteres de interés agronómico en agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth et Dewey) cultivar "El Vizcachero INTA". Tesis de Maestría. Curso de Postgrado en Mejoramiento Genético Vegetal. UNR-INTA, pp. 168.
- Guillet, M., 1984. Las gramíneas forrajeras. Editorial Acriba, Zaragoza, España 355.
- Gundel, P.E., Batista, W.B., Texeira, M., Martínez-Guersa, M.A., Omacini, M. y Guersa, C.M., 2008. *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass population: relative importance of mutualism and transmission efficiency. Proceedings of the Royal B Society. Published online: doi:10.1098/rspb.2007.1494.

- Guthridge, K.M., Dupal, M.P., Kölliker, R., Jones, E.S., Smith, K.F. y Forster, J.W., 2001. AFLP analysis of genetic diversity within and between population of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), *Euphytica*. 122:191-201.
- Gutiérrez, L.M., y Viviani Rossi, E.M., 1997. Fertilización con nitrógeno y parámetros cualitativos en silajes de raigrás anual. *Revista Argentina de Producción Animal*. 17(1):182-183.
- Hannaway, D., Fransen, S., Cropper, J., Teel, M., Chaney, M., Griggs, T., Halse, R., Hart, J., Cheeke, P., Hansen, D., Klinger, R. y Lane, W., 1999. Annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) <http://eesc.orst.edu/agcomwebfile/edmat/html/pnw/pnw501.pdf>
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. y Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 51:453-499.
- Hayward, M.D. y Mc Adam, N., 1977. Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne* L.Z. *PflZücht.*, 79:68-79.
- Herre, E.A., Knowlton, N., Mueller, U.G., Rehner, S.A., 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* 14(2):49-53.
- Hirata, M., Cai, H., Inoue, M., Yuyama, N., Miura, Y., Komtsu, T., Takamizo, T. y Fujimori, M., 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theor. Appl. Genet.* 113:270-279.
- Huff, D. R., 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Science*. 37:557-564.
- Hume, D. E., 1991. Primary growth and quality characteristics of *Bromus willdenowii* and *Lolium multiflorum*. *Grass and Forage Science*. 46: 313-324.
- Imbellone, P.A., Gimenez, J.E., Panigatti, J.L., 2010. Suelos de la Región Pampeana: Procesos de formación. Ed. INTA. Buenos Aires. 320 pp.
- Innis, M.A. y Gelfand, D.H., 1990. Optimization of PCRs. pp. 3-12 in: *PCR Protocols* (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Academic Press, New York. <http://www.mcb.uct.ac.za>
- Inoue, M. y Cai, H., 2004. Sequences analysis and conversion of genomic RFLP markers to STS and SSR markers in Italian ryegrass. *Breeding Science*, 54:245-251.
- Jewis, O., 1972. Tillering in grass: its significance and control. *Journal British Grassland Society*. 27: 65-82
- Jones E.S., Dupal M.P., Dumsday J.L., Hughes L.J., Forster J.W., 2002a. An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 105: 577–584.
- Jones E.S., Mahoney N.L., Hayward M.D. *et al.*, 2002b. An enhanced molecular marker-based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. *Genome* 45: 282–295.

- Jones, E.S., Dupla, M.P., Kölliker, R., Drayton, M.C. y Forster, J.W., 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102:405-415.
- King, I., King, J., Armestead, I., Harper, J., Roberts, L., Thomas, H., Ougham, H., Jones, R., Thomas, A., Moore, B., Huang, L. y Donnison, I., 2005. Introgression mapping in the grasses. Molecular breeding for the genetic improvement of forage crop and turf. Proceedings of the 4th international symposium on the molecular breeding of forage and turf, a satellite workshop of the XXth International Grassland Congress, pp.275.
- King, J., Thomas, A., James, C., King, I., Armstead, I., 2013. A DArT marker genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) integrated with detailed comparative mapping information; comparison with existing DArT marker genetic maps of *Lolium perenne*, *L. multiflorum* and *Festuca pratensis*. *BMC Genomics* 14: 437.
- Kleinhofs, A., Kilian, A., Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Hayes, P., Chen, F.Q., Lapitan, N., Fenwick, A., Blake, T.K., Kanazin, V., Ananiev, E., Dahleen, L., Kudrna, D., Bollinger, J., Knapp, S.J., Liu, B., Sorrells, M., Heun, M., Franckowiak, J.D., Hoffman, D., Skadsen, R. y Steffenson, B.J., 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Gen.* 86:705-712.
