

**Plasticidad fenotípica en *Panicum coloratum*: variabilidad genética,
heredabilidad y expresión diferencial de la plasticidad.**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Mabel Cristina Giordano

Licenciada en Biodiversidad - Facultad de Humanidades y Ciencias, UNL- 2012

Lugar de trabajo: Grupo de mejoramiento genético de forrajeras- EEA INTA Rafaela



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

María Andrea Tomás

Lic. en Ciencias Biológicas (UNS)

M. Sc. (UNS)

Dr. (Department of Rangeland Ecology and Management,
Texas A & M University)

Co-director

Agustín A. Grimoldi

Ing. Agrónomo (UBA)

M. Sc. (UBA)

Dr. (Technische Universität München,
Freising-Weihenstephan, Alemania)

Consejero de Estudios

Gustavo Gabriel Striker

Ing. Agrónomo (UBA)

Dr. en Ciencias Agropecuarias (UBA)

JURADO DE TESIS

JURADO

Viviana Echenique

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Sur)

Doctora en Biología (Universidad Nacional del Sur)

JURADO

Oscar Adolfo Ruiz

Lic. en Bioquímica (Universidad del Nordeste)

Doctor en Bioquímica (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Pablo Speranza Gastaldi

Ingeniero Agrónomo (Universidad de la República)

MSc. PEDECIBA (Universidad de la República)

Dr. University of Florida

Fecha de defensa de la tesis: 29 de junio de 2018

Agradecimientos

A mi madre, por todo lo que me dio y me sigue dando en la vida.

A mi hija, por soportar estar lejos de su mamá desde muy pequeña, durante las largas horas laborales, cursos y congresos. A mi marido, Gabriel, por estar al pie del cañón siempre que fue necesario.

A Andrea y Marcelo, que después de mi familia fueron las personas que más me ayudaron en la vida.

Al resto de mi comité consejero, gracias por acompañarme. Agustín Grimoldi, gracias por la guía y por la infinita paciencia. A Gustavo Striker, gracias por la asistencia y la predisposición.

A todo el personal de la estación experimental Rafaela del INTA, gracias por el acompañamiento, la ayuda, las charlas y la calidad humana.

A Alejandra Cuatrín, por la continua asistencia y orientación estadística. A Lorena Iacopini, Luisina, Noelí, Juan, Lorena Armando, Mauro, Gonzalo, Emilia. Gracias por la compañía, los mates, las dudas resueltas, el aliento.

A mis jefes y compañeros del cuartel de bomberos voluntarios de Rafaela, por otorgarme sin dudar, la licencia que necesité para escribir esta tesis, siendo que el trabajo en el cuartel es mucho, y brazos no sobran.

A todos, de corazón, muchas gracias.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii

CAPÍTULO 1

1.1 Introducción general	1
1.1.a Plasticidad fenotípica y variabilidad genética	2
1.1.b Heredabilidad de la plasticidad fenotípica	2
1.1.c Expresión diferencial de la plasticidad fenotípica	3
1.1.d La sequía como estrés	4
1.1.e Especie de estudio: <i>Panicum coloratum</i>	5

CAPÍTULO 2: LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN PLASTICIDAD FENOTÍPICA A LA SEQUÍA EN *Panicum coloratum* ES DETERMINADA POR LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE SU SITIO DE ORIGEN.

2.1 Introducción	8
2.2 Objetivos particulares	10
2.3 Hipótesis	11
2.4 Materiales y métodos	12
2.5 Análisis estadístico	14
2.6 Resultados	16
2.6.a Contenido gravimétrico de agua en suelo (w)	16
2.6.b Respuesta de las medias de los caracteres a los tratamientos	16
2.6.c Índices de plasticidad de variedades y accesiones	16
2.6.d Plasticidad fenotípica y condiciones climáticas	19
2.7 Discusión	22

CAPÍTULO 3: HEREDABILIDAD Y GANANCIA GENÉTICA PARA SELECCIÓN

POR PLASTICIDAD FENOTÍPICA.

3.1 Introducción.....	27
3.2 Objetivos particulares	29
3.3 Hipótesis.....	30
3.4 Materiales y métodos	31
3.5 Análisis estadístico... ..	32
3.6 Resultados.....	34
3.7 Discusión	39

CAPÍTULO 4: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN *Panicum coloratum* L. INDUCIDA POR CONDICIONES PREVIAS DE ESTRÉS HÍDRICO

4.1 Introducción.....	45
4.2 Objetivo particular.....	47
4.3 Hipótesis	48
4.4 Materiales y métodos	49
4.4.a Germinación de semillas de <i>p. coloratum</i>	50
4.4.b Etapa 1: establecimiento de las plántulas.....	50
4.4.c Etapa 2: aplicación de los dos niveles de pretratamiento (sequía-control).....	50
4.4.d Etapa 3: período de recuperación de las plantas(riego constante).....	50
4.4.e Etapa 4: aplicación del tratamiento final (sequía y control).....	51
4.4.f Estimación de contenido gravimétrico de agua en suelo (w) y contenido relativo de agua (CRA).....	51
4.4.g Estimación de índices de plasticidad fenotípica.....	52
4.5 Análisis estadístico... ..	52
4.6 Resultados.....	53
4.6.a Contenido gravimétrico de agua en suelo y contenido relativo de agua en hoja a lo largo del experimento.....	53
4.6.b Comparación de los caracteres morfológicos al finalizar la etapa de recuperación. 53	
4.6.c Comparación de los índices de plasticidad fenotípica obtenidos en grupos de plantas provenientes de dos pretratamientos diferentes	54
4.7. Discusión	57

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL

5.1. Discusión general	62
5.1.a Variabilidad genética para plasticidad fenotípica y relación con las condiciones climáticas de los sitios de origen... ..	62
5.1.b Heredabilidad en sentido estricto y ganancia genética para plasticidad fenotípica	63
5.1.c. Expresión diferencial de la plasticidad fenotípica.....	64
5.2 Implicancias y perspectivas	64
Bibliografía	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Características ambientales de los sitios de recolección de accesiones de <i>Panicum coloratum</i> correspondientes a las variedades <i>makarikariense</i> y <i>coloratum</i>	12
Cuadro 2.2 Índices de plasticidad para las variedades <i>makarikariense</i> y <i>coloratum</i> con sus errores estándar, estimadas dos semanas después de la aplicación de los tratamientos control y sequía. Proporción de área foliar (PAF), área foliar específica (AFE), aéreo/subterráneo (A/S) y lámina/vaina (L/V). Letras diferentes indican diferencias significativas entre variedades ($p < 0,05$).....	18
Cuadro 2.3 Índices de plasticidad y plasticidad fenotípica promedio para cada una de las cuatro accesiones en cada variedad, con sus errores estándar. Valores obtenidos después de dos semanas de tratamiento control y sequía. Se remarcan en negrita las accesiones de mayor y menor plasticidad, considerando las dos variedades. Dentro de cada columna y variedad, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).....	18
Cuadro 2.4 Índices de correlación (P) y su significancia entre los diferentes caracteres y la media e índice de heterogeneidad (IH) de la temperatura media anual. ns = no significativo. Proporción de área foliar (PAF), aéreo/subterráneo (A/S), área foliar específica (AFE), lámina/vaina (L/V) y plasticidad fenotípica media (PF Media)....	20
Cuadro 3.1 Valores promedio, rango, estimación de los componentes de varianza (S_f^2 entre familias y S_e^2 , dentro de familias) y distribución de los componentes de varianza para plasticidad fenotípica para sequía de los caracteres en plántulas de dos variedades de <i>Panicum coloratum</i> . Las medidas corresponden al final del experimento (15 días desde el comienzo del tratamiento).....	36
Cuadro 3.2 Heredabilidad (h^2) para los caracteres en los tratamientos control y sequía, y heredabilidad para plasticidad fenotípica (PF) en plántulas de dos variedades de <i>Panicum coloratum</i> . EE: Error estándar.....	37
Cuadro 3.3 Valor medio de la plasticidad fenotípica (PF) de diferentes caracteres, heredabilidad en sentido estrecho (h^2) y estimación de la ganancia genética (ΔG) y de las medias mejoradas (MM) en caso de aplicarse intensidades de selección (i) del 20% y el 15%, para aumentar o reducir la media. EE (Error Estándar). Var: Variedad, Mak: <i>Makarikariense</i> , Col: <i>Coloratum</i> , L: Lámina, P: Pesudotallo, R: Raíz, BT: Biomasa Total: AF: Área Foliar.	38
Cuadro 4.1. Condiciones de temperatura media y humedad relativa (\pm Desvío estándar) en cada etapa del ensayo realizado en invernadero	49
Cuadro 4.2. Área foliar específica (AFE), Lámina/Vaina (L/V), Aéreo/subterráneo (A/S), Senescente/Biomasa total (S/T) y biomasa total (BT) de las plántulas provenientes de los pretratamientos de control y sequía, cosechadas luego del período de recuperación. EE: Error estándar. Los datos de S/T fueron transformados con raíz cuadrada.....	54
Cuadro 4.3. Índices de plasticidad y valores p para efecto de pretratamiento, planta madre, interacción pretratamiento*planta madre para los caracteres Área foliar específica (AFE), Lámina/Vaina (L/V), Aéreo/subterráneo (A/S), Senescente/Biomasa total (S/T) y promedio (P. media) de las plántulas de la accesión ER, provenientes de los pretratamientos de control y sequía, cosechadas al final del tratamiento final. EE: Error estándar. Los datos de L/V debieron ser	

transformados mediante arcoseno. Letras diferentes indican diferencias significativas entre plantas que provienen de diferentes pretratamientos55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1** Normas de reacción con error estándar para proporción de área foliar (PAF), área foliar específica (AFE), aéreo/subterráneo (A/S) y lámina/vaina (L/V) en accesiones de las variedades *makarikariense* (a, c, e y g) y *coloratum* (b, d, f y h) en tratamientos control y sequía durante dos semanas. Entre paréntesis, en mayúscula, diferencias de valores medios entre variedades para cada carácter medido. Entre paréntesis, en minúscula, diferencias de valores medios entre accesiones (ns=no significativo). 17
- Figura 2.2** Biplot del análisis de componentes principales. Los vectores representan índices de plasticidad de PAF (proporción de área foliar), AFE (área foliar específica), A/S (aéreo/subterráneo) y L/V (lámina/vaina). Los datos de L/V fueron transformados por raíz cuadrada. Los vectores que poseen la misma dirección están relacionados, y los vectores perpendiculares no están relacionados. El largo de cada vector indica la proporción de variación asociada con el mismo. Los círculos grises representan a las accesiones de la variedad *makarikariense*, los círculos negros representan las accesiones de la variedad *coloratum* 19
- Figura 2.3** Correlación entre a) y b) proporción de área foliar (PAF), c) y d) área foliar específica (AFE), e) y f) aéreo/subterráneo (A/S), g) y h) lámina/vaina (L/V) e i) y j) índices de plasticidad promedio y la precipitación media anual acumulada (izquierda) y el índice de heterogeneidad de la precipitación media anual acumulada (derecha). (P = Índice de correlación de Pearson; ns, no significante; *, $p < 0,1$; **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,01$) 21
- Figura 3.1** Normas de reacción en plántulas de 24 familias de medios hermanos por variedad en *Panicum coloratum* (variedades *coloratum* y *makarikariense*), luego de 15 días de tratamientos de sequía y control en condiciones de invernáculo. Se presentan los valores de biomasa de lámina (a y b), vaina (c y d), raíz (e y f), peso seco total (g y h) y área foliar por planta (i y j). Cada línea representa el promedio de la respuesta de una familia 35
- Figura 4.1.** Representación gráfica de la secuencia y duración de las 4 combinaciones de tratamientos en plántulas de la accesión ER de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. TF: tratamiento final 49
- Figura 4.2 a)** Contenido gravimétrico de agua (W) y **b)** Contenido relativo de agua en hoja los tratamientos de las cuatro etapas del ensayo. Establecimiento (E), Pretratamiento (P), Recuperación (D) y Tratamiento Final (T.F.). Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos en cada etapa. Las barras representan el desvío estándar. Los tratamientos son Control (C) y Sequía (S) para las etapas pretratamiento y recuperación. En la etapa del tratamiento final, CC y CS corresponden a los tratamientos final control y sequía, respectivamente, aplicados en las plantas expuestas al pretratamiento control. SC y SS corresponden a los tratamientos finales control y sequía en las plantas expuestas al pretratamiento de sequía 53
- Figura 4.3.** Índices de plasticidad (IP) de **a)** Área foliar específica (AFE), **b)** Lámina/Vaina (L/V), **c)** Aéreo/subterráneo (A/S), **d)** Senescente/Biomasa total (S/T) y **e)** Plasticidad promedio (IP. promedio) de las plántulas de cinco familias de la accesión ER. Las plántulas fueron cosechadas al final del tratamiento final. Diferentes colores indican grupos provenientes de Pretratamientos Control (C) y Sequía (S). Las barras representan el error estándar. Letras minúsculas diferentes indican expresión diferencial de la plasticidad fenotípica en la familia. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre familias para expresión diferencial de la plasticidad 56

Abreviaturas

AFE: área foliar específica

CRA: contenido relativo de agua

h^2 : heredabilidad en sentido estricto

IH: índice de heterogeneidad

IP: índice de plasticidad

PAF: proporción de área foliar

W: contenido gravimétrico de agua

Plasticidad fenotípica en *Panicum coloratum*: variabilidad genética, heredabilidad y expresión diferencial de la plasticidad

RESUMEN

Plasticidad fenotípica es la capacidad de un genotipo de generar diferentes fenotipos cuando es expuesto a diferentes ambientes. Desde el punto de vista genético, en plantas de uso agronómico como las forrajeras megatérmicas, la comprensión de diferentes aspectos de la plasticidad fenotípica constituiría un aporte interesante para los planes de mejoramiento. En esta tesis se realizaron experimentos controlados con el objeto de estudiar características de la plasticidad fenotípica morfológica frente a sequía a nivel de plántula en dos variedades de la gramínea *Panicum coloratum*. Se halló variabilidad genética para plasticidad fenotípica entre variedades y dentro de accesiones en cada variedad. Se estableció que, la magnitud de la plasticidad fenotípica, está relacionada con la variabilidad de las precipitaciones en los sitios de colecta de las accesiones analizadas. Se estimó la heredabilidad en sentido estricto de la plasticidad fenotípica, que fue siempre más baja que la heredabilidad de los caracteres. Se determinó que, si se realizara selección, el avance genético sería muy lento, aun con alta presión de selección. También se estudió cómo las condiciones hídricas previas influyen la expresión de la plasticidad fenotípica ante la ocurrencia de un nuevo episodio de sequía. Se encontró que la expresión de la plasticidad puede ser influida por las condiciones hídricas experimentadas previamente. Se detectó variabilidad entre los genotipos, tanto en la forma en que las condiciones previas modifican la magnitud de la plasticidad fenotípica como en el tipo de carácter que expresa plasticidad fenotípica. Estos resultados constituyen un avance en la identificación, cuantificación y comprensión de la variabilidad en las respuestas plásticas de especies forrajeras con aptitud de implantación en ambientes sujetos a restricciones hídricas; y ayudarán en la detección de los mejores genotipos a implantar en dichos ambientes, mejorando la ejecución y toma de decisiones en planes de mejoramiento genético vegetal.

Palabras clave: Sequía, megatérmicas, implantación, plasticidad fenotípica, heredabilidad, variabilidad genética, expresión diferencial, condiciones ambientales previas.

Phenotypic plasticity in *Panicum coloratum*: genetic variability, heritability and differential expression of plasticity.

ABSTRACT

Phenotypic plasticity is the ability of a genotype to generate different phenotypes when exposed to different environments. From a genetic point of view, in plants with agronomic use such as warm-season forages, the understanding of different aspects of phenotypic plasticity will constitute an interesting input to breeding programs. In this thesis, controlled experiments were carried out in order to study characteristics of morphological phenotypic plasticity in response to drought, in two varieties of the grass *Panicum coloratum*. genetic variation for phenotypic plasticity was found both Between varieties and among accessions within varieties. Also, it was established that the magnitude of phenotypic plasticity is related to the variability in mean annual precipitation at the accessions' collection sites. Narrow sense heritability of phenotypic plasticity was estimated, being always lower than the narrow sense heritability of the mean of the characters. Likewise, it was determined that, if selection was performed, genetic gain would be slow, even with high selection intensity. The influence of hydric previous conditions on expression of phenotypic plasticity to drought was also studied. It was found that the expression of the amount of phenotypic plasticity could be influenced by the previous hydric conditions. Variability between genotypes was also found, both in the way that previous conditions affect phenotypic plasticity magnitude and in the type of character which express phenotypic plasticity. These results constitute an advance in the identification, quantification and comprehension of the variability in the plastic responses of forage grasses able to be used in environments with hydric restrictions. This results will help to detect better genotypes to establish in such environments, improving execution and decision making in plant breeding programs.

Key words: drought, warm-season, implantations, phenotypic plasticity, heritability, genetic variability, differential expression, previous environmental conditions.

Introducción general

1.1.a Plasticidad fenotípica y variabilidad genética

La capacidad de un genotipo de generar diferentes fenotipos cuando es expuesto a diferentes ambientes se denomina plasticidad fenotípica (Bradshaw 1965). Ésta permite a las especies adaptarse a nuevas condiciones ambientales, ya sean de corta o larga duración (p.e. anegamiento por lluvias, cambio en la temperatura media global), e incluso, los organismos madre pueden transmitir dichas adaptaciones fenotípicas a su descendencia (plasticidad transgeneracional) (Lundgren y Sultan 2005, Duncan et al. 2014). En las especies vegetales, los cambios fenotípicos más frecuentes se evidencian en la partición de biomasa entre hojas, tallos y raíces y cambios fisiológicos, morfológicos y fenológicos (Macdonald y Chinappa 1989, Thompson 1991, Pedrol et al. 2000, Poorter et al. 2011, Huber et al. 2012). Estos cambios fenotípicos les permiten a las plantas mantener sus funciones vitales, sobrevivir y dejar descendencia aún cuando las condiciones ambientales varían constantemente (Sultan 1995).

A lo largo del tiempo, los estudios de plasticidad se han centrado en describir, las diferencias en plasticidad entre especies, entre poblaciones, entre organismos con diferentes niveles de ploidía e incluso entre diferentes formas de vida (árboles, arbustos, hierbas) (Macdonald y Chinappa 1989, Sultan 1995, Droste et al. 2010, Freschet et al. 2015). Asimismo, se han hallado diferencias en plasticidad entre genotipos dentro de poblaciones (Kaufman y Smouse 2001). Estos estudios han demostrado que la plasticidad puede considerarse como un carácter que posee variabilidad genética y como tal, está sujeto a las leyes de selección natural, pudiendo evolucionar, es decir, variar en las poblaciones a lo largo del tiempo (Thompson 1991, Richards et al. 2006, Chevin y Lande 2011). El hecho de que pueda evolucionar, implica que se trata de una característica heredable (Baldwin 1902 en Duncan et al. 2014, Thompson 1991), con variabilidad intra e interpoblacional determinada.

Si bien desde hace varias décadas la plasticidad fenotípica ha sido reconocida como un carácter en sí misma y que por lo tanto puede ser modificada por selección, la idea de que esta plasticidad muestra variabilidad en su magnitud y/o dirección es menos frecuente y ha sido menos explorada. A esto se suma que la cuantificación de la variabilidad de este carácter es laboriosa, ya que para la estimación de la plasticidad se necesitan individuos con el mismo material genético o lo más similares posible expuestos a ambientes diferentes.

1.1.b Heredabilidad de la plasticidad fenotípica

Las estimaciones de la heredabilidad (proporción de la variabilidad que se atribuye a genes de efecto aditivo) (Falconer 1990) de los caracteres son muy frecuentes y muy utilizadas en trabajos de mejoramiento genético y en evolución (Young 1994, Boe 2003, Smart et al. 2003; Matesanz et al. 2010, Codesido et al. 2012, Brommer 2013). Sin embargo, estas estimaciones se realizan generalmente sobre los valores medios de los atributos y en proporción, es baja la cantidad de estudios que han indagado sobre los valores de heredabilidad que puede presentar la plasticidad. Trabajos en plantas como *Arabidopsis thaliana* y otras especies modelo, de ciclo de vida corto, han realizado algunas aproximaciones, en los cuales se calcularon los valores de heredabilidad realizada, obtenidos a partir de ciclos de selección de plantas plásticas (Matesanz et al. y citas, 2010). Los valores hallados en dichos trabajos son bajos en relación a las heredabilidades de las medias de los caracteres. Por otro lado, trabajos en poblaciones

naturales recopilados por Visser (2008), muestran respuesta a la selección en los valores medios de los caracteres, pero no en el cambio de pendiente de la norma de reacción.

La heredabilidad de un carácter expresa la proporción de la varianza total que es atribuible a los efectos medios de los genes. Debido a que el valor de la heredabilidad depende de la magnitud de todas las componentes de varianza (fenotípica, genética y ambiental), es importante notar que ésta no es sólo una propiedad del carácter, sino también de la población y de las circunstancias ambientales a las que están sujetos los individuos (Falconer 1990). La magnitud de la variabilidad genética con respecto a la total, representa la proporción de lo observado que podrá heredarse a la generación siguiente. Por lo tanto, para lograr una mejor comprensión de la plasticidad como carácter en sí, es necesario obtener más información sobre cuáles son los valores de heredabilidad que pueden presentar las plasticidades de los diferentes atributos (Scheiner y Lyman 1989).

1.1.c Expresión diferencial de la plasticidad fenotípica

Las respuestas plásticas de un organismo a un determinado estímulo, están influenciadas por las condiciones a las que el mismo fue expuesto en etapas tempranas de su desarrollo (Weinig y Delph 2001, Huber et al. 2012). Entre estas condiciones previas pueden considerarse tanto las condiciones nutricionales en las que se encuentra el organismo al momento de desarrollar la respuesta plástica (Huber et al. 2012), como también a los efectos de la “impronta o huella de estrés” (“stress imprint”-Bruce et al. 2007), que son las modificaciones bioquímicas o genéticas que ocurren en un organismo después de un evento de estrés.

Dependiendo de la duración, intensidad y momento ontológico, estos eventos de estrés iniciales pueden provocar que las respuestas plásticas sean diferentes en magnitud o dirección, cuando nuevos eventos de estrés se presentan, (Abraham y Bear 1996, Novoplansky 2009, Huber et al. 2012). Por ejemplo, en *Rumex palustris*, la mayor o menor acumulación de carbohidratos en tallos y raíces resultantes de la aplicación de pretratamientos de disponibilidad diferencial de luz y nutrientes, afectó la magnitud de la elongación foliar producida en respuesta a una inundación subsecuente. Es decir, la plasticidad en la elongación foliar de las hojas más jóvenes fue mayor, cuanto más alta fue la concentración de carbohidratos en tallo y raíz (Huber et al. 2012).

Dentro de los mecanismos involucrados en el comportamiento de las plantas frente a los estreses bióticos y abióticos, se encuentra el fenómeno de “*priming*” (Bruce et al. 2007). En éste, las exposiciones previas de una planta a un estrés, producen modificaciones bioquímicas a nivel cromosómico (cambios epigenéticos) y/o a nivel celular (acumulación de proteínas de señalización o de factores de transcripción), que la hacen más resistente a exposiciones futuras (Bruce et al. 2007). Por ejemplo, la exposición a un tratamiento de sal en sorgo, mejoró la respuesta posterior de las plantas cuando fueron nuevamente expuestas a estrés salino (Yan et al. 2015). En otro caso, tubérculos de papa sometidos a sequía mostraron una menor reducción en su producción cuando un nuevo evento de estrés hídrico se hizo presente (Ramírez et al. 2015). En trigo, la exposición a la sequía en fase vegetativa, mejoró la tolerancia a la sequía y al calor en la fase de llenado de grano (Wang et al. 2015). De esta forma, se observa que los organismos vegetales pueden desarrollar una activación de las respuestas frente al estrés con mayor rapidez o magnitud que los no expuestos. La ventaja radica en que la planta cuenta con el beneficio de una mejor protección, sin el costo asociado a la expresión constitutiva de los genes relacionados al estrés (Bruce et al. 2007). Este “*priming*” puede

ocurrir tanto con factores bióticos como abióticos. En el caso de los factores abióticos, como por ejemplo la sequía, se habla de aclimatación.

1.1.d La sequía como estrés

El ambiente en el cual las plantas crecen puede presentar una amplia variedad de estreses, tanto bióticos como abióticos. De estos últimos, la disponibilidad de agua es el factor que más influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas, debido a que constituye el medio en el cual se dan la mayoría de los procesos esenciales para la vida (Taiz y Zeiger 2002).

En las plantas, una disminución en el contenido de agua, produce una reducción en el volumen celular y un aumento en la concentración de solutos. Como consecuencia, la primera reacción de defensa frente a este estrés es la reducción de la elongación foliar, ya que es una actividad dependiente de la turgencia de las células (Taiz y Zeiger 2002). Esto conlleva a una disminución de la proporción de lámina, y en consecuencia, de la proporción de área foliar con respecto al peso total de la planta. De esta forma, la proporción de área foliar con respecto al peso seco total de la planta (PAF), es menor en las plantas que están expuestas a sequía, que en aquellas que se desarrollan en condiciones óptimas de disponibilidad de agua. La proporción de área foliar (PAF), está correlacionada positivamente con la tasa de crecimiento relativo de las plantas, por lo que, en una planta bajo sequía, cuanto menor sea ésta, menor será la tasa de crecimiento relativo (Poorter 1990, Bartels y Sunkar 2005, Staniak y Kocoń 2015).

En un segundo plano, a pesar de que en donde el suelo está seco la elongación radicular se reduce, en las zonas donde hay raíces en contacto con suelo húmedo, el crecimiento de éstas es estimulado (Staniak y Kocoń 2015). Esto se debe a que, a pesar de haber una menor expansión foliar (con su consecuente reducción de la proporción lámina:vaina), la tasa fotosintética no se reduce con la sequía leve y, por lo tanto, se genera el exceso de asimilados que son destinados a las raíces más profundas. Como consecuencia, se reduce la proporción biomasa aérea:biomasa subterránea.

En tercer lugar, las plantas pueden reducir la evaporación mediante el cierre de sus estomas y la reducción de la relación área foliar:peso de lámina (AFE-área foliar específica), para así controlar la pérdida de agua por unidad de superficie foliar (Osakabe et al. 2014). Además de estos, otros mecanismos que pueden manifestarse en las plantas son: la modificación de la conductividad hidráulica, para reducir la posibilidad de embolias y la abscisión foliar, que reduce el área foliar de la planta (Taiz y Zeiger 2002, Valladares et al. 2004, Staniak y Kocon 2015).

Las alteraciones morfológicas y fisiológicas mencionadas anteriormente, pueden ocurrir en mayor o menor medida en los diferentes organismos vegetales. La ocurrencia de dichas alteraciones va a depender de la relación costo-beneficio para cada individuo en particular y de ello se deriva la capacidad de cada uno para amortiguar el efecto perjudicial de la falta de agua.

De acuerdo al modelo de “equilibrio funcional”, propuesto por Poorter y Nagel, (2000) (Poorter et al. 2011), las plantas destinan más asimilados a los órganos cuya función es obtener el recurso que en ese momento sea el limitante. En el caso de la sequía, se espera que las plantas incrementen la proporción de raíces y a su vez, minimicen la pérdida de agua a través de las hojas, reduciendo la superficie foliar (reducción del área foliar específica).

Si la respuesta plástica de algunos individuos frente a la sequía permite que mantengan o aumenten su éxito reproductivo en relación a otros que no muestran plasticidad, se dice que esta respuesta es adaptativa (Thompson 1991).

Uno de los momentos donde el componente ambiental es crítico, es el comprendido entre la siembra y el establecimiento de la plántula (Valladares et al. 2004). Esto se debe a que la planta debe desarrollar estructuras necesarias para pasar del estado heterótrofo al autótrofo en un período muy corto, antes de que los factores ambientales (p.e. agua, herbívoros) condicionen su crecimiento (Carren et al. 1987, Moser 2000). La posibilidad de que, a nivel de plántula, la capacidad de cambiar el fenotipo frente a cambios en el ambiente, le otorgue a la plántula la posibilidad de mantener o incrementar el éxito reproductivo, la convierte en un factor importante para la supervivencia.

1.1.e Especie de estudio: *Panicum coloratum*

Panicum coloratum es una gramínea forrajera megatérmica perenne que presenta buena producción de forraje y tolerancia a suelos con limitantes. Las variedades más conocidas y utilizadas son dos: *coloratum*, que en su hábitat natural crece en praderas y bosques abiertos, con precipitaciones entre 650 y 1700 mm, y *makarikariense*, presente en sabanas secas y templadas, donde las precipitaciones se encuentran entre 500 y 1000 mm al año. Esta última también puede encontrarse en llanuras de inundación, donde en ocasiones puede recibir tan sólo 375 mm al año (Tischler y Ocumpaugh 2004). Dependiendo de la variedad, esta forrajera es utilizada en zonas semiáridas (var. *coloratum*) o con regímenes de encharcamientos y sequía (var. *makarikariense*). Esto último, sumado a que en su hábitat de origen las variedades crecen en ambientes con diferentes regímenes de precipitaciones (*makarikariense* crece en ambientes más variables en cuanto a condiciones hídricas), brinda una base para suponer que las variedades podrían poseer diferencias en su variabilidad genética para plasticidad, siendo *makarikariense* la variedad que resultaría más variable para el carácter plasticidad frente a la sequía.

Los diferentes estudios llevados a cabo sobre la especie, tomando como material de estudio las diferentes accesiones de la colección de germoplasma de la estación experimental Rafaela del INTA, dan cuenta de que las dos variedades más utilizadas de esta especie son genéticamente variables para caracteres tanto agromorfológicos (plántulas y adultos) como moleculares (Komatsu et al. 2007, Armando et al. 2013, Armando et al. 2015, Burgos et al. 2018), formando grupos claramente diferenciados. La variabilidad genética, en particular, es alta aún en los cultivares comerciales (Armando et al. 2015, Burgos et al. 2018). Cuando se comparan las variedades desde el punto de vista genético, se observa que la variedad *makarikariense*, sin embargo, es menos variable que la variedad *coloratum* (Armando et al. 2015). Desde el punto de vista agromorfológico, la var. *makarikariense* se caracteriza por poseer rizomas más desarrollados, producir más materia seca y más semillas que la var. *coloratum*, pero, en contraparte, la primera es menos tolerante a las bajas temperaturas. A su vez, las diferentes accesiones de cada variedad muestran claras diferencias a nivel genético, aunque la mayor parte de la variabilidad se distribuye dentro de las accesiones de cada variedad (Armando et al. 2015, Burgos et al. 2018). En cuanto al modo reproductivo, la especie es predominantemente alógama, aunque la bibliografía cita que no se descarta un cierto grado de apomixis (Hutchinson y Bashaw 1964), estudios de nuestro grupo de trabajo demostraron que la gran mayoría de las semillas se produce por polinización cruzada y que incluso la

probabilidad de producir semillas por autofecundación es muy reducida (Armando et al. 2017).

En nuestro país, los eventos de introducción de la especie no han sido apropiadamente documentados, por lo que el origen del germoplasma que se encuentra actualmente en el país no es conocido con certeza (Petruzzi et al. 2003). Diferentes pasturas de estas variedades han sido establecidas en una colección de germoplasma en la estación experimental del INTA a lo largo de los años. Al ser una pastura de gran persistencia, al momento de ser colectadas, cada accesión ha sufrido diferentes presiones de pastoreo y han crecido bajo diferentes tipos de suelos, regímenes de precipitaciones, temperaturas y heladas (Armando et al. 2013). Esto permite suponer que entre las diferentes pasturas pueden haber surgido diferencias en la capacidad de respuesta a la sequía.

Sumado a lo mencionado anteriormente, *P. coloratum* se caracteriza por poseer plántulas de lento crecimiento, lo que las expone por más tiempo a fluctuaciones ambientales. Debido a estas características, constituye una especie viable para el estudio de la plasticidad fenotípica a nivel de plántula, y en la que los resultados obtenidos podrían implicar avances importantes para su utilización como pastura en ambientes marginales, y una aproximación al comportamiento de las pasturas megatérmicas en general.

En este trabajo se trabaja a nivel de plántula en dos variedades de *P. coloratum*, para analizar, en primer lugar, cuál es y cómo se distribuye la variabilidad genética de la plasticidad fenotípica frente a la sequía entre y dentro de accesiones. También se relaciona la magnitud de la plasticidad fenotípica con la precipitación media anual y la variabilidad en la precipitación de los sitios de colecta de las accesiones (Capítulo 2). En segundo lugar, se determina cuál es el grado de heredabilidad en sentido estrecho del carácter, y el nivel de ganancia genética que se podría obtener aplicando selección (Capítulo 3). Por último, se realiza un experimento a fin de obtener más información sobre cuál es el impacto de la exposición a sequía en etapas muy tempranas del desarrollo, sobre la magnitud de la respuesta plástica de las plántulas cuando posteriormente se presenta un evento de estrés similar (Capítulo 4). Para finalizar, en el capítulo 5, se discuten los resultados, las implicancias y las perspectivas en base a lo hallado en este trabajo.

La variabilidad genética en plasticidad fenotípica a la sequía en *Panicum coloratum* es determinada por las condiciones ambientales de su sitio de origen

2.1 Introducción

Los cambios medioambientales son las situaciones más desafiantes que las plantas deben enfrentar para sobrevivir y lograr reproducirse. Estas fluctuaciones ambientales se transforman en un problema agronómico crucial cuando las plantas afectadas son aquellas destinadas a la producción de alimentos. En Argentina, la cría de ganado vacuno ha sido desplazada hacia áreas marginales donde las condiciones ambientales son menos favorables y/o con marcadas fluctuaciones que afectan el establecimiento y la producción de pasturas en base a especies forrajeras tradicionales (Stritzler 2008). En estas condiciones, la disponibilidad de agua es poco previsible y los eventos de sequía en general son frecuentes. La posibilidad de contar con especies forrajeras con aptitud de implantación bajo condiciones de estrés ambiental constituye una herramienta agronómica de utilidad para mantener y/o incrementar la provisión de forraje de calidad en ambientes ganaderos marginales.

Plasticidad fenotípica es la propiedad de los organismos de presentar modificaciones en su fenotipo de acuerdo a los cambios ambientales (Bradshaw 1965). Esta propiedad puede favorecer el mantenimiento de la homeostasis a pesar de variaciones en las condiciones del medio ambiente. La plasticidad fenotípica es un carácter en sí mismo, heredable (Scheiner y Lyman 1989, Richards et al. 2006), y cuya frecuencia en la población puede ser modificada por medio de la selección natural y/o artificial (Sultan y Stearns 2005, De Kort et al. 2016), obviamente asumiendo que existe suficiente variabilidad genética para dicho carácter en la población. Bajo el supuesto de la existencia de variabilidad genética y capacidad de respuesta a la selección del carácter en cuestión, las poblaciones de una especie pueden presentar rangos diferentes de plasticidad fenotípica dependiendo, entre otras cosas, de las características del ambiente al que fueron expuestas (Cheplick 1995, Lind et al. 2011, De Kort et al. 2016, Grogan et al. 2016). Asimismo, la variabilidad ambiental podría dar ventaja evolutiva a los individuos más plásticos y, consecuentemente, se esperaría que las poblaciones sean más plásticas cuanto más variables sean los ambientes a los cuales pertenecen (Baythavong 2011, Lind et al. 2011, Reed et al. 2011, Sultan y Matesanz 2015).

En especies cultivadas, diferentes variedades y accesiones colectadas a lo largo de su área de uso, podrían presentar valores variables de plasticidad fenotípica para diferentes caracteres en respuesta a condiciones ambientales (Grogan et al. 2016). La existencia de diferencias en la capacidad de respuesta ante cambios ambientales es una herramienta valorable cuando los esfuerzos de mejoramiento genético están orientados hacia la tolerancia a condiciones de estrés. *Panicum coloratum* L. (mijo perenne), es una gramínea forrajera C4 de origen sudafricano, perenne, con buena producción estival de forraje, la cual está recibiendo creciente atención debido a sus posibilidades de uso en ambientes con restricciones climáticas y edáficas (Armando et al. 2013). La variedad *coloratum* prospera naturalmente en praderas y bosques abiertos, con precipitaciones anuales abundantes (1100 mm anuales en promedio). Mientras que la variedad *makarikariense* proviene de sabanas secas y cálidas, donde las precipitaciones anuales van desde 500 a 1000 mm anuales, aunque es encontrada también en llanuras de inundación. En resumen, se reporta que en su ambiente originario cada variedad crece bajo diferentes regímenes climáticos, siendo *makarikariense* la variedad que naturalmente crece bajo un régimen hídrico de mayor variabilidad (Tischler y Ocumpaugh 2004).

En trabajos previos, hemos descripto una marcada variabilidad morfológica y molecular tanto entre como dentro de las variedades mencionadas de *P. coloratum* y sus respectivas accesiones (Armando et al. 2015, Burgos et al. 2018). En el presente capítulo,

se explora mediante un experimento manipulativo la existencia de variabilidad en plasticidad fenotípica en respuesta a la sequía en plántulas de *P. coloratum*, y se avanza en la comprensión de algunos principios que modulan esta variabilidad. Es de destacar, que el estadio de plántula es el más crítico para la instalación de especies forrajeras en ambientes restrictivos. A su vez, se determina experimentalmente si variedades y accesiones de *P. coloratum* colectadas en una amplia zona geográfica de la Argentina difieren en su rango de plasticidad fenotípica, dado que provienen de regiones con marcadas diferencias en su régimen hídrico. Este capítulo experimental constituye un avance en la identificación, cuantificación y comprensión de la variabilidad en las respuestas plásticas de especies forrajeras con aptitud de implantación en ambientes sujetos a restricciones hídricas.

2.2 Objetivos particulares

- Evaluar diferencias en plasticidad fenotípica en condiciones de estrés por sequía en el estadio de plántula entre variedades de la especie forrajera megatérmica *Panicum coloratum*.
- Estudiar si las accesiones dentro de cada variedad de *Panicum coloratum* difieren en sus valores de plasticidad fenotípica al estrés por sequía en el estadio de plántula.
- Determinar si la plasticidad fenotípica al estrés por sequía de accesiones de *Panicum coloratum* colectadas en diferentes regiones, se relaciona con los valores absolutos y/o con la variabilidad interanual de la temperatura y precipitación media anual de sus respectivos sitios de origen.

2.3 Hipótesis

Hipótesis 1: Al ser originarias de zonas con diferentes regímenes de disponibilidad de agua, las variedades de *Panicum coloratum* (*i.e. makarikariense* y *coloratum*) difieren en su plasticidad fenotípica al estrés por sequía en el estadio de plántula.

Hipótesis 2: Las accesiones dentro de las dos variedades de *Panicum coloratum*, colectadas en diferentes regiones de la Argentina, difieren en su plasticidad fenotípica al estrés por sequía en el estadio de plántula.

Hipótesis 3: La magnitud de la plasticidad fenotípica al estrés por sequía en plántulas de distintas accesiones de *Panicum coloratum* está más relacionada a la variabilidad interanual en precipitación media anual y temperatura de sus sitios de recolección, que a los valores medios de precipitación y temperatura.

2.4 Materiales y métodos

En este experimento se utilizaron plantas de ocho accesiones diferentes, provenientes de las dos variedades de *Panicum coloratum* L. (var. *coloratum* y var. *makarikariense*). Las plantas fueron colectadas durante 2006 y 2007, en diferentes campos ganaderos de la Argentina, y luego instaladas como colección en la Estación Experimental Rafaela del INTA (Cuadro 2.1), donde las variedades fueron plantadas con una separación de 4 kilómetros para evitar posibles entrecruzamientos. Las malezas fueron controladas manualmente y las parcelas fertilizadas anualmente con urea (150 kg/ha N) en primavera, siendo cortadas cada vez que se consideró necesario debido a la acumulación de material vegetal. Seis plantas madres de cada una de las accesiones (48 plantas por variedad) fueron seleccionadas y sus semillas recolectadas durante el verano de 2013.

Para cada sitio de origen, se presentan valores promedio de temperatura media diaria y precipitación acumulada anual (2001-2010; Fuente: Servicio Meteorológico Nacional), con los cuales se estimó un índice de heterogeneidad (IH):

$$IH (\%) = \left(\frac{Max-Min}{Max} \right) * 100$$

donde Max y Min son los valores máximos y mínimos, respectivamente, de la temperatura media diaria o la precipitación acumulada anual de una serie de 10 años en cada sitio. Cuando mayor es el valor, mayor es la variación ambiental en el sitio de recolección.

Cuadro 2.1 Características ambientales de los sitios de recolección de accesiones de *Panicum coloratum* correspondientes a las variedades *makarikariense* y *coloratum*.

Variedades	<i>Makarikariense</i>				<i>coloratum</i>			
	BR	DF	ER	L14*	CS	CU	EM	UL
Accesiones	BR	DF	ER	L14*	CS	CU	EM	UL
Años bajo pastoreo	10	12	5	0	5	9	3	12
Sitio de origen	Corrientes	Córdoba	Corrientes	Santa Fe	Buenos Aires	Entre Ríos	La Pampa	La Pampa
Coordenadas geográficas	29°11'S	30°25'S	29°11'S	31°11'S	35°34'S	32°29'S	37°83'S	37°S22'O
	58°04'O	64°21'O	58°04'O	61°29'O	58°01'O	58°14'O	64°43'O	64°S53'O
Precipitación acumulada (mm)	1379	620	1379	1039	959	1177	595	649
Heterogeneidad interanual para precipitación (%)	60	50,3	60	66	49,8	59,7	64,7	64,7
Temperatura media (°C)	20,2	16,6	20,2	18,4	15,8	18,2	15,5	15,5
Heterogeneidad interanual para temperatura (%)	6,2	8,9	6,2	7,3	6,9	5,3	10,3	10,3

*(Selección por mayor peso de semilla a partir de DF y ER) (Armando et al. 2013, Giordano et al. 2013)

El experimento fue llevado a cabo en condiciones de invernadero, la temperatura media diaria fue 28,5 °C ($\pm 2,2$) y la humedad relativa del 50% (± 22). Las semillas colectadas se limpiaron y 40 semillas de cada planta madre fueron puestas a germinar en cajas de Petri con agua destilada, para generar familias de medios hermanos. Las cajas de Petri fueron colocadas en invernadero el 1 de enero de 2014. Cuando las semillas tuvieron radícula y al menos una hoja, 21 medios hermanos por cada planta madre fueron seleccionados (21 medios hermanos \times 6 plantas madre \times 8 accesiones = 1008 plántulas), pesadas y transplantadas a potes de 400 cc llenos con suelo colectado en la Estación Experimental INTA Rafaela (*Argiudol* típico). Al momento del trasplante, las plántulas fueron seleccionadas de tamaño homogéneo, para evitar efectos en las mediciones posteriores meramente debidos a diferencias en el tamaño inicial de los individuos (Poorter et al. 2011). Y al final del experimento, el peso seco promedio de las plántulas fue de 0,05 g, resultando el tamaño de maceta adecuado para el normal crecimiento de las plantas en ambos tratamientos: el valor de biomasa total por volumen de enraizamiento fue de 0,125 g/L, siendo 8 veces menor a la relación mínima necesaria sugerida para experimentos similares (1 g/L) (ver detalles en Poorter et al. 2012).

Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado, con 7 réplicas, cada réplica correspondiente a un día de trasplante. Cada bloque contuvo 3 medios hermanos, uno para el tratamiento control y dos para el tratamiento sequía. En este último tratamiento, la planta extra fue colocada para ser utilizada como reemplazo en caso de muerte de una de las plántulas en el tratamiento de sequía (3 medios hermanos \times 7 bloques = 21 medios hermanos). En cada bloque, las macetas fueron cambiadas de posición cada 2 días para así evitar los efectos de borde. Durante los primeros 15 días luego del trasplante, las plantas fueron regadas diariamente con agua de la canilla para asegurar su establecimiento. Cuando las plantas tuvieron al menos 3 hojas expandidas, los tratamientos de control y sequía fueron aplicados durante 15 días, comenzando el día 1 con el bloque 1 y los siguientes días con los bloques correspondientes, hasta el bloque 7. Los tratamientos de control consistieron en mantener la humedad del suelo, mediante la aplicación diaria de agua, mientras que el tratamiento de riego fue impuesto mediante la suspensión completa del riego.

Para evaluar el efecto de los tratamientos en el contenido relativo de agua en el suelo, al momento de la cosecha se tomaron 5 macetas al azar de cada tratamiento, su suelo fue colectado. Las muestras del suelo fueron divididas en dos estratos (superior: de 0 a 5 cm; inferior: de 5 a 10 cm) y colocadas en contenedores de aluminio previamente pesados. Los contenedores con el suelo fueron pesados inmediatamente y puestos en una estufa a 105°C por al menos 48 horas. Después de ello, los contenedores fueron pesados nuevamente y el contenido de agua del suelo fue estimado como la diferencia entre el peso seco y húmedo del suelo. El contenido gravimétrico de agua en el suelo fue asimismo obtenido como el cociente entre el contenido de agua en el suelo (g) y el peso seco del suelo en cada muestra (g).

Quince días después del comienzo de los tratamientos, los bloques fueron cosechados secuencialmente, en el orden en el que fueron transplantados. Las plantas fueron extraídas de las macetas y las raíces fueron lavadas cuidadosamente. Las plantas fueron separadas en raíces, láminas y vainas. Todas las láminas de cada planta fueron escaneadas y las imágenes procesadas para obtener el área foliar. Raíces, vainas y láminas se coloraron en bolsas de papel, llevadas a estufa a 60°C y pesadas al menos 48 horas posteriores. Se evaluó el impacto de las condiciones de sequía en los parámetros morfológicos básicos

que definen el crecimiento de la plantas (siguiendo el modelo clásico propuesto por Hunt 1978; ver también Lambers y Poorter 1992), a saber: proporción de área foliar (PAF; cm^2/g) (*i.e.* el cociente entre el área foliar y el peso total de la planta), el área foliar específica (AFE; cm^2/g) (*i.e.* el cociente entre el área foliar y el peso de las láminas), la relación biomasa aérea/subterránea (A/S; g/g) (*i.e.* peso de láminas y vainas sobre el peso de la raíz) y la relación lámina/vaina (L/V; g/g).

Para cada una de las variables, el índice de plasticidad fenotípica fue estimado como (Valladares et al. 2006):

$$rd_{ij \rightarrow i'j'} = |(x_{i'a100} - \bar{x}_{a0}) / (x_{i'a100} + \bar{x}_{a0})|$$

donde

$x_{i'a100}$ es el valor del individuo i de la familia de medios hermanos a en el tratamiento de control

\bar{x}_{a0} es el valor promedio de los individuos de la familia de medios hermanos a en el tratamiento de sequía.

En este experimento, el foco fue puesto en la magnitud de la plasticidad, esta es la razón por la cual sólo el valor absoluto del índice de plasticidad es considerado. Este índice permite la comparación de la magnitud de la plasticidad de un carácter, independientemente de su escala de medición (Valladares et al. 2006).

2.5 Análisis estadístico

Los valores del contenido relativo de agua en suelo, fueron analizados con ANOVA (SAS Institute Inc. 2009). El factor estrato del suelo (superior o inferior) fue anidado dentro del factor tratamiento y los datos fueron transformados ($\ln x$) para cumplir con los requisitos de normalidad de residuos y homogeneidad de la varianza.

Los valores medios de los caracteres fueron analizados para determinar si las plantas efectivamente mostraron plasticidad fenotípica. Se aplicó ANOVA (SAS Institute Inc. 2009) con modelos mixtos, con familia como factor aleatorio y el resto como fijos (bloque, tratamiento, variedad y accesión). El factor familia fue anidada en accesión y ésta, anidada en variedad. Los efectos significativos de tratamiento a nivel de variedad y accesión se interpretaron como existencia de plasticidad fenotípica en cada uno de los casos (Pigliucci 2005).

Para comparar los índices de plasticidad entre variedades y accesiones, éstos se analizaron usando modelos mixtos con SAS (SAS Institute Inc. 2009), se aplicó la misma estructura de anidamiento que en el caso anterior. Bloque, variedad y accesión se consideraron como efectos fijos, y el factor familia se consideró como efecto aleatorio. El índice de plasticidad de la variable L/V fue transformado con raíz cuadrada para cumplir con los requisitos de normalidad de residuos y homogeneidad de varianza. En todos los casos, se consideraron significativas las diferencias cuando $p < 0,05$. El test post hoc utilizado para comparar entre poblaciones dentro de cada variedad fue LSD de Fisher, el nivel de significancia utilizado fue 5%.

Para determinar la variabilidad y las relaciones existentes entre accesiones y variedades, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) sobre los índices de plasticidad de los diferentes caracteres, utilizando INFOSTAT (2011).

Índices de correlación de Pearson fueron aplicados para estimar las correlaciones entre la temperatura media anual, la precipitación acumulada y los índices de heterogeneidad

(IH) estimados para cada factor climático (temperatura media y precipitación acumulada media) registradas en los sitios de colección de las accesiones.

Finalmente, índices de correlación de Pearson se aplicaron para estimar las correlaciones entre la plasticidad fenotípica de cada carácter por accesión y los valores medios y el IH de las variables climáticas. Para evaluar los índices de correlación se utilizaron niveles de significancia de $< 0,1$; $< 0,05$ y $< 0,01$.

2.6 Resultados

2.6.a Contenido gravimétrico de agua en suelo (w)

El contenido hídrico gravimétrico de agua en suelo en los dos tratamientos aplicados fue marcadamente diferente ($p < 0,001$), siendo los valores al final del experimento: control ($37\% \pm 2$) y sequía ($13\% \pm 1$). Asimismo, en el tratamiento de sequía se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en relación al estrato de suelo: el estrato inferior fue levemente más húmedo ($16\% \pm 1$) que el superior ($10\% \pm 1$); esta diferencia no se detectó ($p = 0,27$) en el tratamiento de control regado.

2.6.b Respuesta de las medias de los caracteres a los tratamientos

Como era de esperarse, las plántulas del tratamiento de sequía mostraron una reducción significativa ($p < 0,05$) en el área disponible para fotosíntesis (menores valores de PAF, AFE y L/V) y un incremento de la biomasa subterránea (reducción de A/S), en comparación con las plantas no expuestas a estrés (Fig. 2.1). En general, la var. *coloratum*, fue la que presentó mayores valores para todos los caracteres analizados (Fig. 2.1). A su vez, las accesiones de la var. *coloratum*, presentaron un rango mayor de valores entre ellas más que las de la var. *makarikariense* (Fig. 2.1). Los efectos tratamiento, variedad y accesión mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios de sus respectivos niveles para todas las variables (Fig. 2.1 a-h), excepto para variedad en AFE (Fig. 2.1 c y d) y accesión en A/S (Fig. 2.1 e y f). No hubo interacción de variedad ni accesión con tratamiento, salvo para L/V en accesión \times tratamiento (Fig. 2.1 g y h). En este análisis, el efecto significativo de tratamiento denota la existencia de plasticidad fenotípica para sequía en plántulas de *P. coloratum*, mientras que el efecto significativo de interacción determina, diferencias de plasticidad fenotípica entre variedades y/o accesiones.

2.6.c Índices de plasticidad de variedades y accesiones

El índice de plasticidad para PAF fue mayor en individuos de la var. *makarikariense*, indicando que las plantas de esta variedad son más plásticas que las de la var. *coloratum* ($p < 0,05$). Sin embargo, para todas las demás variables, los índices fueron similares entre variedades (Cuadro 2.2).

Dentro de cada variedad, diferencias significativas entre accesiones fueron evidentes para los índices de plasticidad de todas las variables, excepto A/S. Cuando se estimó un índice de plasticidad promedio de todas las variables por accesión, éstas difirieron en su magnitud de plasticidad, variando desde 0,15 a 0,20 (Cuadro 2.3), siendo ER la accesión más plástica y CS la menos plástica.

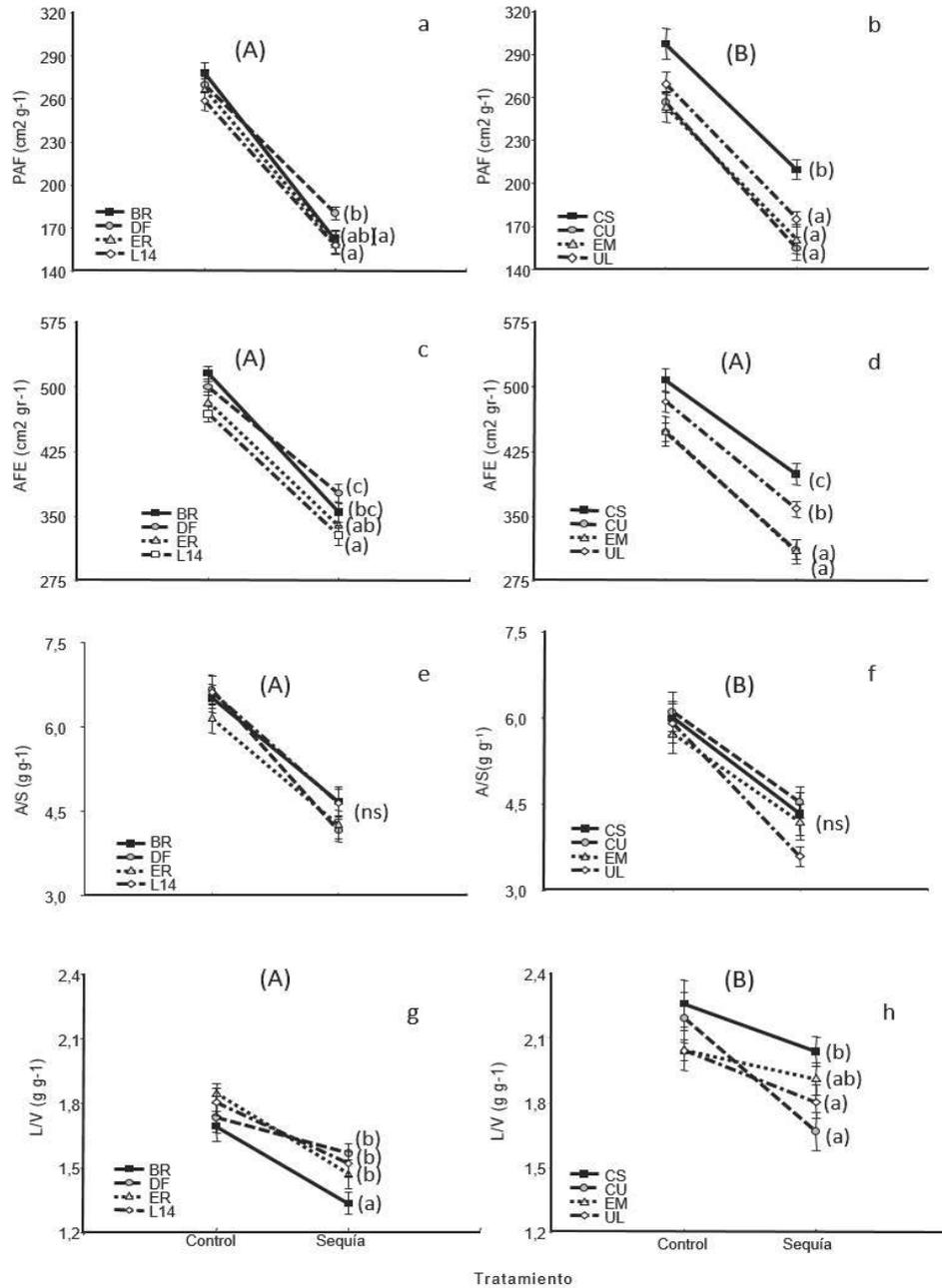


Figura 2.1 Normas de reacción con error estándar para proporción de área foliar (PAF), área foliar específica (AFE), aéreo/subterráneo (A/S) y lámina/vaina (L/V) en accesiones de las variedades *makarikariense* (a, c, e y g) y *coloratum* (b, d, f y h) en tratamientos control y sequía durante dos semanas. Entre paréntesis, en mayúscula, diferencias de valores medios entre variedades para cada carácter medido. Entre paréntesis, en minúscula, diferencias de valores medios entre accesiones (ns=no significativo).

Cuadro 2.2 Índices de plasticidad para las variedades *makarikariense* y *coloratum* con sus errores estándar, estimadas dos semanas después de la aplicación de los tratamientos control y sequía. Proporción de área foliar (PAF), área foliar específica (AFE), aéreo/subterráneo (A/S) y lámina/vaina (L/V). Letras diferentes indican diferencias significativas entre variedades ($p < 0,05$).

Variedad	PAF	AFE	A/S	L/V
<i>Makarikariense</i>	0,24 ^b (0,01)	0,17 (0,005)	0,21 (0,01)	0,12 (0,01)
<i>Coloratum</i>	0,22 ^a (0,01)	0,16 (0,01)	0,23 (0,01)	0,11 (0,01)

Cuadro 2.3 Índices de plasticidad y plasticidad fenotípica promedio para cada una de las cuatro accesiones en cada variedad, con sus errores estándar. Valores obtenidos después de dos semanas de tratamiento control y sequía. Se remarcan en negrita las accesiones de mayor y menor plasticidad, considerando las dos variedades. Dentro de cada columna y variedad, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Variedad	Accesión	PAF	AFE	A/S	L/V	Plasticidad promedio
<i>makarikariense</i>	BR	0,27 ^a (0,01)	0,19 ^a (0,01)	0,18 (0,02)	0,14 ^a (0,02)	0,19 ^a (0,01)
	ER	0,26 ^a (0,02)	0,18 ^a (0,01)	0,23 (0,02)	0,14 ^a (0,01)	0,20^a (0,01)
	L14	0,24 ^a (0,01)	0,18 ^a (0,01)	0,21 (0,02)	0,10 ^b (0,01)	0,18 ^{ab} (0,01)
	DF	0,19 ^b (0,01)	0,14 ^b (0,01)	0,23 (0,02)	0,08 ^b (0,01)	0,16 ^b (0,01)
<i>coloratum</i>	CU	0,26 ^a (0,02)	0,18 ^a (0,01)	0,19 (0,02)	0,15 ^a (0,02)	0,19 ^a (0,01)
	CS	0,18 ^c (0,02)	0,12 ^b (0,01)	0,21 (0,03)	0,09 ^b (0,01)	0,15^b (0,01)
	UL	0,22 ^{bc} (0,01)	0,15 ^b (0,01)	0,28 (0,02)	0,11 ^{ab} (0,01)	0,19 ^a (0,01)
	EM	0,23 ^{ab} (0,02)	0,18 ^a (0,01)	0,24 (0,03)	0,09 ^b (0,01)	0,18 ^a (0,01)

Los dos primeros componentes del ACP dieron cuenta de más del 90% de la variabilidad de los datos (71,2 % y 20,7 % para el primer y segundo componente,

respectivamente; Fig 2.2). Las variables AFE, PAF y L/V se correlacionaron positivamente entre sí, y tuvieron una correlación positiva con el primer eje. Por otro lado, A/S fue casi perpendicular a las primeras variables indicando correlación casi nula con ellas. En el biplot, la disposición de las accesiones no permitió agruparlas de acuerdo a las variedades de pertenencia. El material L14 (un material experimental seleccionado por mayor peso de semilla desde ER y DF), se ubicó entre las accesiones ER y DF y mostró una plasticidad promedio de 0,18, intermedio entre DF (0,20) y ER (0,16) (Cuadro 2.3).

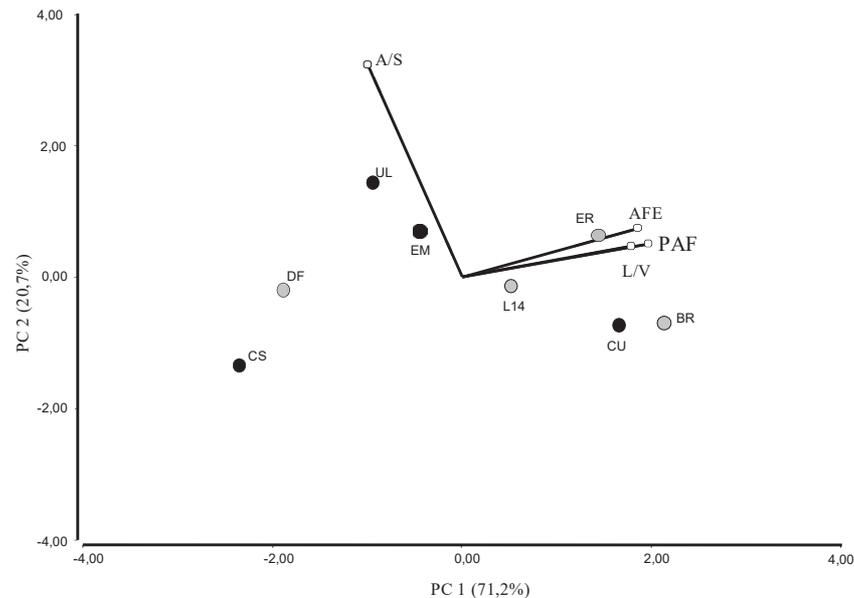


Figura 2.2 Biplot del análisis de componentes principales. Los vectores representan índices de plasticidad de PAF (proporción de área foliar), AFE (área foliar específica), A/S (aéreo/subterráneo) y L/V (lámina/vaina). Los datos de L/V fueron transformados por raíz cuadrada. Los vectores que poseen la misma dirección están relacionados, y los vectores perpendiculares no están relacionados. El largo de cada vector indica la proporción de variación asociada con el mismo. Los círculos grises representan a las accesiones de la variedad *makarikariense*, los círculos negros representan las accesiones de la variedad *coloratum*.

2.6.d Plasticidad fenotípica y condiciones climáticas

Del análisis de correlación entre los factores climáticos, se encontró que el IH de la temperatura media se correlacionó negativamente con la precipitación media anual acumulada y temperatura media anual ($P = -0,84$, $p = 0,01$; $P = -0,72$, $p = 0,04$, respectivamente). El IH de la precipitación media anual acumulada no se correlacionó con ningún factor.

En cuanto a los índices de plasticidad y los factores climáticos de los sitios de colección de cada accesión, se hallaron pocas pero fuertes correlaciones (Figura 2.3). La plasticidad de caracteres como PAF y L/V, se correlacionaron positivamente con la precipitación media anual acumulada, mientras que A/S se correlacionó negativamente con esta variable (Figura 2.3 a, g y e, respectivamente). De la misma manera, el IH de la precipitación correlacionó con los caracteres PAF, AFE y plasticidad fenotípica media

(Figura 2.3 b, d y j). Por otro lado, el IH de temperatura se correlacionó positivamente sólo con A/S (Cuadro 2.4). La temperatura media no correlacionó con ningún índice de plasticidad de ninguna variable (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Índices de correlación (P) y su significancia entre los diferentes caracteres y la media e índice de heterogeneidad (IH) de la temperatura media anual. ns = no significativo. Proporción de área foliar (PAF), aéreo/subterráneo (A/S), área foliar específica (AFE), lámina/vaina (L/V) y plasticidad fenotípica media (PF Media).