- Kölliker, R., Stadelmann, F., Reidy, B. y Nösberger, J., 1999. Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L. and *Dactylis glomerata* L. *Euphytica* 106:261-270.
- Kubik, C., Sawkins, M., Meyer, W. y Gaut, B., 2001. Genetic Diversity in Seven Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). Cultivars Based on SSR Markers. *Crops Science*. 41: 1565-1572.
- Labate, J., Lamkey, K., Mitchell, S., Kresovich, S., Sullivan, H. y Smith, J., 2003. Molecular and Historical Aspects of Corn Belt Dent Diversity. *Crop Science* 43:80-91.
- Lamarck, J., 1778. *Flore francoise* III: 621. Paris.
- Lamote, V., Baert, J., Roldán-Ruiz, I., De Loose, M. y Van Bockstaele, E., 2002. Traicing of 2n egg occurrence in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) using interploidy crosses. *Euphytica*, 123: 159-164.
- Lande, R. y Price, T., 1989. Genetic correlations and maternal effect coefficients obtained from offspring-parent regression. *Genetics Soc. of America* 122: 915-922.
- Lane, G., Christensen, R., y Miles, C., 2000. Coevolution of fungal endophytes with grasses: the significance of secondary metabolites. *Microbial endophytes*. Eds. C.W. Bacon and J.White.
- Lavado, R.S. y Taboada, M.A., 2009. Los procesos de salinización globales y específicos de la pampa húmeda. Resúmenes Primer Congreso de la Red Argentina de Salinidad. pp 11.
- Loss, B.P., 1994. Morphological variation in Dutch perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations, in relation to environmental factors. *Euphytica*. 74:97-107.
- Loveless, M. y Hamrick, J., 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Sist.* 15: 65-95.

- Lübberrstedt, T., 2005. Objectives and benefits of molecular breeding in forage species. XX International Grassland Congress.
- Lucero, J.C., 1970. Germinación de cuatro gramíneas forrajeras bajo distintas condiciones de salinidad. IDIA 273: 60-64.
- Malinowski, D.P., Belesky, D.P. y Lewis, G.C., 2005. Abiotic stresses in endophytic grasses. In: *Neotyphodium* in Cool Season Grasses. C. Roberts, C. West, and D. Spiers (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. Pp. 187-199.
- Marcar, N.E., 1987. Salt tolerance in the genus *Lolium* (Ryegrass) during germination and growth. Aust. J. Agric. Res. 38: 297-307.
- Marino, M.A., Mazzanti, A. y Echeverría, H.E., 1995. Fertilización nitrogenada en cultivos forrajeros anuales de invierno en el sudeste bonaerense. I. Crecimiento y acumulación de forraje. Revista Argentina de Producción Animal. 15, 1:179-182.
- Mariotti, J., 1986. Fundamentos de genética biométrica. Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal. O.E.A. Serie Biológica. Monografía N°32. 153pp.
- Martín, B., Sosa, O., Magra, G., Zerpa, G. y Besson, P., 2012. Emergencia de forrajeras en un suelo salino-alcalino tratado con yeso. Rev. Arg. de Prod. Animal. 32(2): 157-164.
- Mazzanti, A., Castaño, J., Sevilla, G. y Orbea, J., 1992. Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la Pcia. de Buenos aires. CERBAS. INTA Balcarce.
- McLean, S. y Watson, D., 1992. Divergent selection for anthesis date in annual ryegrass. Crop Science. 32:847-851.
- Medvescigh, J., Maidana, R. De Battista, J. P., Sabatini, E., y Costa, M., 2004. Incidence and infection level of endophyte infection in *Lolium multiflorum* Lam. Naturalized populations in Entre Ríos Province, Argentina. Proceedings Session II Biology of *Neotyphodium*. 5th *Neotyphodium* Symposium.
- Méndez, D. y Davies, P., 2002. Producción comparada de verdes invernales. CREA. Revista de los CREA. 35(256): 58-63.
- Monteverde, M.S. y De Battista, J., 2008. Variabilidad genética en poblaciones de raigrás anual diploide (*Lolium multiflorum* Lam.). XXXVII Congreso Argentino de Genética.
- Monteverde, M.S., 2009. Variabilidad genética interpoblacional en caracteres agronómicos en *Lolium multiflorum* Lamarck. Trabajo presentado como requisito para la obtención del Grado Académico de Licenciado en Genética. Universidad Nacional de Misiones.