Caracter	Temperatura media anual	
	Media	Índice de heterogeneidad
PAF	0,65 (ns)	-0,38 (ns)
A/S	-0,62 (ns)	0,88 (0,004)
AFE	0,46 (ns)	-0,25 (ns)
L/V	0,59 (ns)	-0,69 (ns)
PF media	0,21 (ns)	0,15 (ns)

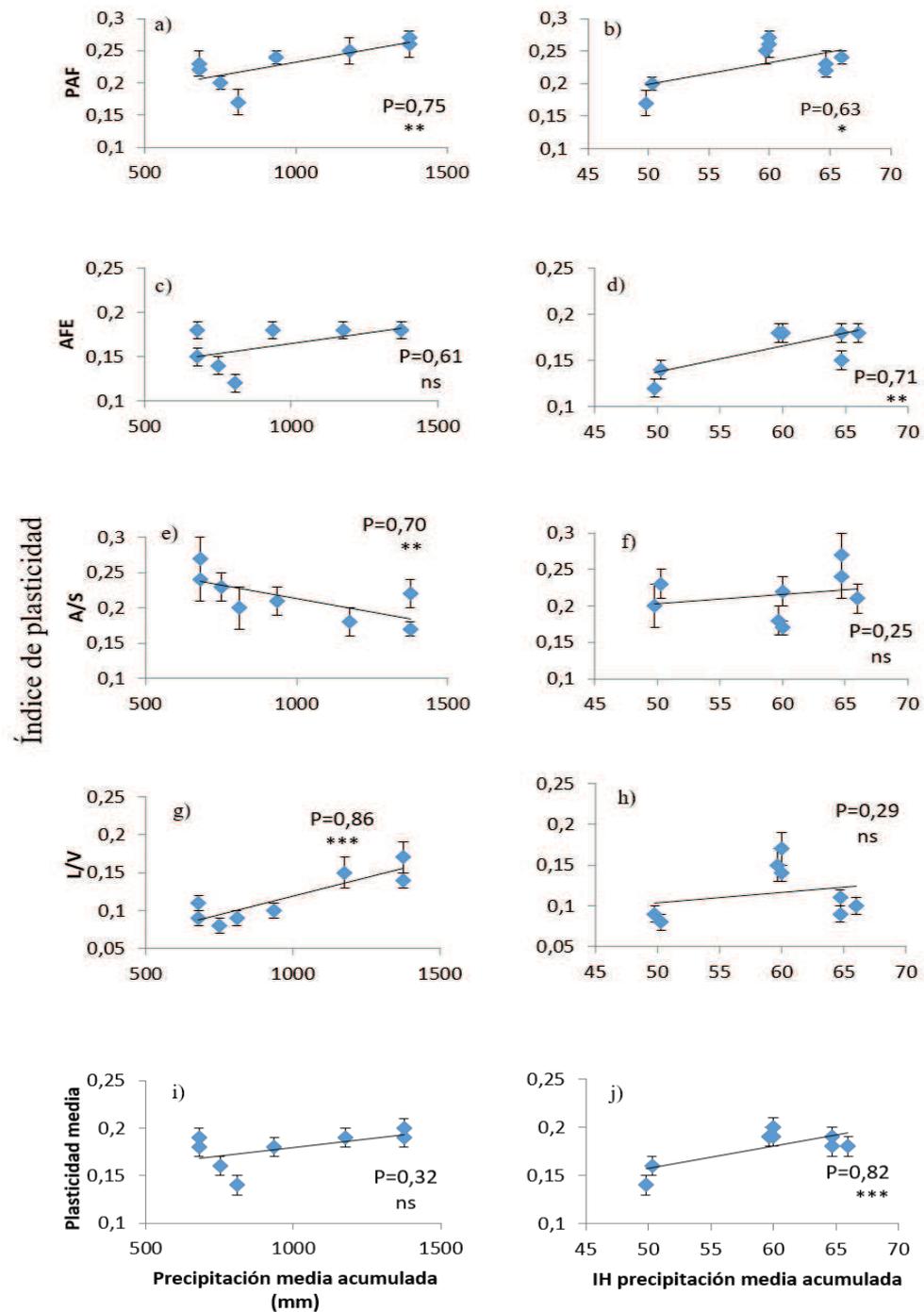


Figura 2.3 Correlación entre a) y b) proporción de área foliar (PAF), c) y d) área foliar específica (AFE), e) y f) aéreo/subterráneo (A/S), g) y h) lámina/vaina (L/V) e i) y j) índices de plasticidad promedio y la precipitación media anual acumulada (izquierda) y el índice de heterogeneidad de la precipitación media anual acumulada (derecha). (P = Índice de correlación de Pearson; ns, no significante; *, $p < 0,1$; **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,01$).

2.7 Discusión

Al momento de enfrentar un cambio ambiental, una respuesta habitual de los individuos es modificar su fenotipo para sobrellevarlo (Richards et al. 2006). Las plántulas de *P. coloratum* exhibieron notables cambios en su morfología bajo condiciones de estrés hídrico, es decir una marcada disminución relativa de su área foliar (en términos de PAF, AFE, A/S y L/V) (Fig. 2.1), implicando diferentes fenotipos asociados con la heterogeneidad ambiental. Esto se encuentra en línea con el modelo de “equilibrio funcional” (Poorter y Nagel 2000), que establece que en las plantas puede registrarse una alteración en la morfología y/o partición de biomasa, que redundaría en un aumento o disminución en el tamaño de órganos destinados a obtener el recurso limitante o reducir la pérdida de dicho recurso, respectivamente. De forma interesante, nuestros resultados coinciden con este postulado, ya que las respuestas observadas fueron claramente las esperadas bajo condiciones de estrés hídrico. Adicionalmente, cuando la plasticidad fue cuantificada a través de un índice, los valores estimados (desde 0,08 para L/V en la accesión DF, hasta 0,28 para A/S en la accesión UL), fueron comparables a los valores reportados por otros autores estudiando otras especies bajo estrés por sequía (Lázaro-Nogal et al. 2015; Kleine et al. 2017). Kleine et al. (2017), estimaron plasticidad fenotípica con el mismo índice que el utilizado en este trabajo, y sus valores de plasticidad son muy similares a los del presente estudio, excepto por AFE, cuyos valores fueron inferiores a los nuestros. Esto posiblemente se debe a diferencias en la severidad de los tratamientos aplicados (los riegos no se espaciaron por más de 4 días en su estudio), sumado a las características de las hojas de la especie estudiada (*Tanacetum vulgare*-hojas bipinnadas).

La primera hipótesis planteada en esta tesis postula que la var. *makarikariense* es más plástica ya que naturalmente proviene de ambientes con mayor variabilidad en cuanto a disponibilidad de agua, más precisamente de las llanuras de inundación del lago Makarikari, en Sudáfrica, donde los períodos de inundación y sequía se alternan marcadamente (Tischler y Ocumpaugh 2004). La var. *makarikariense* fue levemente más plástica en uno de los principales caracteres que integra la respuesta morfológica de las plantas en condiciones de sequía (*i.e.* PAF: la proporción de área foliar en relación a la biomasa total de la planta) (Cuadro 2.2). La proporción de área foliar define la superficie foliar transpirante, y junto con la regulación estomática, es un parámetro fundamental que define la economía del agua de las plantas (Poorter y Nagel 2000). La reducción en el PAF puede deberse a un menor AFE (hojas más densas y/o gruesas) y/o a una menor proporción de lámina en relación a la biomasa total de la planta (esta propiedad surge de la combinación de A/S y L/V); siendo las respuestas en AFE las que permiten mayor velocidad de respuesta ya que se asocia a la producción de órganos (*i.e.* hojas) con mayor tasa de recambio dentro de la planta (Lambers y Poorter 1992). Esta última variable muestra también una tendencia a mayor plasticidad en la var. *makarikariense* en relación a la var. *coloratum*, que a nuestro criterio, podría estar parcialmente influyendo en la disminución significativa de la proporción de área foliar en la planta (*i.e.* el PAF). Sin embargo, este resultado no necesariamente es definitivo, y debería interpretarse tomando en cuenta que al tratarse de una especie introducida en nuevos ambientes (donde fueron colectadas accesiones) pudieron estar sometidas a procesos de selección por las condiciones climáticas y de pastoreo propias de cada ambiente donde fueron colectadas.

La segunda hipótesis del presente capítulo se refiere a la existencia de variabilidad en plasticidad fenotípica a la sequía entre accesiones dentro de cada variedad. Efectivamente, se halló que, dentro de cada variedad, las accesiones mostraron diferencias en plasticidad en la mayoría de los caracteres (Cuadro 2.3). Esto coincide con

trabajos previos de nuestro grupo de trabajo en diferentes caracteres, tanto morfológicos como moleculares, donde reportamos variabilidad intravarietal, implicando variación entre accesiones (Armando et al. 2015, Burgos et al. 2018), y refuerza la idea de que la plasticidad es un carácter que puede presentar variabilidad genética (Pigliucci 2005, Pigliucci et al. 2006). Siendo la plasticidad fenotípica un carácter en sí mismo, estable en el genotipo de la planta y que se transmite a la descendencia, resulta lógico pensar que las diferencias en plasticidad entre accesiones se mantuvieran en las plantas establecidas en un jardín común, desde que la colección fue establecida años antes de que el experimento sea realizado. Esto refuerza la hipótesis de que las accesiones son genéticamente diferentes para plasticidad fenotípica frente a sequía. Las diferencias en plasticidad fenotípica podrían ser atribuibles a diferencias en el origen del germoplasma, efectos de deriva génica o errores de muestreo ya que no sabemos el tamaño de las poblaciones al momento de la introducción, es decir, factores en la carga genética no relacionada a la selección natural. Sin embargo, el manejo de esta especie en los sitios donde las accesiones fueron colectadas (siembra y mantenimiento a través de resiembra natural en los potreros de pastoreo), haría posible en pocos años una fuerte presión de selección a favor de incrementar (o disminuir) la plasticidad fenotípica de las accesiones aquí estudiadas. Hay ejemplos en la literatura que muestran rápida modificación de los valores de plasticidad en poblaciones naturales. Por ejemplo, Sultan and Matesanz (2015), demostraron que la especie invasora *Polygonum caespitosum* sufrió cambios en su plasticidad fenotípica para la disponibilidad de luz en un período de 11 años. De todas formas, es necesario obtener más evidencia empírica en pos de confirmar que las respuestas plásticas a la sequía estén directamente relacionadas con la variabilidad en la disponibilidad de agua en el ambiente. Adicionalmente, las plántulas de la accesión L14, una línea experimental seleccionada a partir de los materiales DF y ER (Giordano et al. 2013), mostró plasticidad fenotípica a la sequía intermedia entre sus líneas parentales. Este hallazgo implicaría que la plasticidad fenotípica es probablemente el resultado de la combinación parental.

El análisis de componentes principales de los índices de plasticidad sugiere nula o baja correlación entre las plasticidades de variables aéreas y subterráneas (Fig. 2.2), lo que indicaría una posible disociación entre las plasticidades de las partes aéreas y subterráneas. Asimismo, que algunas accesiones muestren predominancia de plasticidad para un carácter por sobre otros, determina la necesidad de establecer cuál sería el impacto de seleccionar para aumentar o disminuir por selección cada una de ellas en la capacidad de establecimiento de la pastura en ambientes con variabilidad hídrica. Este tipo de disociación entre órganos aéreos y subterráneos ha sido observada en valores medios de los caracteres en respuesta a otros estreses como la inundación (Striker et al. 2014), pero en base a mi conocimiento, este trabajo de tesis puede ser el primero en registrar una posible disociación entre la plasticidad fenotípica de caracteres aéreos y subterráneos en respuesta al estrés abiótico.

En especies forrajeras, esta aparente disociación entre la plasticidad de caracteres aéreos y subterráneos genera un gran desafío al momento de desarrollar estrategias de mejoramiento para generar líneas con mayor o menor plasticidad, capaces de lidiar con el estrés por sequía. De acuerdo a nuestros resultados, al ser expuestas a la sequía, las plántulas de *Panicum coloratum* pueden utilizar dos estrategias de modificación morfológica diferentes: disminuir la pérdida de agua mediante la reducción del área foliar (implica plasticidad en PAF, AFE y Lámina/vaina) y/o aumentar la capacidad de absorción de agua mediante la reducción de la relación aéreo/subterráneo (implica plasticidad para A/S) (Lázaro-Nogal et al. 2015, Larson y Funk 2016). Nuestros

resultados sugieren que, en *P. coloratum*, los cambios que ocurren en los caracteres al nivel de hoja, no necesariamente implican una modificación en la asignación de la biomasa de raíz. En lo que respecta a la magnitud de la plasticidad, si los índices de plasticidad de los caracteres de hoja son altos, no significa que el índice de plasticidad de la biomasa de raíz vaya a ser alto también. Desde el punto de vista de la hipótesis de caracteres funcionales, la sección aérea y subterránea son consideradas módulos diferentes, y se espera que sus caracteres estén menos correlacionados entre ellos que dentro de ellos (Murren 2002). Sería interesante de determinar, en futuros trabajos, si las plasticidades de los caracteres poseen el mismo patrón de correlación que los valores medios de los caracteres (Pigliucci 2003, Chen et al. 2014, Noreikiene et al. 2015).

En la última hipótesis del presente capítulo, argumentamos que los valores de plasticidad fenotípica podrían ser mayores entre accesiones provenientes de ambientes con mayor variabilidad climática y tal vez mayor amplitud de variación. Basamos este planteo en el hecho de que, en general, cuanto más variable es un ambiente, mayor es la plasticidad de los organismos que lo habitan (Matesanz et al. 2010, Baythavong 2011, Lázaro-Nogal et al. 2015). Aquí hemos reportado que las accesiones más plásticas en respuesta a la sequía (considerando el promedio de la plasticidad fenotípica de los caracteres estudiados) fueron aquellas provenientes de áreas con mayor variación en la precipitación media acumulada. Lázaro-Nogal et al. (2015), midieron otros caracteres relacionados a la respuesta a la sequía, y también encontraron que las poblaciones más plásticas del arbusto C3 perenne *Senna candolleana*, nativo de zonas semiáridas de Chile, fueron aquellas colectadas en ambientes con mayor variabilidad en la precipitación interanual. Sin embargo, una de las diferencias más sorprendentes de nuestro hallazgo, es que en el trabajo de Lázaro Nogal et al. 2015, los lugares más variables fueron los más áridos, mientras que en este trabajo, no hay una relación clara entre el índice de heterogeneidad de la precipitación acumulada anual con ninguna otra condición climática, al menos para el período considerado. Por lo tanto, teniendo en cuenta el resultado de ambos trabajos, podemos apreciar en principio, que la magnitud de la plasticidad fenotípica como respuesta a la sequía, está más probablemente relacionada a la variabilidad en la disponibilidad de agua en determinado ambiente, independientemente de la precipitación media anual acumulada (Fig. 2.3). La falta de coincidencia entre los diferentes trabajos que han intentado encontrar un patrón para explicar la variación en plasticidad (Münzbergová et al. 2017), utilizando como variables explicativas los valores medios de temperatura y/o precipitación, podría ser resuelto si los autores consideraran la posibilidad de agregar la variabilidad del factor ambiental correspondiente como una de ellas.

Por otro lado, el hecho de que la plasticidad fenotípica se relacione con la heterogeneidad ambiental, lleva a cuestionar si este carácter cumple una función de adecuación del fenotipo a los climas predominantemente secos, o si poseer plasticidad es una adaptación en sí misma, que permite la supervivencia en ambientes variables en cuanto a la disponibilidad de agua. La evidencia que apoya el supuesto de que la plasticidad fenotípica funciona como un mecanismo de adaptación a ambientes variables se incrementa (Matesanz et al. 2010, Lázaro-Nogal et al. 2015, Ho y Zhang 2018) y en gran parte los resultados obtenidos en este capítulo aportan nueva evidencia en tal sentido, ya que las accesiones con mayor plasticidad fenotípica media no son las que provienen de zonas más áridas, sino más variables en cuanto a precipitaciones. Estos resultados llevan a pensar que tal vez, para las plantas, exista una gran diferencia, desde el punto de vista fisiológico-morfológico entre crecer en un ambiente predominantemente seco o húmedo con precipitaciones regulares y un ambiente seco o húmedo, pero con

precipitaciones irregulares. Generalmente se asume que, si un organismo es plástico, es asimismo tolerante al estrés. Sin embargo, la asunción de una relación directa entre plasticidad fenotípica a la sequía y tolerancia a ambientes predominantemente secos debería ser reconsiderada a partir de los resultados de este trabajo. El mensaje principal que surge del análisis de mis resultados y su comparación con la bibliografía existente, es que tolerancia (considerada como la capacidad de mantener el crecimiento en condiciones adversas) y plasticidad (considerada como la capacidad de modificar el fenotipo en respuesta a los cambios ambientales) sean dos caracteres con diferente función en la estrategia de vida de las plantas. Indudablemente existe un límite funcional a la expresión de la plasticidad fenotípica, donde, frente a condiciones permanentes de baja disponibilidad hídrica, sea menos costoso la adquisición de caracteres morfológicos permanentes, y ser poco plásticas, o plásticas sólo para determinados caracteres (como biomasa aérea/biomasa subterránea en nuestro caso) para los eventos raros de alta disponibilidad hídrica. Mientras que en ambientes donde la inestabilidad hídrica es alta, sea más económico desde el punto de vista ecofisiológico responder plásticamente con caracteres de rápida respuesta y no tan costosos energéticamente (AFE y PAF) ante cada nueva situación hídrica.

Este trabajo muestra información interesante en relación a la existencia de plasticidad fenotípica para sequía entre las accesiones de *P. coloratum*. Aquí también se muestra la posible diferenciación entre accesiones como consecuencia de los factores climáticos. La ventaja de poseer o no plasticidad fenotípica para sequía en la etapa de implantación y en la persistencia de un cultivar debería ser evaluada. Para esto, también es necesario y recomendable cuantificar la variabilidad genética de esta plasticidad, así como también la heredabilidad de este carácter para determinar la posibilidad de llevar adelante selección por plasticidad fenotípica, temas que se desarrollan en el siguiente capítulo de la tesis.

Heredabilidad y ganancia genética para selección por plasticidad fenotípica

3.1 Introducción

El mejoramiento genético es una actividad que ha sido llevada a cabo por miles de años, en distintas partes del mundo, logrando la domesticación de muchas especies vegetales y obtenido cultivares conocidos y muy productivos, tanto para alimentación humana como animal (Brown y Caligari 2009). Durante los últimos años, el foco del mejoramiento ha sido puesto en la generación de cultivares tolerantes al estrés. En un contexto en el que la demanda de tierras productivas se incrementa, la necesidad de incorporar nuevas superficies para la producción de alimento lleva a que se exploren nuevas alternativas en cuanto a pasturas para alimentación animal (Acquaah 2010). Las especies vegetales capaces de tolerar estrés hídrico, salinidad y altas temperaturas son las más deseadas. Esto es especialmente relevante en Argentina, donde la cría de ganado, una de las principales actividades económicas del país, ha sido desplazada hacia áreas marginales donde el suelo y el clima son poco favorables para la utilización de las pasturas tradicionales. En este estado de situación, el desarrollo de nuevos cultivares, y la utilización de nuevas especies con tolerancia natural a este tipo de ambientes, ha resultado en el surgimiento de programas de mejoramiento gubernamentales, privados y de participación mixta, focalizados en especies forrajeras no tradicionales, como las especies forrajeras megatérmicas.

Generalmente, cuando son orientados a la tolerancia a sequía, los programas de mejoramiento tradicionales tienen por objetivo obtener plantas capaces de sobrevivir y producir cantidades aceptables de biomasa en ambientes restrictivos. En este caso, las plantas son evaluadas y se estima la heredabilidad y la variabilidad genética, en diferentes caracteres relacionados a la producción, ya sea de biomasa o de semillas en situaciones de estrés hídrico. Otros programas, utilizan herramientas biotecnológicas para focalizarse en procesos fisiológicos y bioquímicos e identifican genes y/o marcadores moleculares involucrados en diferentes aspectos de la tolerancia a sequía (Hu y Xiong 2014). Estos generalmente se focalizan en caracteres cuya medición es muy costosa, demandante en tiempo o difíciles de determinar en experimentos a pequeña escala, y por lo tanto, son difíciles de mejorar mediante técnicas tradicionales (Brown y Caligari 2009).

Panicum coloratum, es un pasto forrajero de fotosíntesis C4 con buena producción de biomasa, que ha sido incluido en los programas de mejoramiento cuyo objetivo es generar cultivares para ambientes que habitualmente presentan condiciones de estrés hídrico. Dada la amplitud geográfica donde esta especie puede ser utilizada, la diversidad de ambientes y de condiciones climáticas/edafológicas que se encuentran son muy variadas. El mejoramiento genético intenta responder a las demandas ambientales particulares de cada zona, por lo que surge entonces el desafío de encontrar variedades capaces de crecer en cada una de ellas, desde zonas con bajas precipitaciones, hasta las zonas más húmedas, pero con regímenes de precipitaciones más inestables (Magliano et al. 2015). Los resultados obtenidos en el capítulo anterior de esta tesis, sugieren que los genotipos plásticos para sequía, presentan una opción muy interesante para ser utilizados en zonas con precipitaciones variables. Si futuros trabajos confirman en condiciones de campo, que el comportamiento de los genotipos plásticos es ventajoso para lograr el éxito de la implantación de las pasturas de *Panicum coloratum*, sería de gran utilidad contar con información de cuán factible es realizar selección genética de la plasticidad fenotípica en el marco de un programa de mejoramiento.