- Moon, C.D., Scott, D.B., Schardl, C.L. y Christensen, M.J., 2000. The evolutionary origins of *Epichloe* endophytes from annual ryegrasses. Mycologia 92: 1103-1118.
- Morgante, M. y Olivieri, M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plants genetics. Plant J. 3:175-182.
- Munns, R. y Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Ann. Rev. Plant Biol. 59:651-681.
- Munns, R., 2005. Genes and Salt: bringing them together. New Phytology. 167:645-663.

- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 70, 3321–3.
- Nei, M., 1977. F statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Ann Hum. Genet. 41:225-233.
- Nelson, L. y Ward, S., 1990. Presence of fungal endophyte in annual ryegrass. Proceed. Int. Symp. On Acremonium/Grass Interactions. Quisenberry, S.S. y Joost, R.E. (eds.). Baton Rouge, LA. Louisiana Agric. Ept. Sta., pp. 41-43.
- Nelson, L.R. y Crowder, J., 2010. Germination of *Lolium multiflorum* genotypes in high salt conditions. 11th International Research Conference, Santiago, Chile. [http://www.ihsg.org/subsites/conference2010/documents/IHSC2010PosterProceedings\(19\).pdf](http://www.ihsg.org/subsites/conference2010/documents/IHSC2010PosterProceedings(19).pdf)
- Nelson, L.R. y Foster, M.A., 2009. Breeding annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) and perennial ryegrass (*Lolium Perenne*) for salinity tolerance. 11th International Research Conference, Santiago, Chile. [http://www.ihsg.org/subsites/conference2010/documents/IHSC2010OralProceedings\(18\).pdf](http://www.ihsg.org/subsites/conference2010/documents/IHSC2010OralProceedings(18).pdf)
- Nguyen, H.T. y Sleper, D.A., 1983. Theory and application of half-sib matings in forage grass breeding. Theoretical and applied genetics, 64(3):187-196.
- Oliveira, J. y López, J., 1999. Caracterización de poblaciones españolas de *Lolium rigidum* Gaud., para caracteres agro-morfológicos e isoenzimáticos. Invest. Agr. Prod. Prot. Veg. Vol 14(3) 454-463.
- Oliveira, J.A. y Charmet, G., 1988. Polimorfismo isoenzimático de seis poblaciones naturales de raigrás ingles de Galicia. *Pastos*, 18-19, 69-85.
- Oliveira, J.A., Balfourier, F., Charmet, G., Arbonese, E., 1997. Isozyme polymorphism in a collection of Spanish and French perennial ryegrass populations. *agronomie* 17: 335-342.
- Parodi, L., 1964. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Ganadería. Ed ACME S.A.C.I. Bs As. pp 149-151
- Peakall, R. y Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Pearson, C. e Ison, R., 1994. Agronomía de los sistemas pastoriles. Ed. Hemisferio Sur. Pp. 27-46.
- Peter-Schmid, M., Boller, B. y Kölliker, R., 2008a. Habitat and management affect genetic structure of *Festuca pratensis* but not *Lolium multiflorum* ecotype populations. *Plant Breeding* 127: 510-517.
- Piñeiro, J., Diaz, N., Perez, M., 2001. Raigrás Italiano. *Revista Española Agropecuaria*. N°828 pg 437-443.
- Powell, E., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. y Rafalsky, A., 1996. The comparison of RFLP, RPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers. *Conservation Biology* 12(4):844-855.
- Rahnama, A., Munns, R., Poustini, K. y Watt, M., 2010. A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient. *Journal of Exp. Botany*. 62(1):69-77.

- Raja, H. y Bean, E.W., 1979. Seed development and seed shedding in North Italian ecotypes of *Lolium multiflorum*. Grass and forage Science. 34:221-227.
- Rashal, I. y Kholms, I., 1983. Variability and correlation of quantitative characters of Westerswolds ryegrass (*Lolium multiflorum* var. *westerwoldicum* Mans.) Genotypes, phenotypes, heredability coefficients. Soviet Genetics. 19: 1574-1579.
- Ravel, C., Michalakakis, Y., Charmet, G., 1997. The effect imperfect transmission on the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. OIKOS. 80:18-24.
- Ré, A.E., Monteverde, M.S., Acuña, M.L., Varea, I. Andrés A. y De Battista, J. 2009. Heredabilidad de la fecha de floración en familias de medios hermanos de raigrás anual evaluadas en dos ambientes. XXXVIII Congreso Argentino de Genética.