Para determinar si la plasticidad fenotípica en una población bajo estudio puede ser modificada por selección, y para establecer cuáles serían los mejores métodos y estrategias de selección a utilizar, debe contarse con información sobre la distribución de

su variabilidad genética, identificando individuos más o menos plásticos, para poder seleccionar los mejores. El número de individuos en una población, así como su diversidad genética, tienen un impacto directo en la cantidad de variabilidad genética de dicha población (Fehr 1987). En general, las poblaciones constituidas a partir de varios progenitores diferentes son en general mucho más variables que las formadas a partir de pocos progenitores o de individuos muy relacionados entre sí. A su vez, la cantidad de autopolinización puede influenciar la varianza genética entre individuos. A medida que el nivel de endogamia se incrementa, la magnitud de la varianza genética entre individuos dentro de una familia disminuye (Fehr 1987). En línea con esto, al ser *P. coloratum*, una especie de polinización abierta (alógama), se espera que, en las variedades *makarikariense* y *coloratum*, la varianza genética entre individuos dentro de familias sea alta y en mayor proporción que la varianza entre familias.

A fin de conocer cuál es el nivel de control genético de los caracteres, y cuál podría llegar a ser la factibilidad de seleccionar de forma efectiva un carácter, también es necesario estimar la heredabilidad en sentido estricto. Con esta estimación es posible conocer qué proporción de la variabilidad corresponde a genes con efecto aditivo, y con ella estimar cuál sería la ganancia genética, al utilizar diferentes intensidades de selección (Falconer 1990).

En ese sentido, son realmente escasos los estudios biológicos dedicados a determinar cuál es la heredabilidad de la plasticidad fenotípica. Los que pueden encontrarse en la literatura, fueron realizados sobre especies modelo como *Drosophila* que estimaron la heredabilidad de la plasticidad fenotípica del tamaño del tórax y largo de alas en respuesta a diferentes temperaturas (Scheiner y Lyman 1983, Scheiner et al. 1991), y también en *Rana* (anfibios) donde se estimó la heredabilidad de la plasticidad de caracteres relacionados al tamaño del cuerpo, en respuesta a ambientes con y sin predadores (Relyea 2005). Los valores de heredabilidad reportados son generalmente bajos, y siempre menores que la heredabilidad de los caracteres sobre los cuales se estima plasticidad. Hasta el momento, sólo un trabajo (Zeng et al. 2017) ha hallado valores altos de heredabilidad para plasticidad fenotípica. Este trabajo se realizó en plántulas de 14 especies leñosas de los bosques subtropicales de China, donde se registró la plasticidad fenotípica de altura de planta y diámetro de tallo en individuos mantenidos en dos viveros diferentes.

Esta falta de información es llamativa, principalmente porque la plasticidad fenotípica es un fenómeno ampliamente difundido en la naturaleza. Sin embargo, esto puede atribuirse por un lado, a la disparidad de formas en las que se cuantifica la plasticidad, por lo que se hace algo difícil establecer pautas de evaluación y análisis (Valladares et al. 2006), y por otro lado, a que la realización de los ensayos necesarios para obtener datos propicios para ser analizados suele ser de difícil realización.

Debido a esta falta de información, y a su uso promisorio en programas de mejoramiento genético, en el presente capítulo se propuso determinar cómo se distribuye la variabilidad genética para plasticidad fenotípica en caracteres morfológicos frente a variaciones en la disponibilidad de agua, entre y dentro de las familias de medios hermanos de *Panicum coloratum*, determinar su heredabilidad, y estimar la ganancia genética que se obtendría si se realizara selección para modificar la magnitud de la plasticidad fenotípica.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar la distribución de la variabilidad genética de la plasticidad fenotípica en caracteres morfológicos frente a variaciones en la disponibilidad de agua en el estadio de plántula.
- Estimar la heredabilidad en sentido estricto de la magnitud de plasticidad fenotípica en caracteres morfológicos en respuesta a la variación en disponibilidad de agua al estado de plántula y para la media de los caracteres en los dos ambientes evaluados.
- Calcular la ganancia genética que se obtendría de realizar selección con intensidades de 15% y 20% para aumentar y disminuir la plasticidad fenotípica frente al estrés por sequía en las plántulas de *Panicum coloratum*.

3.3 Hipótesis

Hipótesis 4: En *Panicum coloratum*, la distribución de la variabilidad genética de la magnitud de la plasticidad fenotípica es mayor entre individuos pertenecientes a la misma familia de medios hermanos (dentro de familias) que entre las familias.

Hipótesis 5: En *Panicum coloratum*, los valores de heredabilidad para la magnitud de plasticidad fenotípica de un carácter, son más bajos que los valores de heredabilidad para la media de ese mismo carácter.

3.4 Materiales y métodos

Para poner a prueba las hipótesis planteadas se utilizó la base de datos generada a partir del experimento del capítulo 2. En dicho experimento, se evaluaron 48 familias de medios hermanos de las variedades *makarikariense* y *coloratum* de la planta forrajera *Panicum coloratum* (24 familias por variedad). Se trabajó con plántulas, que fueron expuestas a tratamientos de control y sequía, para evaluar su respuesta plástica en caracteres morfológicos. El ensayo se realizó en invernadero (detalles experimentales en el Capítulo 2).

En los estudios de plasticidad la situación ideal es trabajar con clones, para asegurar que se está sometiendo al mismo genotipo a diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, en este proyecto se planteó trabajar sobre caracteres de plántula y no pueden obtenerse clones en ese estadio, la opción más adecuada fue utilizar medios hermanos como unidades experimentales. Debido a que la especie posee reproducción alógama, es posible coleccionar semillas provenientes de una misma planta madre. De esta forma, se asume que los individuos comparten al menos el 50% de la información genética proveniente de la madre, mientras que los padres se presumen desconocidos y su participación en la fecundación es al azar.

Dado que *Panicum coloratum* es una especie forrajera alotetraploide (Young 1994), de polinización abierta, con bajo nivel de apomixis y herencia disómica, puede ser considerada como diploide desde el punto de vista de la genética estadística (Gardner 1963).

En las familias de medios hermanos, la covarianza es la varianza de las medias de los grupos de medios hermanos y corresponde a un cuarto de la varianza aditiva (Falconer, 1990). Así, en este estudio se propone un diseño con familias de medios hermanos (obtenidos de semillas que comparten la misma planta madre) de manera de poder utilizar el grado de parecido entre parientes para estimar la cantidad de varianza genética aditiva. Esta forma de estimación es frecuentemente utilizada para los cálculos de heredabilidad, tanto en sentido amplio (varianza genética/varianza fenotípica), como en sentido estricto (varianza aditiva/varianza fenotípica) (Nguyen y Sleper 1983).

Se utilizaron los datos de peso seco de láminas, vainas, raíces, peso seco total y área foliar de la planta completa. Para cada una de estos caracteres se estimó su plasticidad fenotípica frente al estrés por sequía (Valladares et al. 2006):

$$rd_{ij \rightarrow i'j'} = |(x_{i'a100} - \bar{x}_{a0}) / (x_{i'a100} + \bar{x}_{a0})|$$

donde

$x_{i'a100}$ es el valor del individuo i de la familia de medios hermanos a en el tratamiento de control

\bar{x}_{a0} es el valor promedio de los individuos de la familia de medios hermanos a en el tratamiento de sequía.

3.5 Análisis estadístico

Los datos del experimento resultaron desbalanceados a consecuencia de la muerte de algunas plantas. Debido a esto, se utilizaron (en lugar de ANOVA) métodos de verosimilitud para estimar los componentes de la varianza (Isik et al. 2017), para con ellos estimar luego la heredabilidad en sentido estricto (h^2). El modelo utilizado fue $X = \mu + Ac + F(Ac) + B + E$. Los efectos Accesoión (Ac) y bloque (B) se tomaron como fijos, mientras que familia (F) como aleatorio. E representa el error. Familia fue anidada dentro de accesoión.

La heredabilidad en sentido estricto (h^2) se estimó para los valores medios y para la plasticidad de cada carácter a partir del cociente entre la varianza aditiva (σ_A^2) y la varianza fenotípica (σ_P^2):

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

Por su parte, σ_A^2 se estimó como

$$\sigma_A^2 = 4\sigma_F^2$$

y σ_P^2 se estimó como

$$\sigma_P^2 = \sigma_F^2 + \sigma_E^2$$

Los términos σ_F^2 y σ_E^2 , son los efectos de familia y residual obtenidos a partir del análisis de la covarianza (Isik et al. 2017).

Para estimar los valores de los componentes de la varianza, necesarios para calcular la heredabilidad, y para determinar cómo se distribuye la variabilidad entre y dentro de accesiones, se realizó un análisis de la covarianza (asycov y covtest) con la función Proc mixed de SAS (SAS Institute Inc. 2009). El factor bloque se consideró como fijo. Por su parte, tanto familia como accesoión se consideraron aleatorios, y familia se anidó dentro de accesoión. La proporción de la distribución de la varianza entre y dentro de familias se estimó con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de variación entre familias} = \frac{\sigma_F^2}{\sigma_F^2 + \sigma_E^2} * 100$$

$$\% \text{ de variación dentro de familias} = \frac{\sigma_E^2}{\sigma_F^2 + \sigma_E^2} * 100$$

También se estimó la varianza de la heredabilidad, con el método de Dickerson (1969), y se le aplicó raíz cuadrada para obtener el error estándar de las heredabilidades estimadas (Isik et al. 2017). Las estimaciones de heredabilidad de los caracteres y de la plasticidad fenotípica de cada carácter se realizaron para cada variedad por separado.

Una vez obtenidas las heredabilidades de las plasticidades, se procedió a estimar las ganancias genéticas teóricas (ΔG) si se realizará una selección con intensidades de 15% y 20%, la ganancia genética para PF se estimó como

$$\Delta G = c * k * h^2 * \sigma_P,$$

(Nguyen y Sleeper 1983) donde

c = es el factor de control parental, adquiere en este caso el valor 2 porque se asume que se seleccionarían las plantas madre, en base a la performance media de su progenie, y se aislarían para su entrecruzamiento para producir la población mejorada (Sprague y Eberhart 1977, en Nguyen y Sleeper 1983).

k = Es el diferencial estandarizado de selección. También puede simbolizarse como i (Falconer, 1990). Se calcula como el cociente S/σ_P ,

donde:

S es el diferencial de selección entre la media de población seleccionada para el cruzamiento (PS) y la media de la población base (PB).

$$S = \bar{x}_{PS} - \bar{x}_{PB}.$$

Y σ_P es el desvío estándar fenotípico de la población base.

h^2 = la heredabilidad en sentido estricto (Nguyen y Sleeper 1983).

Entonces

$$\Delta G = c * \frac{S}{\sigma_P} * h^2 * \sigma_P$$

Y simplificando surge que:

$$\Delta G = c * S * h^2$$

3.6 Resultados

Todos los caracteres considerados mostraron plasticidad fenotípica en respuesta a los tratamientos aplicados (Fig. 3.1). Las normas de reacción muestran que en general, la respuesta fue similar en ambas variedades, aunque puede observarse que las familias de la var. *makarikariense* (Fig. 3.1; panel derecho) presentaron respuestas más uniformes que las familias de la var. *coloratum* (Fig. 3.1; panel izquierdo). Las respuestas al tratamiento de sequía variaron no sólo en magnitud (grado de inclinación de la recta), sino que también en el sentido de respuesta (Figura 3.1 *e, f* y *g*). En base a lo observado, puede afirmarse que entre las familias hay variabilidad para plasticidad fenotípica frente a sequía.

En ambas variedades, la generación de área foliar fue el carácter que presentó los valores más altos para la magnitud de plasticidad fenotípica (Cuadro 3.1). Por su parte, en la variedad *coloratum*, los valores más bajos de plasticidad fueron para biomasa de vaina y biomasa total, mientras que para la variedad *makarikariense*, el menor valor medio de plasticidad fue para el peso seco de raíz (Cuadro 3.1). Los rangos en los valores que asume la plasticidad fenotípica en los diferentes individuos dentro de cada variedad son muy amplios, para todos los caracteres considerados, que fue desde el 0 (individuos no plásticos) hasta valores cercanos a 0,9 (plasticidad casi máxima) (Cuadro 3.1).

Si bien la respuesta promedio es variable entre familias de medios hermanos (Fig. 3.1), la variabilidad en plasticidad fenotípica frente a condiciones de diferente disponibilidad de agua, en todos los caracteres analizados, se distribuye principalmente dentro de las familias y muy poco entre las familias estudiadas (Cuadro 3.1).

La proporción más alta de distribución de la variabilidad dentro de familias llegan hasta el 98%, como es el caso de la plasticidad fenotípica para la biomasa de lámina para la var. *coloratum* y la plasticidad fenotípica para el área foliar para la var. *makarikariense* (Cuadro 3.1), siendo mínima la proporción de la varianza entre familias.

En la condición control, las estimaciones de heredabilidad de los caracteres fueron similares para ambas variedades, mientras que, en la condición de sequía, los resultados difirieron mucho entre variedades, resultando mucho mayores para la variedad *makarikariense* (Cuadro 3.2). La heredabilidad de los caracteres medidos, resultó mayor que la heredabilidad de la plasticidad de los mismos (Cuadro 3.2).

Con respecto a la heredabilidad de la plasticidad fenotípica, puede observarse que la variedad *coloratum* es la que presenta mayores valores de heredabilidad en general. A su vez, el valor más alto de heredabilidad para plasticidad se observa en el carácter área foliar, en la variedad *coloratum*. Por su parte, los valores más bajos se registraron en la variedad *makarikariense*, donde la heredabilidad para plasticidad de biomasa de pseudotallo y biomasa total presentaron valores nulos (Cuadro 3.2).

En general, para la plasticidad fenotípica, los valores de heredabilidad obtenidos son bajos, por lo que, al realizar las estimaciones de la ganancia genética que se obtendría de realizar selección, las medias mejoradas de los valores de plasticidad, son similares a los originales (Cuadro 3.3). Como era de esperar, los mayores valores de ganancia genética se obtendrían de aplicar mayor intensidad de selección (15%). Los valores de ganancia genética (ΔG positivos) para aumentar la media son levemente mayores que los valores de ganancia genética para disminuirla (ΔG negativos).

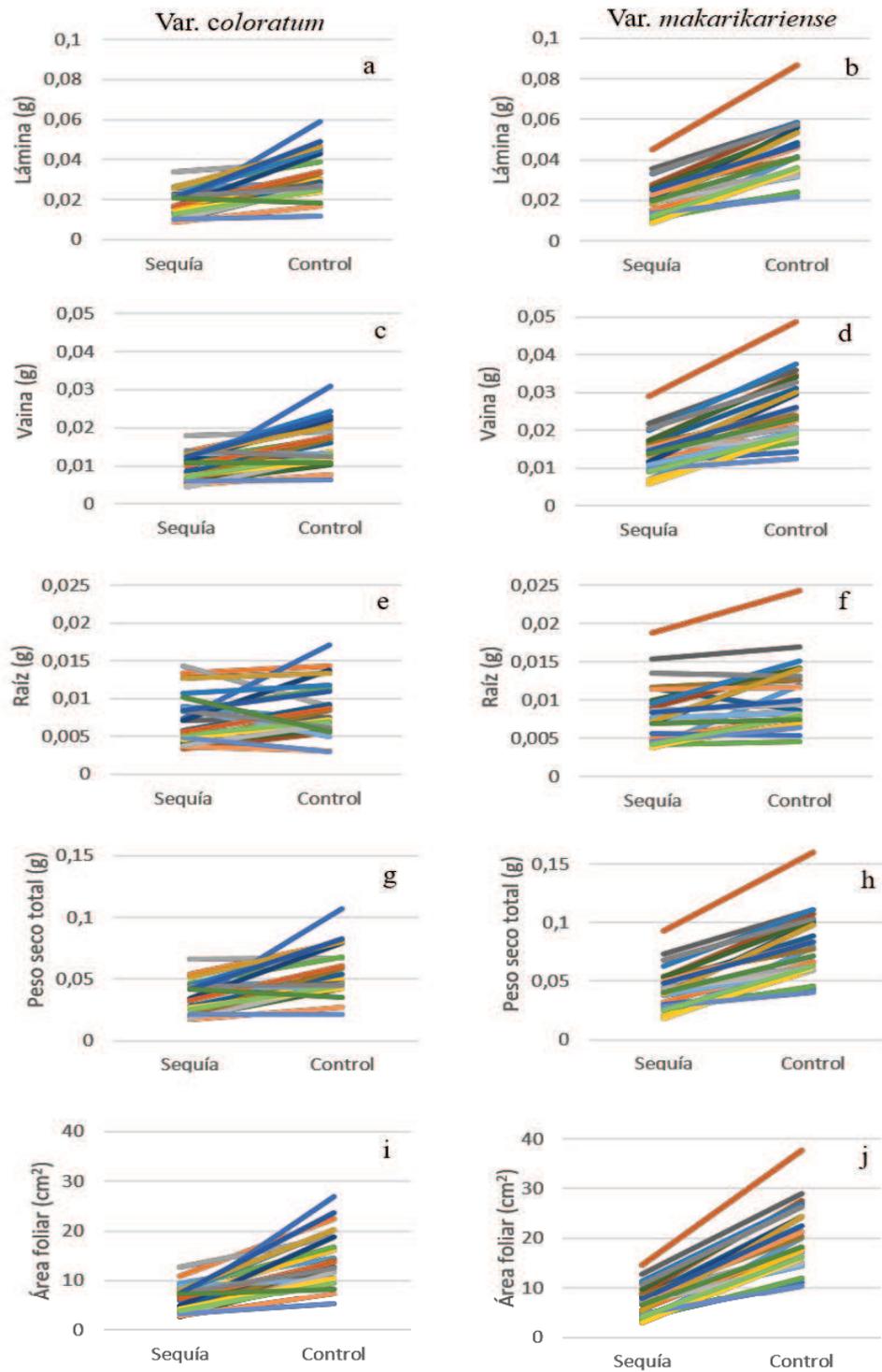


Figura 3.1 Normas de reacción en plántulas de 24 familias de medios hermanos por variedad en *Panicum coloratum* (variedades *coloratum* y *makarikariense*), luego de 15 días de tratamientos de sequía y control en condiciones de invernáculo. Se presentan los valores de biomasa de lámina (a y b), vaina (c y d), raíz (e y f), peso seco total (g y h) y área foliar por planta (i y j). Cada línea representa el promedio de la respuesta de una familia.

Cuadro 3.1 Valores promedio (\pm error estándar), rango, estimación de los componentes de varianza (S_f^2 entre familias y S_e^2 , dentro de familias) y distribución de los componentes de varianza para plasticidad fenotípica para sequía de los caracteres en plántulas de dos variedades de *Panicum coloratum*. Las medidas corresponden al final del experimento (15 días desde el comienzo del tratamiento).

Variedad	Carácter	P.F. promedio (\pm EE)	Rango de P.F	Estimación de los componentes de varianza		Distribución de los componentes de varianza	
				S_f^2	S_e^2	Entre familias	Dentro de familias
Coloratum	Lámina	0,34(\pm 0,02)	0-0,9	0,000821	0,04601	0,02	0,98
	Vaina	0,32(\pm 0,02)	0-0,93	0,001694	0,04227	0,04	0,96
	Raíz	0,33(\pm 0,02)	0-0,87	0,001734	0,04565	0,04	0,96
	Biomasa total	0,32(\pm 0,02)	0,02- 0,9	0,00132	0,04253	0,03	0,97
	Área foliar	0,40(\pm 0,02)	0-0,88	0,002182	0,0472	0,04	0,96
Makarikariense	Lámina	0,38(\pm 0,02)	0,01- 0,77	0,000957	0,03421	0,03	0,97
	Vaina	0,35(\pm 0,02)	0-0,78	0	0,03385	0	1
	Raíz	0,31(\pm 0,02)	0-0,9	0,000014	0,03961	0	1
	Biomasa total	0,35(\pm 0,02)	0-0,78	0	0,03207	0	1
	Área foliar	0,47(\pm 0,02)	0-0,82	0,000869	0,03983	0,02	0,98

A su vez, el sentido de la selección, es decir, si se selecciona para aumentar o para disminuir la plasticidad en un mismo carácter, modificarían la media en la distinta proporción. Este cambio va a depender de la intensidad de selección utilizada, de la heredabilidad del carácter, y de la media de las familias seleccionadas. Por ejemplo, en la variedad *makarikariense*, una intensidad de selección del 20% para aumentar la plasticidad fenotípica produciría un cambio en la media de plasticidad fenotípica de 2 puntos, mientras que la misma intensidad de selección para reducir la media, produciría un cambio de 3 puntos (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.2 Heredabilidad (h^2) para los caracteres en los tratamientos control y sequía, y heredabilidad para plasticidad fenotípica (PF) en plántulas de dos variedades de *Panicum coloratum*. EE: Error estándar.

Var	Variable	h^2 Sequía (\pm EE)	h^2 Control (\pm EE)	h^2 PF
Makarikariense	Lámina	1,02 (\pm 0,47)	0,60 (\pm 0,36)	0,11 (\pm 0,17)
	Vaina	0,98 (\pm 0,45)	0,55 (\pm 0,35)	0
	Raíz	0,97 (\pm 0,45)	0,80 (\pm 0,41)	0,001 (\pm 0,16)
	Biomasa total	1,08 (\pm 0,48)	0,66 (\pm 0,24)	0
	Área foliar	1,14 (\pm 0,49)	0,58 (\pm 0,35)	0,08 (\pm 0,24)
Coloratum	Lámina	0,27(\pm 0,32)	0,43 (\pm 0,36)	0,07 (\pm 0,15)
	Vaina	0,16 (\pm 0,30)	0,60 (\pm 0,42)	0,15 (\pm 0,20)
	Raíz	0,27(\pm 0,32)	0,50 (\pm 0,39)	0,15 (\pm 0,20)
	Biomasa total	0,26 (\pm 0,32)	0,54 (\pm 0,40)	0,12 (\pm 0,19)
	Área foliar	0,27(\pm 0,34)	0,52 \pm (0,4)	0,18 (\pm 0,22)

Cuadro 3.3 Valor medio de la plasticidad fenotípica (PF) de diferentes caracteres, heredabilidad en sentido estrecho (h^2) y estimación de la ganancia genética (ΔG) y de las medias mejoradas (MM) en caso de aplicarse intensidades de selección (i) del 20% y el 15%, para aumentar o reducir la media. EE (Error Estándar). Var: Variedad, *Mak*: *Makarikariense*, *Col*: *Coloratum*, L: Lámina, P: Pesudotallo, R: Raíz, BT: Biomasa Total; AF: Área Foliar.

Var	Car	PF (\pm EE)	h^2 (\pm EE)	ΔG aumento de la plasticidad			ΔG reducción de la plasticidad			MM		
				i=20%	i=15%	i=20%	i=15%	i=20%	i=15%	aumento de la plasticidad	Reducción de la plasticidad	i=20%
<i>Mak.</i>	L	0,38 ($\pm 0,02$)	0,11 ($\pm 0,17$)	0,034	0,04	-0,033	-0,031	0,41	0,42	0,35	0,34	
	P	0,35 ($\pm 0,02$)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R	0,31 ($\pm 0,02$)	0,001 ($\pm 0,16$)	4e ⁻⁴	4e ⁻⁴	3e ⁻⁴	3e ⁻⁴	0,31	0,31	0,30	0,30	
	BT	0,35 ($\pm 0,02$)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AF	0,47 ($\pm 0,02$)	0,08 ($\pm 0,24$)	0,028	0,033	-0,023	-0,022	0,49	0,50	0,44	0,44	
<i>Col.</i>	L	0,34 ($\pm 0,02$)	0,07 ($\pm 0,15$)	0,022	0,024	-0,021	-0,023	0,36	0,36	0,32	0,32	
	P	0,32 ($\pm 0,02$)	0,15 ($\pm 0,20$)	0,046	0,05	-0,045	-0,043	0,36	0,37	0,28	0,27	
	R	0,33 ($\pm 0,02$)	0,15 ($\pm 0,20$)	0,042	0,044	-0,044	-0,051	0,37	0,37	0,28	0,28	
	BT	0,32 ($\pm 0,02$)	0,12 ($\pm 0,19$)	0,038	0,041	-0,036	-0,039	0,36	0,36	0,28	0,28	
	AF	0,40 ($\pm 0,02$)	0,18 ($\pm 0,22$)	0,057	0,062	-0,051	-0,054	0,45	0,46	0,34	0,34	

3.7 Discusión

La magnitud de la variación morfológica en respuesta a los tratamientos con diferente disponibilidad de agua, es decir, la plasticidad fenotípica, resultó ser diferente aun entre individuos emparentados (es decir, entre familias de medios hermanos provenientes de la misma accesión dentro de una variedad) (3.1).

La magnitud de la respuesta fue más uniforme (*e.g.* peso seco total en var. *makarikariense*-figura 3.1 *h*) o más heterogénea (*e.g.* biomasa de raíz en var. *coloratum*-figura 3.1 *e*), dependiendo de la variedad o del carácter. Este resultado indica positivamente que puede haber un cambio en los valores de plasticidad fenotípica frente a una presión de selección determinada, siendo primero condición la existencia de un grupo de genotipos capaces de responder de forma diferente a un mismo set de ambientes (Matesanz et al. 2010).

La distribución de la variabilidad para un carácter complejo como es la plasticidad fenotípica, estimada entre y dentro de las familias, está en línea con la distribución de la variabilidad genética esperada para una especie alógama. Se confirma que la variabilidad genética es mayor entre individuos (dentro de familias) que entre las familias, corroborando lo planteado en la Hipótesis 4. Del mismo modo, que la mayor proporción de la variabilidad se halle dentro de las familias de medios hermanos (Cuadro 3.1), coincide con lo reportado por Young (1994), Maina (2012) y Armando (2014) para las variedades *coloratum* y *makarikariense* en caracteres de cuantificación más directa que la plasticidad fenotípica. En estos trabajos se halló que la distribución de la variabilidad es mayor dentro de las familias que entre las mismas, independientemente del carácter medido (número de raíces, número de hojas, porcentaje de retención de semillas, número total de semillas, número de macollos, peso seco de biomasa aérea, longitud de hoja, peso de 1000 semillas).

La distribución de la variabilidad genética debe ser tomada en cuenta al momento de planificar la obtención, el manejo y la conservación del germoplasma y para iniciar un programa de mejoramiento. Dado que la variabilidad para los caracteres en esta especie es mayor entre individuos, es conveniente conservar el germoplasma en forma de semillas ya que de esta forma se conserva un gran número potencial de individuos en poco espacio y con relativamente pocos recursos. A su vez, la colecta de nuevos materiales puede realizarse simplemente a partir de semillas de unas pocas plantas, dando como resultado un número grande de individuos diferentes entre sí. Si la especie fuera autógama, o tuviera un índice de apomixis alto, la forma de colecta y/o conservación del germoplasma debería ser diferente, conservando y/o colectando semillas y plantas vivas en mayor cantidad.

La distribución de la variabilidad influye, además, sobre la forma de selección que puede ser aplicada en caso de que se desee hacer mejoramiento genético por selección recurrente o cruzamientos de genotipos en particular (Falconer 1990). Al distribuirse la variabilidad en mayor medida entre individuos independientemente de la familia, la selección debería realizarse eligiendo para los cruzamientos los individuos con los valores fenotípicos deseados. Si la variabilidad hubiera sido en cambio más alta entre familias, para constituir los lotes de policruza se recomendaría seleccionar las plantas madres o individuos al azar de las familias cuyos fenotipos/genotipos sean acordes a los objetivos de mejoramiento.

Las estimaciones de heredabilidad de los caracteres resultaron de moderadas a altas, tanto cuando se calcularon en ambientes de baja disponibilidad de agua como de alta disponibilidad (Cuadro 3.2). No se halló un patrón entre las heredabilidades estimadas en los tratamientos, ya que, para ambas variedades, los valores en condiciones de control

fueron similares, pero no en condiciones de sequía. Esto se encuentra dentro de los resultados esperables, ya que la estimación de heredabilidad depende de los individuos evaluados y del ambiente en el cual se encuentran los individuos. Por lo tanto, cualquier cambio en los componentes de varianza afecta su estimación (Falconer 1990). Zeng et al. (2017) también hallaron diferencias en la heredabilidad en caracteres de plantas jóvenes de árboles, que crecieron en dos viveros diferentes. Estos autores concluyeron que, en el ambiente menos benigno, la varianza ambiental entre las réplicas de las plantas de familias fue más baja, por lo que los valores de heredabilidad resultaron mayores. Esto es lo que pudo haber sucedido con la variedad *makarikariense*, cuyos valores de heredabilidad fueron mucho mayores en el ambiente seco. Sin embargo, lo contrario ocurrió con la var. *coloratum*, donde los valores de heredabilidad en el ambiente menos benigno fueron más bajos. Es probable que las diferentes ambientes hayan influido de manera diferente en las relaciones de varianza en cada variedad. Young (1994), por ejemplo, obtuvo valores diferentes de heredabilidad en caracteres de plántula en *P. coloratum* var. *coloratum* al estimarla en dos años diferentes con diferentes tamaños de familia. Sin embargo, este autor no pudo discernir si las diferencias se debieron al efecto de año, familia, o al efecto combinado de año y tamaño de familia.

Si se tienen en cuenta los trabajos hechos en la misma especie por otros autores (Young 1994, Dreher 2011, Maina 2012, Armando 2014), puede verse que en general, para la especie, los valores de heredabilidad obtenidos para diferentes caracteres y diferentes estadios de la planta, son habitualmente de moderados a bajos. La heredabilidad estimada para, por ejemplo, peso seco aéreo de plántula, varió entre 0 y 0,54, dependiendo del método de cálculo y estadio de la planta en la que se realizó la estimación (Dreher 2011). Sólo en un trabajo realizado en *P. coloratum* var. *makarikariense*, donde se estimó la heredabilidad para peso fresco y peso seco de plántula en condiciones de salinidad, y para tolerancia a salinidad, los valores de heredabilidad fueron de moderados a altos (Cardamone, en preparación). En base a lo mencionado, podemos decir que, salvo por los estudios realizados en salinidad, los valores de heredabilidad para caracteres morfológicos en plántulas de este trabajo coinciden, en líneas generales con los valores hallados en otros estudios realizados en la misma especie. Por su parte, los errores estándar de las heredabilidades estimados aquí (Cuadro 3.2) son similares a los hallados en otros trabajos, tanto para los caracteres como para su plasticidad (Young 1994, Araújo y Coulman 2002, Relyea 2005), a excepción de los trabajos de Scheiner y Lyman (1989) y Scheiner et al. (1991), cuyas estimaciones de error estándar para heredabilidad de los caracteres y sus plasticidades fueron menores.

Por su parte, las heredabilidades resultaron bajas o muy bajas para la plasticidad fenotípica de los caracteres, y en algunos casos, como en dos caracteres de la var. *makarikariense*, resultaron nulas, indicando que, si bien existe variabilidad para plasticidad fenotípica, esta variabilidad no estaría determinada por efectos genéticos aditivos. Scheiner et al. (1991), realizaron ensayos con *Drosophila*, en donde cuantificaron la heredabilidad para la plasticidad fenotípica y para el valor medio del largo de tórax y alas. En su trabajo encontraron que en general, los valores de heredabilidad de la plasticidad, fueron un tercio del valor de la heredabilidad de las medias de los caracteres. En otro trabajo anterior (Scheiner y Lyman 1983), la heredabilidad de la plasticidad del tamaño del tórax en la misma especie, resultó ser un 50% menor que la heredabilidad del valor medio del carácter. De la misma manera, Relyea (2005), estimó las heredabilidades de distintos caracteres de renacuajos de *Rana sylvatica*, en dos ambientes diferentes, con predador y sin predador. A su vez, estimó la heredabilidad de la plasticidad fenotípica de los caracteres. Halló que los valores de heredabilidad para los

valores medios de los caracteres variaron entre ambientes sin un patrón claro, y que, a su vez, los valores de heredabilidad de plasticidad fenotípica, fueron menores que las de los valores medios de los caracteres. Zeng et al. (2017), determinaron la heredabilidad para los valores medios y la plasticidad fenotípica de altura y diámetro basal de plántulas de 14 especies leñosas del bosque subtropical de China, mantenidas por 7 meses en dos viveros diferentes. Hallaron que los valores de heredabilidad entre las medias obtenidas en los dos viveros y las plasticidades no presentaron un patrón claro de diferenciación entre sí, variando entre 0,03 y 0,77, siendo en su mayoría bajas. Nuestros resultados coinciden con lo hallado por Scheiner y Lyman (1983), Scheiner et al. (1991) y Relyea (2005), mientras que difieren con los resultados de Zeng et al. (2017) en cuanto a que las medias y las plasticidades presentan diferentes valores de heredabilidad, siendo las estimaciones de heredabilidad para la plasticidad fenotípica de los caracteres sustancialmente menores que las estimaciones para la heredabilidad de los caracteres en cualquiera de los ambientes considerados.

Según Falconer (1990) y Sadras y Slafer (2012), la magnitud de la heredabilidad depende de la relación que posea el carácter, con la aptitud reproductiva (número de descendientes fértiles) del organismo. Las heredabilidades más bajas son las de aquellos caracteres más relacionados con la aptitud reproductiva (Falconer 1990). Por ejemplo, Sadras y Slafer (2012), encontraron que el número de inflorescencias de las plantas tiene siempre menores valores de heredabilidad que el tamaño de la semilla. En particular, no sabemos qué relación podría tener la plasticidad fenotípica para caracteres morfológicos de plántula con la capacidad reproductiva de los individuos, pero remarca la falta de información respecto del rol de la plasticidad fenotípica como característica de la historia de vida de los individuos. Por otra parte, según Matesanz et al. (2010), las heredabilidades de los caracteres que poseen control genético complejo, también son bajas. Queda mucho trabajo por hacer aún para establecer cuál es la verdadera relación entre plasticidad fenotípica de los diferentes caracteres y aptitud reproductiva, como así también sobre cómo es el control genético de la plasticidad. De esta manera, en este primer trabajo que propone determinar la heredabilidad de la plasticidad fenotípica de un pasto perenne C4, los datos confirman nuestra hipótesis (Hipótesis 5) de que los valores de heredabilidad de plasticidad fenotípica son bajos y siempre menores a la heredabilidad de los caracteres sobre los cuales se mide la plasticidad. Estos resultados se encuentran en línea a su vez, con lo hallado por otros pocos autores en especies modelo (Scheiner y Lyman 1983, Scheiner et al. 1991, Relyea 2005) y aportan evidencia novedosa sobre la condición de la plasticidad fenotípica de ser un carácter que puede ser modificado por selección natural o artificial.

Con intensidades de selección moderadas, como las propuestas aquí (15% y 20%- Cuadro 3.3), se espera que la ganancia genética sea relativamente baja en el primer ciclo de selección, tanto para aumentar como para disminuir la plasticidad fenotípica. Por lo tanto, el cambio en los valores de la media poblacional no será grande. Sin embargo, debe considerarse que tal vez un cambio moderado en los valores plasticidad fenotípica, pueda tener una influencia importante en la expresión de los caracteres y en la morfología general de la planta frente a un evento de estrés por sequía.

En otros caracteres estudiados anteriormente en la especie, tanto morfológicos (número y peso de macollos, largo y ancho de hoja, longitud de caña, altura de plántula, número de hojas) como fisiológicos (porcentaje de retención de semilla) (Dreher 2011, Maina 2012, Armando 2014), los valores de ganancia genética fueron variables, variando los porcentajes de avance genético desde el 5% para peso de 1000 semillas (Armando 2014) a más del 53% en número de semillas (Maina 2012). Una mención especial puede

hacerse en relación a los caracteres de peso fresco en salinidad, peso seco en salinidad y tolerancia al daño por salinidad cuyas ganancias genéticas estimadas fueron altas, debido a que mostraron heredabilidades altas en condiciones de hidroponia (Cardamone, en redacción). En este último caso, los valores altos de heredabilidad se deban probablemente a una baja variabilidad ambiental, causada por las condiciones experimentales muy controladas bajo las cuales se desarrolló el ensayo.

Los resultados obtenidos en diversos trabajos en *Panicum coloratum*, sumados a los nuestros, indicarían que en la especie en general, el grado de control genético es diferente entre los caracteres, y que, en nuestro caso, para lograr avances importantes en la modificación de la plasticidad fenotípica media de una población bajo selección, serán necesarios varios ciclos de selección y evaluación. No se recomienda realizar selección con mayores intensidades de selección, ya que para ello se utilizarían muy pocos genotipos, y se correría el riesgo de que se produzca depresión por endogamia (Falconer 1990, Brown y Caligari 2009).

Para llevar adelante un programa de mejoramiento en función de la plasticidad fenotípica, la decisión de seleccionar genotipos más o menos plásticos, debe tomarse de acuerdo a las características del material con el que se cuenta, y del ambiente al cual se pretende destinar dicho material. De este modo deben tenerse en cuenta dos aspectos fundamentales de la expresión fenotípica como son la estabilidad y la interacción genotipo-ambiente. A modo de ejemplo, puede decirse que, si se cuenta con algunos materiales, que poseen baja plasticidad fenotípica para biomasa aérea (estable) y de alta producción (buena producción de biomasa tanto en condiciones de sequía como de buena disponibilidad hídrica), lo ideal es seleccionar estos genotipos estables. Por otra parte, si sabemos de antemano que el ambiente destino del material mejorado será inestable, con altas probabilidades de variaciones en el régimen de precipitaciones recibidas, entonces el objetivo de selección deberían ser individuos plásticos, capaces de responder al cambio ambiental y sobrevivir eventos de sequía a la vez que sacar provecho de los momentos de buena disponibilidad hídrica. Si en cambio, en el material disponible, todos producen la misma cantidad de biomasa aérea en sequía, pero algunos (más plásticos) se destacan por incrementar mucho su producción cuando se presenta un evento de disponibilidad hídrica, el objetivo del programa será seleccionar esas plantas más plásticas.

Sin embargo, debe profundizarse la evaluación y determinarse, de ser posible, si existe relación entre las plasticidades de los diferentes caracteres, que puedan llegar a ser limitantes o convenientes para la implantación y el crecimiento de la pastura, y en base a esto diseñar los objetivos de los programas de mejoramiento. En el capítulo 2, por ejemplo, el análisis de componentes principales sugiere que puede existir cierto grado de disociación entre las plasticidades los caracteres aéreos y subterráneos. Aun cuando la heredabilidad para la plasticidad fenotípica de los caracteres sea baja, si se quisiera realizar mejoramiento genético para ambientes variables en cuanto a disponibilidad de agua, podría pensarse que, por ejemplo, uno de los cultivares deseables podría ser aquel que en situaciones de sequía no disminuya su biomasa de raíz (o sea, con baja plasticidad para biomasa de raíz), y que reduzca de forma efectiva su área foliar para reducir las pérdidas de agua por transpiración (alta plasticidad en área foliar). Si las plasticidades de los caracteres aéreos y subterráneos son independientes entre sí, el programa de mejoramiento podría plantearse de varias formas, dependiendo del objetivo. En una de ellas, podría centrarse en el carácter considerado de más importancia, o en el que permita un mayor avance en menor cantidad de ciclos de selección, para obtener rápidamente un material apto para su evaluación a campo (p.e. seleccionando para mayor plasticidad en área foliar en condiciones de sequía). Si de esa evaluación surge la necesidad de seguir

mejorando el material, puede someterse a ese mismo a una nueva evaluación y selección sobre un segundo carácter de interés, como por ejemplo para disminuir la PF en biomasa de raíz. De la misma manera, otra metodología a emplear podría ser la de seleccionar los mejores genotipos para cada carácter en particular, cruzarlos, y evaluar su progenie para determinar cuáles son los que más se corresponden con el tipo deseado.

Si bien la selección para aumentar o disminuir la plasticidad fenotípica, según estos resultados, es posible, no debe descuidarse el hecho de que lo que se ha evaluado en este trabajo es plasticidad fenotípica para sequía y no tolerancia para sequía. En un trabajo realizado en tres especies de pastos C3 de la Patagonia, se reportó que las plantas más tolerantes a la sequía, son las menos plásticas (Couso y Fernández 2012). Si bien la interpretación parece ser a primera vista contraintuitiva con respecto al concepto de que la plasticidad fenotípica es un carácter adaptativo, debe prestarse atención a cuáles caracteres se les evalúa plasticidad y a cómo son las plantas desde su punto de vista constitutivo. Si una especie o accesión posee más biomasa aérea o más biomasa subterránea, muy probablemente las respuestas plásticas a un evento de sequía sean muy diferentes, considerándose tolerante la que menos modifique su morfología (menos plástica), y por ende, su tasa de crecimiento. Al mismo tiempo, debe tenerse en cuenta que los caracteres fisiológicos también son plásticos, y pueden llegar a ser muy importantes al momento de hacerle frente a un estrés. Un claro ejemplo es el trabajo de Marchiori et al (2017), quienes determinaron que, para mantener el crecimiento de plantas jóvenes de caña de azúcar, la plasticidad de los caracteres fisiológicos (p.e. intercambio de gases y caracteres fotoquímicos) fue más importante que la plasticidad en caracteres morfológicos (e.g. área foliar y biomasa total).

Con estos ejemplos, queda claro que iniciar un programa de mejoramiento que incluya a la plasticidad fenotípica como objetivo, debe tomarse con mucha precaución en *Panicum coloratum*. Por una parte, teniendo en cuenta que los valores bajos de heredabilidad y ganancia genética reportados dejan ver que los avances en un proceso de selección para plasticidad fenotípica frente a sequía en *P. coloratum* pueden llegar a ser un poco lentos y muy laboriosos. Por otra parte, antes de iniciar un programa de mejoramiento, debe obtenerse un panorama más completo sobre cómo responden las plantas de *P. coloratum* al estrés por sequía dado que la plasticidad fenotípica para enfrentar el estrés puede ser beneficiosa en algunos caracteres o perjudicial en otros como se discutió más arriba. Dentro de los posibles tópicos a profundizar, se proponen, por ejemplo, la relación entre la plasticidad morfológica y la plasticidad fisiológica. Debe indagarse más sobre cuáles son los valores de heredabilidad, si existen límites fisiológicos por parte de las plantas para su selección dentro de un programa de mejoramiento, cuál es el costo (supervivencia, tasa de crecimiento, número de semillas producidas en el momento de la reproducción) para las plantas de *P. coloratum* de expresar plasticidad fenotípica y cuál es su impacto real, a nivel de pastura, en la capacidad de tolerar la sequía y/o sobrevivir en ambientes cuya disponibilidad de agua es variable.