- Rhebergenm, H., 1985. Microevolutionary processes in *Festuca rubra*. Thesis Vrije Universiteit Amsterdam.
- Rhodes, I., 1971. The relationships between productivity and some components of canopy structure in ryegrass (*Lolium* spp.): II. Yield, canopy structure and light interception. Journal of Agricultural Science. (Cambridge) 77: 283-292.
- Rhodes, I., 1973. The relationships between productivity and some components of canopy structure in ryegrass (*Lolium* spp.): III. Spaced plants characters, their heritabilities and relationship to yield. Journal of Agricultural Science. (Cambridge) 80: 171-176.
- Rosso B., Acuña M., Andrés A. y Colabelli M.N., 2010. Características agronómicas y moleculares de la colección de *Lolium multiflorum* Lam del Banco Activo Pergamino. Revista Argentina de Producción Animal 30(1): 286.
- Rosso, B. y Andres, A., 2001. Preliminary evaluation of naturalized italian ryegrass population in Buenos Aires province, Argentina. Plant Genetic Resources Newsletter. N° 128: 51-54.
- Rosso, B., 2002. Evaluación preliminar de germoplasma introducido y naturalizado de raigrás anual. Revista de Tecnología Agropecuaria. Vol 2 N° 20.
- Rowell, D.L., 1992. Acidez y alcalinidad del suelo. 885-940. In: Wild, A. ed. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Traducción de la 11a. ed. inglesa por Urbano Terrón, P. y Rojo Hernández, C. Mundi-Prensa, Madrid, 1045 p.
- Rybicki, E., 2005. PCR primer design and reaction optimization. Molecular Biology Techniques Manual. Third Edition. Edited by: Coyne, V., James, M., Reid, S., and Rybicki, E. <http://www.mcb.uct.ac.za>
- Saha, M.C., Cooper, J.M., Rouf Mian, M.A., Chekhovskiy, K. y May, G.D., 2006. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. Theor. Appl. Genet. 113:1449-1458.
- Schaal, B. y Smith, W., 1980. The apportionment of genetic variation within and among populations of *Desmosium nudiflorum*. Evolution, 34 (2), pp. 214-221.
- Schlatter, A.R., Glovagnoli, N., Ornella, L. y Alvarez, P., 2002. Utilización de marcadores moleculares en programas de investigación y servicios. Revista de tecnología Agropecuaria INTA Pergamino.

- Schultze-Kraft, R., 1990. Caracterización y evaluación preliminar de germoplasma de plantas forrajeras. Diálogo XVIII: Introducción, conservación y evaluación de germoplasma forrajero en el Cono Sur. IICA - PROCISUR. Montevideo, Uruguay. Ed. J.P. Puignau. Pp. 319-326.
- Seaney, R., 1974. In Forages. "The Sciences of Grassland Agriculture" M.E. Heath, D.S. Metcalfe and R.F. Barnes, (Eds), Iowa State Univ. Press. Ames. pp 177-188.
- Shannon, M.C., 1979. In quest of rapid screening techniques for plant salt tolerance. Horticultural Science 14:587-589.
- Smeatham, M., 1972. In "Pastures and Pastures Plants" R.H. Langer, (Ed.). Reed, Wellington, New Zeland. pp 179—228.
- Smith, K., Lee, C., Borg, P. y Flinn, P., 1994. Yield, nutritive value, and phenotypic variability of tall wheatgrass grown in a nonsaline environment. Australian Journal of Experimental Agriculture. 34: 609-614.
- Snaydon, R., 1978. Genetic changes in pasture population. In: Plant relations in Pasture, Wilson, J. CSIRO. Melbourne, pp:253-269.
- Squirrel, J., Hollingsworth, P.M., Woodhead, M.L., Russell, J., Lowe, A.J., Gibby, M. y Powell, W., 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? Molecular Ecology, 12:1339-1348.
- Studer, B., Byrne, S., Nielsen, R.O., *et al.*, 2012. A transcriptome map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). BMC Genomics 13: 140.
- Studer, B., Jensen, L.B., Hentrup, S., Brazauskas, G., Kölliker, R., y Lübberstedt, T., 2008. Genetic characterisation of seed yield and fertility traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theor. Appl. Genet. 117: 781-791.
- Studer, B., Kölliker, R., Muylle, H. *et al.*, 2010. EST-derived SSR markers used as anchor *loci* for the construction of a consensus linkage map in ryegrass (*Lolium* spp.). BMC Plant Biol 10:177.