**Expresión diferencial de la plasticidad fenotípica en *Panicum coloratum* L.
inducida por condiciones previas de estrés hídrico**

4.1 Introducción

Las respuestas plásticas de un organismo a un determinado estímulo pueden ser influenciadas por las condiciones a las que el mismo fue expuesto en etapas tempranas de su desarrollo (Weinig y Delph, 2001; Huber et al 2012). Entre estas condiciones previas pueden considerarse tanto las condiciones nutricionales en las que se encuentra el organismo al momento de desarrollar la respuesta plástica como también a los efectos de la “impronta o huella de estrés” (“stress imprint”-Bruce et al. 2007), que son las modificaciones bioquímicas o genéticas que ocurren en un organismo después de un evento de estrés. Dependiendo de la duración, intensidad y momento ontológico en el que ocurran, estos eventos de estrés iniciales pueden provocar que las respuestas plásticas posteriores sean diferentes en magnitud o dirección, cuando nuevos eventos de estrés se presentan (Abraham y Bear 1996, Novoplansky 2009, Huber et al. 2012). Por ejemplo, en *Rumex palustris*, la mayor o menor acumulación de carbohidratos en tallos y raíces resultantes de la aplicación de pretratamientos de disponibilidad diferencial de luz y nutrientes, afectó la magnitud de la elongación foliar producida en respuesta a una inundación subsecuente. Es decir, la plasticidad en la elongación foliar de las hojas más jóvenes fue mayor, cuanto más alta fue la concentración de carbohidratos en tallo y raíz (Huber et al. 2012).

Dentro de los mecanismos involucrados en la respuesta de las plantas frente a los estreses bióticos y abióticos, se encuentra el fenómeno de “*priming*” (Bruce et al. 2007). En éste, las exposiciones previas de una planta a un estrés, producen modificaciones bioquímicas a nivel cromosómico (cambios epigenéticos) y/o a nivel celular (acumulación de proteínas de señalización o de factores de transcripción), que la hacen más resistente a exposiciones futuras (Bruce et al. 2007). Por ejemplo, la exposición a un tratamiento de salinidad en sorgo, mejoró la respuesta posterior de las plantas cuando fueron nuevamente expuestas a estrés salino (Yan et al. 2015). En otro caso, tubérculos de papa sometidos a sequía mostraron una menor reducción en su producción cuando un nuevo evento de estrés hídrico se hizo presente (Ramírez et al. 2015). En trigo, la exposición a la sequía en fase vegetativa, mejoró la tolerancia a la sequía y al calor en la fase de llenado de grano (Wang et al. 2015). De esta forma, se observa que los organismos vegetales pueden desarrollar una activación de las respuestas frente al estrés con mayor rapidez o magnitud que los no expuestos. La ventaja radica en que la planta contaría con el beneficio de una mejor protección, sin el costo asociado a la expresión constitutiva de los genes relacionados al estrés (Bruce et al. 2007). Este “*priming*” puede ocurrir tanto con factores bióticos como abióticos. En el caso de los factores abióticos, como por ejemplo la sequía, se habla de aclimatación.

De acuerdo a lo anterior, podría suponerse que un suceso de estrés puede establecer una marca bioquímica (“*priming*”) en las plantas. Este “*priming*” podría influir de forma tal que la respuesta plástica a sequías posteriores sea más rápida y de mayor magnitud que en plantas que no lo hayan sufrido. En otras palabras, la plasticidad frente a un evento de sequía podría variar de acuerdo a si anteriormente las plantas estuvieron o no expuestas a otros eventos de sequía. A este fenómeno se lo ha denominado plasticidad de la respuesta plástica (Huber et al. 2012) o metaplasticidad (Abraham y Bear 1996, Novoplansky 2009). En plantas, si bien hay muchos estudios dedicados a investigar cómo condiciones ambientales previas influyen la respuesta a diferentes variables (Novoplansky y Goldberg 2001, Lundgren y Sultan 2005, Flórez-Velasco et al. 2015, Li et al. 2015, Weinig y Delph 2001, Yan 2015), son muy pocos los trabajos que analizan cuál es el impacto de las condiciones ambientales experimentadas por un organismo sobre

la expresión posterior de la plasticidad fenotípica (Abraham y Bear 1996, Novoplansky 2009, Huber et al. 2012). Esta expresión diferencial de la plasticidad es de interés en parte por tener consecuencias en ensayos en los que se estudia plasticidad o para entender la respuesta diferencial frente a los mismos cambios ambientales en materiales genéticamente uniformes pero que han tenido diferente exposición al estrés. Por ejemplo, algunas inconsistencias entre ensayos desarrollados en años distintos, aun controlando todas las condiciones ambientales durante el ensayo, podrían ser explicadas por este mecanismo (Huber et al. 2012).

Por otro lado, estudios muy recientes indican que la capacidad de responder cuando un evento de estrés se repite, puede ser diferente entre genotipos de una misma especie (Kumar 2018). Esta capacidad de responder rápidamente y de forma adecuada a un nuevo evento de estrés puede llegar a ser muy interesante desde el punto de vista agronómico, donde el cambio climático juega un papel muy importante al momento de regular la disponibilidad de agua en el suelo. Por lo tanto, en este capítulo se realizó un experimento a fin de obtener más información sobre cuál es el impacto de la exposición a sequía en etapas muy tempranas del desarrollo, sobre la magnitud de la respuesta plástica de las plántulas cuando posteriormente se presenta un evento de estrés similar.

4.2 Objetivo particular

-Evaluar, en una población plástica de *Panicum coloratum*, el efecto de la aplicación de un tratamiento temprano de sequía sobre la expresión de la plasticidad fenotípica cuando el evento de estrés se repite.

4.3 Hipótesis

Hipótesis 6: En plántulas de *Panicum coloratum*, la exposición a condiciones de sequía en etapas tempranas, influye en la expresión de la respuesta plástica posterior de los mismos individuos a la falta de agua.

4.4 Materiales y métodos

Para determinar si las condiciones previas de disponibilidad de agua en etapas tempranas influyen sobre la respuesta plástica posterior a la sequía, se trabajó con plántulas de *Panicum coloratum*. Se utilizó la accesión ER, perteneciente a la variedad *makarikariense* ya que, en base a los resultados del experimento del capítulo 2, demostró el mayor grado de plasticidad en la mayor cantidad de caracteres.

El experimento consistió en una secuencia de tratamientos, donde la sucesión de los mismos se realizó en cuatro etapas de diferente duración, las cuales fueron: establecimiento-pretratamiento-recuperación-tratamiento final (ver diagrama en Fig. 4.1). Se trabajó en invernadero y se utilizó un diseño en parcelas divididas, con cuatro bloques al azar donde la parcela principal fue el pretratamiento, con dos niveles (sequía y control) y la subparcela, el estrés final, también con dos niveles (sequía y control). Las condiciones de temperatura media fueron similares durante las etapas de germinación establecimiento y pretratamiento, fluctuando alrededor de 32°C. En la etapa de recuperación las temperaturas fueron mayores, con casi 34°C de promedio, mientras que en la etapa de tratamiento final las temperaturas fueron más bajas, con casi 28°C de promedio. La humedad relativa, por su parte, mostró valores similares en la germinación, establecimiento y tratamiento final (de 36 a 40%) mientras que en el pretratamiento y la recuperación sus valores fueron un poco más altos (44 a 51 %; Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Condiciones de temperatura media y humedad relativa (\pm Desvío estándar) en cada etapa del ensayo realizado en invernadero.

Condición ambiental	Germinación	Establecimiento	Pretratamiento	Recuperación	Tratamiento Final
Temperatura media °C	32,3 (\pm 0,76)	32,1 (\pm 1,6)	31,7 (\pm 2,2)	33,9 (\pm 2,4)	27,8 (\pm 2,1)
Humedad relativa %	36,2 (\pm 2,05)	37,2 (\pm 7,1)	44,3 (\pm 9,6)	51,6 (\pm 19,3)	40 (\pm 15,6)

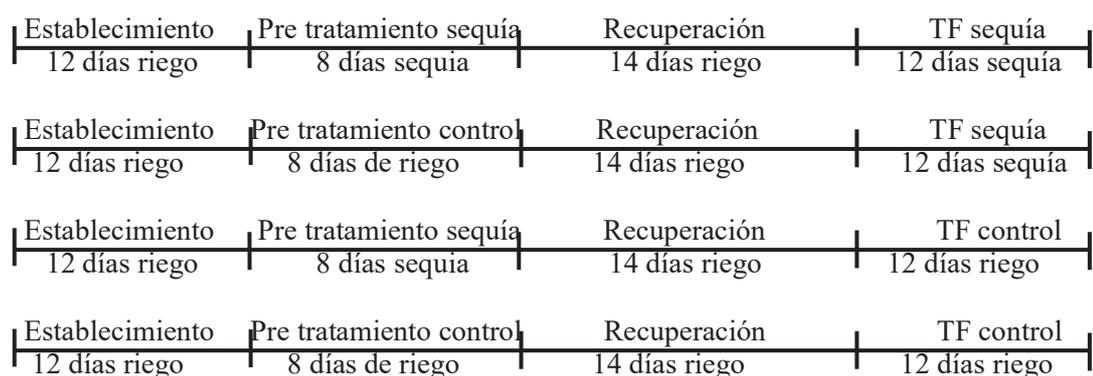


Figura 4.1. Representación gráfica de la secuencia y duración de las 4 combinaciones de tratamientos en plántulas de la accesión ER de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. TF: tratamiento final.

4.4.a Germinación de semillas de *P. coloratum*

Para dar comienzo al ensayo, se seleccionaron semillas de 6 plantas madres y se pusieron a germinar en invernadero durante 8 días. Por cada planta madre se colocaron 6 cajas de Petri, con 20 semillas cada una. Para la germinación se utilizó agua de la canilla. Al final de la etapa, se seleccionaron para el trasplante solamente las que presentaban una hoja expandida y radícula. Se formaron 6 familias de 64 medios hermanos, que fueron asignados al azar a cada una de las cuatro combinaciones de pre tratamiento/estrés final (16 medios hermanos por combinación). El trasplante se realizó en cuatro bloques (16 medios hermanos por bloque).

4.4.b Etapa 1: Establecimiento de las plántulas

Luego del trasplante, las plántulas se mantuvieron bajo riego continuo durante 12 días a fin de permitir su establecimiento. En la etapa de establecimiento, las plantas sufrieron un ataque de insectos no identificados, que provocaron la pérdida de muchas plantas, por lo que todas las plantas extras fueron utilizadas para reemplazar las faltantes, una de las seis familias debió ser descartada del ensayo y hubo que ajustar el número de individuos destinados a los controles de contenido relativo de agua y contenido gravimétrico de agua en suelo. Al finalizar este período las plantas tenían tres hojas en promedio.

4.4.c Etapa 2: Aplicación de los dos niveles de pretratamiento (sequía-control)

Una vez finalizada la etapa de establecimiento, se procedió a iniciar la etapa de pretratamiento. En éste, la mitad de las plantas se mantuvieron bajo riego constante, mientras que al resto se las sometió a un período de sequía, mediante la suspensión total del riego. La duración de esta etapa del experimento se reguló de acuerdo al estado de las plántulas, y a lo observado en el experimento del capítulo 2, en donde fueron expuestas a condiciones extremas. En este caso, como la intención fue que las plantas experimentaran una sequía no extrema (la temperatura media del invernadero fue casi 4°C mayor y la humedad relativa 6 puntos menor que en el experimento 1), la duración de la etapa de pretratamiento fue de solamente 8 días.

4.4.d Etapa 3: período de recuperación de las plantas (riego constante)

Para optimizar la duración del experimento, en las dos etapas siguientes (recuperación-tratamiento final), la extensión de cada una se reguló, en parte, de acuerdo a los cambios en la tasa de elongación foliar (TEF) que presentaban las plántulas. Debido a que la TEF es una característica muy sensible a los cambios en la disponibilidad de agua, resulta ser un buen indicador del estado hídrico de las plantas. Una vez iniciada la etapa de recuperación (que consistió en riego constante y abundante para todas las plantas), se registró diariamente la TEF en individuos que presentarán el mismo largo de vaina y número de hojas. Las mediciones se realizaron en 5 individuos al azar por pretratamiento. Cuando se detectó que la TEF de las plantas provenientes de los diferentes pretratamientos se igualaron, la etapa de recuperación se mantuvo por 6 días más (totalizando 14 días la etapa de recuperación) y luego se procedió a iniciar la siguiente etapa (tratamiento final).

Al término del período de recuperación, se realizó una primera cosecha de plantas (dos plantas por tratamiento por bloque), a fin de obtener una muestra de las mismas en el momento de comenzar con la aplicación del tratamiento final.

4.4.e Etapa 4: Aplicación del tratamiento final (sequía y control)

El tratamiento final consistió nuevamente en la suspensión del riego por 12 días. La duración del mismo también fue regulada por observación directa de las plantas y utilizando como referencia los valores de TEF (medido en 5 individuos por combinación de pretratamiento/tratamiento final). Una vez que se detectaron diferencias en la tasa de elongación foliar entre las plantas con riego y las plantas sin riego, el tratamiento final se mantuvo por 6 días más (12 días en total). Cumplidos estos 12 días, se procedió a la cosecha final de las plantas (2 por cada combinación pre tratamiento/estrés final en cada bloque). Se escanearon las dos últimas hojas totalmente expandidas y se registró el peso de láminas, vainas, raíz y material senescente. Se estimó el área foliar específica en las dos últimas hojas totalmente expandidas (AFE), y las proporciones entre los pesos lámina/vaina, biomasa aérea/biomasa subterránea y senescente/biomasa total. En la estimación de biomasa total no se incluyó el material senescente.

4.4.f Estimación de contenido gravimétrico de agua en suelo (w) y contenido relativo de agua (CRA)

Para determinar que cada una de las etapas del experimento fueron acompañadas por cambios en el contenido de agua en suelo y en las plantas, al final de cada una de las etapas del experimento, se registró el contenido gravimétrico de agua en suelo (w), y el contenido relativo de agua en hoja (CRA). El contenido gravimétrico de agua en suelo se obtuvo como el cociente entre el contenido de agua en el suelo (g) y el peso seco del suelo en cada muestra (g). El contenido relativo de agua (CRA) se estimó de acuerdo al método de González y González-Vilar (2001), en 3 plantas al azar, por cada nivel de tratamiento en cada etapa. La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$CRA = \frac{\text{Peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso saturado} - \text{peso seco}} * 100$$

Donde,

Peso fresco: es el peso de la sección de lámina recién cortada de la planta.

Peso seco: es el peso de la sección de lámina luego de ser secada en estufa hasta peso constante.

Peso saturado: es el peso de la sección de lámina luego de ser rehidratada por 4 horas en heladera.

4.4.g Estimación de índices de plasticidad fenotípica

Se estimó el índice de plasticidad fenotípica (PF) para Lámina/vaina (L/V), aéreo/subterráneo (A/S), Biomasa total (BT), Material senescente/biomasa total (S/T) y área foliar específica (AFE), de manera similar al experimento 1, sólo que en vez de

utilizar el promedio de los individuos del tratamiento final sequía, se utilizó el valor de cada individuo en sequía (Valladares et al. 2006):

$$rd_{ij \rightarrow i'j} = |(x_{i'a100} - x_{ia0}) / (x_{i'a100} + x_{ia0})|$$

donde

$x_{i'a100}$ es el valor del individuo i de la familia de medios hermanos a en el tratamiento de control

x_{a0} es el valor promedio del individuo i de la familia de medios hermanos a en el tratamiento de sequía.

4.5 Análisis estadístico

Tanto el contenido gravimétrico de agua en suelo, como el contenido relativo de agua de las hojas, se analizaron para la etapa de pretratamiento y recuperación, con una prueba t con corrección de Satterthwaite para varianzas no homogéneas al 5%. Para la etapa tratamiento final, se analizaron con ANOVA. En ambos casos se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Para determinar si al finalizar la etapa de recuperación, los caracteres de las plantas provenientes de los pretratamientos se encontraban en condiciones similares, se realizó una prueba t con corrección de Satterthwaite para varianzas no homogéneas al 5%. Los caracteres analizados fueron Lámina/vaina (L/V), aéreo/subterráneo (A/S), Biomasa total (BT), Material senescente/biomasa total (S/T) y área foliar específica (AFE). S/T fue transformado a raíz cuadrada para cumplir con el requisito de normalidad de residuos.

Para determinar si los índices de plasticidad fenotípica diferían entre las plantas provenientes de los distintos pretratamientos, y para determinar si las familias diferían en su capacidad de expresar plasticidad de forma diferencial, se aplicó un análisis factorial con pretratamiento como factor principal y familia como factor secundario. La plasticidad fenotípica de los siguientes caracteres fue analizada: Lámina/vaina (L/V), aéreo/subterráneo (A/S), Material senescente/biomasa total (S/T), área foliar específica (AFE) y plasticidad promedio (PP). El índice de plasticidad de L/V se transformó mediante arcoseno para cumplir con los requisitos de normalidad de los residuos y homogeneidad de la varianza. La comparación entre familias, se realizó mediante el test post hoc LSD de Fisher. Para determinar las diferencias en la expresión de la plasticidad dentro de cada familia, se utilizaron contrastes ortogonales. Para todos los análisis se utilizó el programa INFOSTAT (2017). En todos los casos el nivel de significancia utilizado fue del 5%.

4.6 Resultados

4.6.a Contenido gravimétrico de agua en suelo y contenido relativo de agua en hoja a lo largo del experimento

En suelo, el contenido gravimétrico de agua (w) difirió entre las macetas provenientes de los tratamientos control y sequía, en las etapas pretratamiento y tratamiento final, presentando siempre valores 4 o 5 puntos menores en las macetas pertenecientes a los tratamientos de sequía (Fig. 4.2.a). En la etapa de recuperación, las diferencias no fueron significativas entre las macetas provenientes de los diferentes pretratamientos.

Por su parte, en las etapas pretratamiento y tratamiento final, las plantas sometidas a sequía, exhibieron en todos los casos valores de CRA inferiores a 80%. Estos valores fueron significativamente diferentes a los de las plantas de los tratamientos control, quienes presentaron siempre valores superiores a 80%. Como era esperado, en la etapa de recuperación, las plantas no difirieron en su contenido relativo de agua (Fig. 4.2b). Ambos resultados validan la correcta aplicación de los tratamientos planeados para el presente experimento.

4.6.b. Comparación de los caracteres morfológicos al finalizar la etapa de recuperación

Al finalizar la etapa de recuperación (14 días de riego), las plantas provenientes de los pretratamientos sequía y control, no difirieron en sus valores de AFE, L/V, A/S o BT. Sólo S/T presentó un valor p marginal (Cuadro 4.2). De acuerdo a estos resultados, las plantas ingresaron a la siguiente etapa (Tratamiento final), en condiciones morfológicas similares.

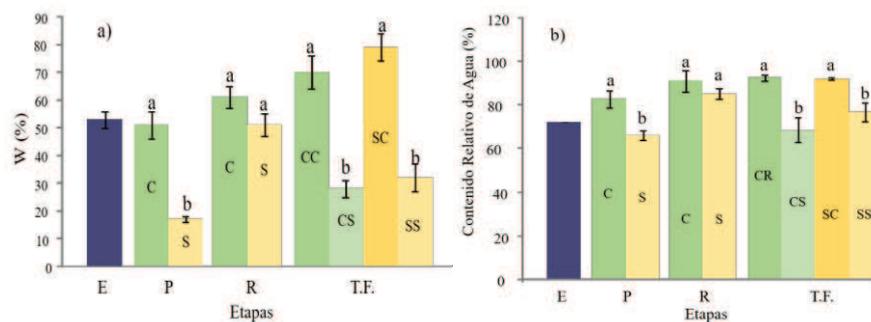


Figura 4.2 a) Contenido gravimétrico de agua (W) y **b)** Contenido relativo de agua en hoja los tratamientos de las cuatro etapas del ensayo. Establecimiento (E), Pretratamiento (P), Recuperación (D) y Tratamiento Final (T.F.). Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos en cada etapa. Las barras representan el desvío estándar. Los tratamientos son Control (C) y Sequía (S) para las etapas pretratamiento y recuperación. En la etapa del tratamiento final, CC y CS corresponden a los tratamientos final control y sequía, respectivamente, aplicados en las plantas expuestas al pretratamiento control. SC y SS corresponden a los tratamientos finales control y sequía en las plantas expuestas al pretratamiento de sequía.

Cuadro 4.2. Área foliar específica (AFE), Lámina/Vaina (L/V), Aéreo/subterráneo (A/S), Senescente/Biomasa total (S/T) y biomasa total (BT) de las plántulas provenientes de los pretratamientos de control y sequía, cosechadas luego del período de recuperación. EE: Error estándar. Los datos de S/T fueron transformados con raíz cuadrada.

Carácter	Promedio pret. Control (\pm EE)	Promedio pret. Sequía (\pm EE)	Valor p
AFE (cm^2/g)	285,76 (\pm 15,45)	318,73 (\pm 21,28)	0,2438
L/V	1,26 (\pm 0,07)	1,21 (\pm 0,08)	0,6497
A/S	7,02 (\pm 0,29)	8,23 (\pm 0,66)	0,1266
S/T	0,18 (\pm 0,02)	0,12 (\pm 0,01)	0,0507
BT (g)	1,28 (\pm 0,21)	1,08 (\pm 0,16)	0,4475

4.6.c. Comparación de los índices de plasticidad fenotípica obtenidos en grupos de plantas provenientes de dos pretratamientos diferentes.