- Studer, B., Widmer, F., Enkerli, J. y Kölliker, R., 2006. Development of novel microsatellite markers for the grassland species *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. Molecular Ecology Notes, 6:1108-1110.
- Sugarawa, K., Inoue, T., Yamashita, M., Ohkubo, H., 2006. Distribution of the endophytic fungus, *Neotyphodium occultans* in naturalized Italian ryegrass in western Japan and its production of bioactive alkaloids known to repel insecto pests. Grassland Science N° 52: 147-154.
- Sugiyama, S., Yoneyama, M., Takahashi, N. y Gotoh, K., 1985. Canopy structure and productivity of *Festuca arundinacea* Schreb. sward during vegetative and reproductive growth. Grass and Forage Sci. 40: 40-55.
- Taboada, M.A. y Lavado, R.S., 2009. Alteraciones de la fertilidad de suelos. El halomorfismo, la acidez, el hidromorfismo y las inundaciones. Ed. FAUBA.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res, 17:6463-6471.
- Terrel, E.E., 1968. A Taxonomic Revision of the Genus *Lolium*. Technical Bulletin 1392, U.S. Dept. of Agriculture. Washinston DC.

- Tomaszewski, C., Byrne, S.L., Foito, A., *et al.*, 2012. Genetic linkage mapping in an F2 perennial ryegrass population using DArT markers. *Plant Breed* 131: 345–349.
- Turesson, 1922. The genotypical response of the plant soecies to the habitat. *Heredities* (3):211-350.
- Twanley, B., 1967. Seed size and seedling vigor in birdsfoot trefoil. *Crop Science*.14:87-90.
- Twanley, B., 1974. Recurrent selection for seedling vigor in birdsfoot. *Can. J. Pl. Sci.*
- Tyler, B.F., Chorlton, K.H. y Thomas, I.D., 1987. Chapter 1: Collection and field sampling techniques for forage. In: *Collection, Characterization and Utilization of Genetic Resources of Temperate Forage Grass and Clover*. IBPGR, Roma. Pp.3-10.
- Vernengo, E. y Gils Carbó, S., 1991. Evaluación agronómica de cultivares de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.) en la Cuenca Lechera Norte de Buenos aires. *Revista de la Cámara de Semilleristas*. 13(5): 23-24.)
- Vernengo, E., Saharrea, R. y Muñoz, A., 1995. Efectos de la fertilización con nitrógeno y/o fósforo sobre un verdeo de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.). *Rev. Arg. Prod. Animal* 15 (1): 18-20.
- Vernengo, E., Spara, A., Ramajo Vertíz, J. y Platón, A., 2006. Impacto de tres frecuencias de defoliación sobre la producción de forraje de cultivares de raigrás anual. *Revista Argentina de Producción Animal* 26 (1) 207-8.
- Vernengo, E.; González de Las Heras, B. y Villaverde, A., 1986. Efectos de distintos aportes de nitrógeno sobre la producción de una pastura de raigrás anual. *Estación Experimental de Mercedes. Ministerio Asuntos Agrarios. Bol. Téc. (VI): 4: 26-34.*
- Wang, Z., Hopkins, A. y Mian, R., 2014. Forage and turf grass biotechnology. *Critical Reviews in Plant Science*, 20(6):573-619.
- Warnke, S.E., Barker, R.E., Jung, G., Sim, S.C., Mian, R., Saha, M.C., Brilman, L.A., Dupal, M.P. y Forster, J.W., 2004. Genetic linkage mapping of annual x perennial ryegrass population. *Theor. Appl. Genet.* 109:294-304.
- Warren, J., Raybould, A., Ball, T., Gray, A. y Hayward, M., 1998. Genetic structure in the perennial grasses *Lolium perenne* and *Agrostis curtisii*. *Heredity*. 81: 556-562.
- Wilkins, P.W. y Humphreys M.O., 2003. Progress in breeding perennial forage grasses for temperate agriculture. *The Journal of Agricultural Science*. 140, 129-150.
- Wit, F., 1958. Tetraploid Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Euphytica* 7:47-58.
- Wright, S., 1951. The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* (15):323-354.
- Zane, L., Bargelloni, L. y Partanello, T., 2002. Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11:1-16
- Zarrouh, K., Nelson, C. y Coutts, J., 1983. Relationship between tillering and forage yield of tall fescue. *Yield Crop Science*. 23: 333-337.