Al analizar a nivel de accesión, los índices de plasticidad fenotípica en respuesta al estrés por sequía comparando los valores obtenidos después de aplicados los tratamientos finales, se halló que las plantas provenientes de los diferentes pretratamientos, presentaron diferencias significativas en sus índices de plasticidad para los caracteres A/S y S/T. La PF para L/V, AFE y la plasticidad fenotípica media, no mostraron diferencias significativas entre pretratamientos (Cuadro 4.3). Cabe señalar que la interacción Pretratamiento \times planta madre resultó significativa para la plasticidad fenotípica de AFE, A/S y PF media y marginal para S/T indicando que, en general, la respuesta al pretratamiento varía según la familia. Sólo para el carácter L/V la interacción fue no significativa y no se detectó efecto de pretratamiento, aunque la magnitud de la PF fue diferente según las familias.

En líneas generales, observando el valor promedio de la plasticidad, con respecto al efecto del pretratamiento sobre la magnitud de la plasticidad, las plasticidades de los caracteres A/S y S/T, mostraron un patrón opuesto. Los valores de plasticidad de A/S fueron mayores para las plantas provenientes del pretratamiento sequía. Por su parte, los valores de plasticidad de S/T, fueron mayores en las plantas provenientes del pretratamiento control (Cuadro 4.3). De esta manera, de los 5 caracteres para los que se calculó su plasticidad fenotípica en respuesta a sequía, el efecto de pretratamiento con déficit hídrico no modificó la magnitud de plasticidad en 3 de ellos, implicó menor plasticidad en 1 y se relacionó con un aumento en plasticidad en otro carácter. Por lo tanto, puede determinarse que, haber sido expuestas o no a una situación de sequía en etapas tempranas, influye sobre la expresión de la plasticidad si el evento de estrés se repite (Cuadro 4.3).

Debido a que, salvo en carácter L/V, la interacción pretratamiento \times planta madre fue significativa, los efectos del pretratamiento deben analizarse en cada familia en particular. Por ejemplo, para el carácter AFE, algunas familias no mostraron efecto de tratamiento sobre la plasticidad, una familia (ER3) mostró mayor plasticidad cuando había sido expuesta a riego previamente mientras que otra (ER5) lo hizo cuando fue expuesta a

sequía en el pretratamiento (Figura 4.3 a)). Así, vemos que, en AFE, A/S, S/T y plasticidad promedio, siempre al menos una familia exhibe expresión diferencial de la plasticidad fenotípica según el tratamiento al que fue sometida (Figura 4.3). A su vez, puede observarse que no hay un carácter donde todas las familias exhiban expresión diferencial de la plasticidad, ni familias que exhiban expresión diferencial para la plasticidad en todos los caracteres. Además de esto, no existe un patrón claro de expresión. Las plantas provenientes del pretratamiento sequía, no mostraron necesariamente mayores valores de plasticidad fenotípica que las provenientes del pretratamiento control.

Cuadro 4.3. Índices de plasticidad y valores p para efecto de pretratamiento, planta madre, interacción pretratamiento*planta madre para los caracteres Área foliar específica (AFE), Lámina/Vaina (L/V), Aéreo/subterráneo (A/S), Senescente/Biomasa total (S/T) y promedio (P. media) de las plántulas de la accesión ER, provenientes de los pretratamientos de control y sequía, cosechadas al final del tratamiento final. EE: Error estándar. Los datos de L/V debieron ser transformados mediante arcoseno. Letras diferentes indican diferencias significativas entre plantas que provienen de diferentes pretratamientos.

Carácter	Pretratamiento control (\pm EE)	Pretratamiento sequía (\pm EE)	Pretratamiento Valor p	Planta madre Valor p	Pret*Planta madre Valor p
AFE	0,10 (\pm 0,01)	0,11 (\pm 0,01)	0,3696	0,0006	0,0056
L/V	0,11 (\pm 0,01)	0,11 (\pm 0,02)	0,5215	0,0349	0,2308
A/S	0,13 (\pm 0,01)a	0,17 (\pm 0,01)b	0,0094	0,1314	0,0001
S/T	0,39 (\pm 0,03)a	0,30 (\pm 0,02)b	0,0263	0,6405	0,0541
PF Media	0,20 (\pm 0,01)	0,19 (\pm 0,01)	0,8034	0,1769	0,0212

Al analizar familia por familia, pueden observarse dos de ellas que mostraron diferencias en la expresión de la plasticidad en varios de los caracteres analizados. En primer lugar, la familia ER3, difirió en la expresión de su plasticidad fenotípica para todos los caracteres, a excepción de L/V (Figura 4.3). Para esta familia, los valores de plasticidad fenotípica son mayores en las plantas que provienen del pretratamiento control, lo que estaría en línea con la hipótesis propuesta.

En segundo lugar, se observa que en la familia ER5, la plasticidad de los caracteres AFE, A/S y S/T (Figura 4.3 a), c) y d), respectivamente) difirió dependiendo de los pretratamientos a los que fueron expuestas las plantas. En AFE y A/S, los valores de plasticidad fueron mayores en las plantas expuestas al pretratamiento sequía, mientras que para S/T, la plasticidad fue mayor en las plantas expuestas al pretratamiento control. La familia ER4, mostró diferencias para dos caracteres (Figura 4.3 c) y d)), siendo más plásticas las de la condición sequía, en un caso, y control, en el otro. Por último, las familias ER6 y ER8 no mostraron diferencias en la expresión de su plasticidad (Figura 4.3).

Con respecto a las familias, sólo en el carácter AFE las familias difirieron en sus valores medios de plasticidad. Entre ellas se destaca la familia ER4, la cual presentó lo valores más altos de plasticidad fenotípica (Figura 4.3 a).

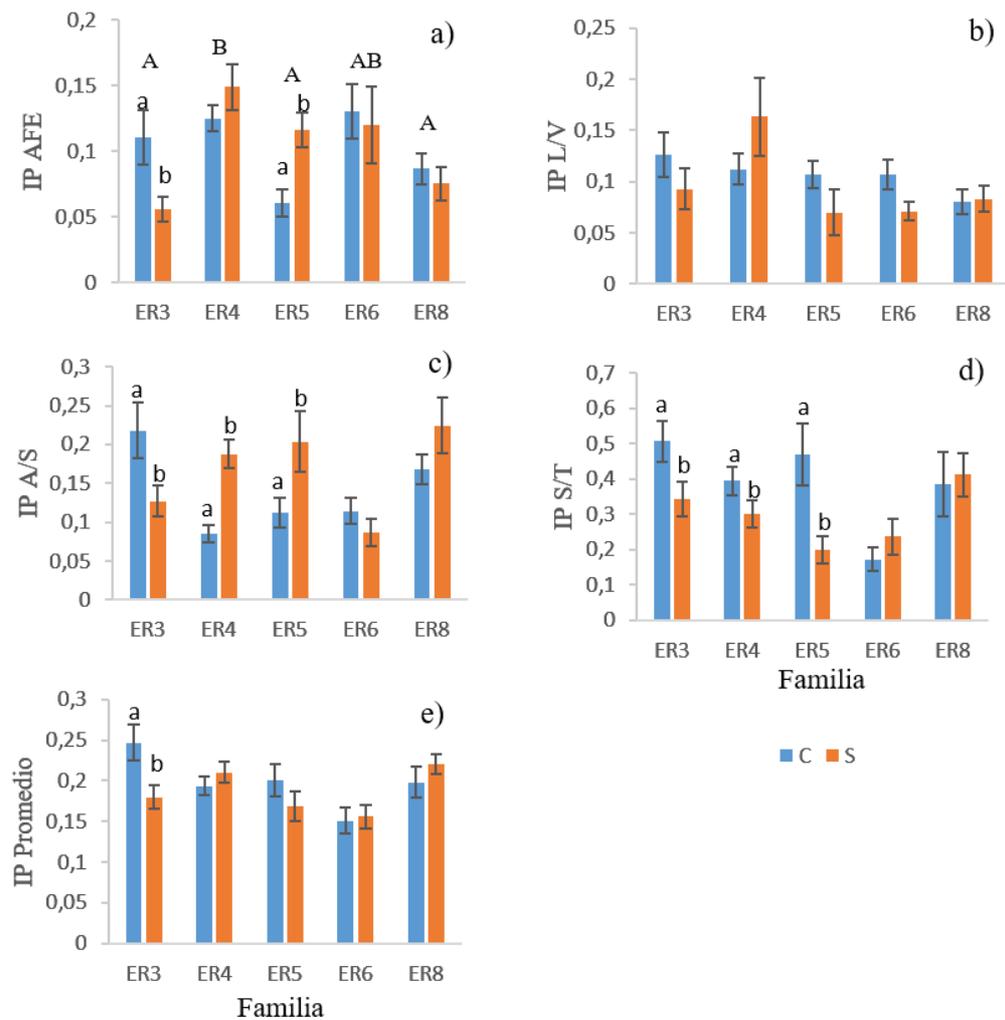


Figura 4.3. Índices de plasticidad (IP) de **a)** Área foliar específica (AFE), **b)** Lámina/Vaina (L/V), **c)** Aéreo/subterráneo (A/S), **d)** Senescente/Biomasa total (S/T) y **e)** Plasticidad promedio (IP. promedio) de las plántulas de cinco familias de la accesión ER. Las plántulas fueron cosechadas al final del tratamiento final. Diferentes colores indican grupos provenientes de Pretratamientos Control (C) and Sequía (S). Las barras representan el error estándar. Letras minúsculas diferentes indican expresión diferencial de la plasticidad fenotípica en la familia. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre familias para expresión diferencial de la plasticidad.

4.7. Discusión

Las condiciones experimentales en nuestro ensayo lograron generar condiciones alternadas de humedad y sequía adecuadas para los objetivos planteados. El contenido gravimétrico de agua en el suelo en la condición de sequía fue siempre menor al 30%, mientras que en el tratamiento control siempre fue mayor al 50% (Figura 4.1.a). El contenido gravimétrico de agua en las macetas de la situación control fue en aumento a lo largo del experimento. Esto pudo haberse debido principalmente al efecto del crecimiento de las raíces, que posiblemente retuvieron más efectivamente el agua de las macetas que fueron regadas regularmente (Ng et al. 2016). Con respecto al contenido relativo de agua en hoja, las plantas correspondientes a los tratamientos de sequía, tanto en pretratamiento y tratamiento final, mostraron valores inferiores a 80% (Figura 4.2.b). Según González y González-Vilar, esos valores de contenido relativo de agua por debajo del 80% se relacionan con un potencial de agua de -1,5 MPa o menos, lo que produciría un cambio en el metabolismo, con cese de la fotosíntesis, incremento de la respiración y acumulación de prolina y ácido abscísico. Por lo tanto, de acuerdo a los datos brindados por estos dos indicadores, las condiciones de estrés se lograron de forma efectiva en este experimento.

Al finalizar el período de recuperación, las plantas provenientes de ambos pretratamientos mostraron valores similares en los caracteres medidos. El único carácter que presentó valores de significancia marginal fue S/T (Cuadro 4.2). La similitud entre las plantas provenientes de los pretratamientos, al finalizar el período de recuperación, garantizó que las plantas se encontraran en igualdad de condiciones (hablando desde el punto de vista morfológico), para iniciar el tratamiento final. De esta forma, las diferencias morfológicas halladas al finalizar el tratamiento final, se debieron solamente al efecto del tratamiento final y no a diferencias morfológicas previas entre plantas.

Los valores de plasticidad fenotípica obtenidos en la etapa tratamiento final fueron, para AFE, L/V y A/S, algo menores a los obtenidos en el experimento del capítulo 1. El carácter S/T no fue estimado en el capítulo 2 porque las plantas no produjeron material senescente. Este carácter, obtuvo valores de plasticidad fenotípica mucho más altos que los obtenidos para cualquier otro carácter en este experimento o en el experimento del capítulo 2. Llamativamente, por su parte, la plasticidad promedio fue igual a la obtenida en el capítulo 2 para esta misma accesión. Estos datos refuerzan la idea de que el índice utilizado para cuantificar la plasticidad (Valladares et al. 2006) es confiable y replicable, a la vez que podría ser útil para estimar la partición de biomasa bajo situaciones de estrés como la sequía. Novoplansky (2009), menciona que la gama de respuestas plásticas puede llegar a ser muy flexible en las plantas. Estas respuestas, pueden variar, entre otras cosas, de acuerdo al estado ontogénico de las mismas. De acuerdo a esto, la mayor plasticidad para S/T encontrada en este experimento plantea el interrogante con respecto a si existe algún tipo de regla o patrón sobre cuáles son los tipos de respuesta se generan, en cada momento ontogénico de la planta, cuando se encuentra en situación de sequía.

Nuestros resultados muestran que, en general, en plántulas de *Panicum coloratum*, la magnitud de la expresión de la plasticidad fenotípica frente a sequía está influenciada por el “*stress imprint*” provocado por las condiciones hídricas previas que experimentan las plantas. Sin embargo, este condicionamiento no es igual para todos los caracteres, y la expresión del mismo va a depender de la función específica de éste en la regulación hídrica de la planta. A nivel de accesión, la plasticidad fenotípica del área foliar específica (AFE), de la relación lámina/vaina (L/V) y la plasticidad fenotípica promedio no variaron en función del pretratamiento aplicado (Cuadro 4.3). Esto podría significar que,

independientemente de las condiciones previas, a nivel accesión, las respuestas que involucran modificaciones a nivel de lámina y/o superficie transpirante (AFE y L/V) son constantes frente a un mismo nivel de estrés. Para el carácter aéreo/subterráneo, las plantas que fueron expuestas tempranamente a condiciones de sequía, mostraron valores de plasticidad más altos que las que no habían sido expuestas (Cuadro 4.3). Por su parte, las plantas provenientes de la condición control, mostraron ser más sensibles a la condición final de sequía, ya que sus valores de plasticidad para la relación senescente/biomasa total fue mucho mayor (Cuadro 4.3). Una alta plasticidad en el carácter S/T, puede considerarse como una respuesta adecuada para reestablecer el equilibrio funcional (Poorter y Nagel, 2000), mediante la reducción drástica del área transpirante. Las hojas eliminadas por el proceso de senescencia, son, en su mayoría, las que fueron formadas en primer lugar, cuando las condiciones hídricas fueron óptimas, por lo que puede presumirse que el AFE y la relación L/V eran elevadas. Al deshacerse de este material, las plantas se acercan a un estado de equilibrio donde se reduce la pérdida de agua por medio de las hojas. Esta respuesta, sin embargo, sería la menos deseada desde el punto de vista agronómico, donde se desea que cada unidad de biomasa producida por las plantas contribuya al crecimiento y establecimiento de la pastura.

Las respuestas experimentadas por los caracteres A/S y S/T, nos dan la pauta de que experimentar condiciones de sequía leve de forma temprana, condiciona favorablemente a las plántulas a responder de forma más efectiva cuando la misma se repite, evitando la pérdida de biomasa (S/T menos plástica cuando el pretratamiento es de sequía) y optimizando la obtención de agua del suelo (mayor plasticidad en la relación A/S). Estos conocimientos pueden implementarse, por ejemplo, al momento de manejar el riego, si se trata de un sistema pastoril intensivo. Se recomendaría, por ejemplo, hacer riegos espaciados para favorecer la expresión de los caracteres plásticos, que favorecerían la respuesta a sequías o déficits hídricos futuros. De acuerdo a estos resultados, podría hipotetizarse que la expresión de la plasticidad en caracteres que implican una respuesta rápida frente a condiciones ambientales cambiantes, no depende tanto de las condiciones previas, como sí tal vez otras respuestas que involucren una mayor inversión o pérdida de biomasa (por ejemplo, A/S y S/T). Futuros estudios indagando en estos aspectos en otras especies, serían muy esclarecedores al respecto.

El hecho de que las variables analizadas respondan de manera diferencial a los pretratamientos control y sequía, se condice con lo propuesto en la hipótesis 6 planteada en el presente capítulo. En ella mencionábamos que las plantas expuestas a condiciones tempranas de sequía, expresarían valores de plasticidad diferentes a las no expuestas si el estrés se repetía. Esto se cumplió ya que, para el carácter A/S, las plantas que provenían del pretratamiento sequía mostraron un índice de plasticidad mayor que las del pretratamiento control. Por su parte, en el carácter S/T fue a la inversa, ya que las plantas que experimentaron el pretratamiento sequía fueron las que presentaron menores valores de plasticidad. Estos datos brindan información interesante, ya que se interpreta que las plantas no expuestas a sequía, resultaron ser más sensibles al estrés impuesto por el tratamiento final y por ende, presentaron mayor proporción de material senescente que las plantas que ya habían experimentado el estrés en etapas anteriores. La flexibilidad hallada en cuanto a la expresión de la plasticidad, les permitiría a las plantas generar respuestas plásticas de forma rápida y efectiva, minimizando los costos de generar respuestas plásticas desde un principio (Wang et al. 2016).

Las respuestas plásticas fisiológicas pueden ser complementarias o reemplazar a las respuestas plásticas morfológicas en un evento de estrés (Sutka et al. 2016, Marchiori et al. 2017). Por lo tanto, adicionalmente a nuestros resultados en respuestas plásticas

morfológicas, sería muy esclarecedor si futuros trabajos se enfocaran en determinar si la magnitud de las respuestas plásticas fisiológicas, también son influenciadas por las condiciones previas experimentadas por las plantas. En nuestro caso, por ejemplo, la incorporación de determinaciones sobre la producción de ácido abscísico en las plantas que fueron expuestas a sequía nos ayudaría a comprender con mayor profundidad por qué la plasticidad de S/T fue menor en las plantas que sufrieron sequía por segunda vez. Durante la expresión de la tolerancia a sequía, en las plantas, se produce acumulación de ABA (ácido abscísico) (Barghawa y Sawant 2013). Esta hormona reduce la producción de etileno e inhibe la senescencia y la abscisión mediada por etileno. Probablemente, durante la etapa de pretratamiento, se produjo una acumulación de ABA, o una expresión más veloz de los genes que regulan su producción, en las plantas expuestas a la sequía.

A nivel de familia, la variabilidad para expresión diferencial de la plasticidad hallada entre las mismas es muy interesante y añade información novedosa a lo conocido hasta el momento (Figura 4.3). Un trabajo realizado en *Rumex palustris* (Huber et al. 2012), halló que la plasticidad de la elongación foliar para inundación de tres poblaciones varió de acuerdo a las condiciones previas experimentadas. Nuestros datos profundizan en un nivel más y muestran que puede haber variabilidad entre genotipos (evaluados a través de su progenie) de *P. coloratum* en cuanto a capacidad de expresión de la plasticidad cuando las condiciones previas varían. Se observa claramente que hay familias que se ven más afectadas por las condiciones previas (ER3) mientras que hay otros cuya expresión de la plasticidad no varía, a pesar de haber experimentado, en estadíos tempranos, condiciones de disponibilidad de agua diferentes (ER8) (Figura 4.2).

El hecho de que haya variabilidad tanto entre las familias, como dentro de las familias, en cuanto a la expresión diferencial de la plasticidad, nos muestra que los aspectos que involucran las respuestas plásticas frente a un estrés son complejos (Novoplansky 2009), y que aún queda mucho por investigar, particularmente, sobre la respuesta plástica de las plantas en sequía. Hasta donde conocemos, este es el único trabajo que muestra claramente que existe variabilidad entre las plantas madres evaluadas a través de su progenie y que esa respuesta diferencial para la expresión de la plasticidad fenotípica depende del carácter que se analice. Asimismo, esta variabilidad, brinda un marco de trabajo interesante, que debe ser considerado si en un plan de mejoramiento se desean obtener materiales con buen comportamiento en situaciones recurrentes de estrés hídrico. Genotipos con respuestas morfológicas predecibles podrían incrementar la adaptabilidad de los cultivos a una agricultura resiliente desde el punto de vista climático (Kumar 2018). En relación a esto, debe tenerse en cuenta que las estimaciones en este ensayo se realizaron a planta aislada y en invernadero. Para complementar los resultados obtenidos en este capítulo, debe considerarse la posibilidad de estudiar las respuestas plásticas de *P. coloratum* en stand denso y a campo.

En este trabajo, el período transcurrido entre la finalización del pretratamiento y el inicio del tratamiento final fue de 12 días. En la literatura existen antecedentes en los cuales la ocurrencia de un evento de estrés puede impactar en la respuesta frente a un nuevo evento en períodos muy variables, desde 3 días (para *Arabidopsis* - Goh et al. 2003), hasta más de 55 días (para *Solanum tuberosum* - Ramírez et al. 2015). En base a esto, los efectos producidos por el primer evento de estrés, pueden observarse si una situación de estrés ocurre de forma inmediata, a mediano o a largo plazo. Resta investigar si los mecanismos que involucran esas respuestas a corto y largo plazo son los mismos, o si, por el contrario, las plantas poseen diferentes mecanismos (acumulación de proteínas de señalización, de factores de transcripción o cambios epigenéticos) (Bruce et al. 2007) dependiendo del tiempo transcurrido desde el último evento de estrés.

Los resultados hallados en este capítulo permiten aceptar la hipótesis propuesta. Los resultados encontrados coinciden con lo hallado por Huber et al. (2012) y reafirman que la magnitud de las respuestas plásticas frente a un estrés no es estable, sino que depende de las situaciones previas que experimentó el organismo anteriormente en el corto plazo. Sin embargo, las condiciones previas no afectan la expresión de la plasticidad de la misma forma en todos los caracteres, ni en todos los genotipos e incluso en cada genotipo los caracteres no se ven afectados de la misma manera. El desafío en futuros estudios es determinar cómo impacta esto en el establecimiento de la pastura en ambientes con precipitaciones variables, donde además se suman otras condiciones ambientales causan estrés en las plantas (p.e. salinidad), que pueden potenciar el efecto de la sequía.

Discusión general

5.1 Discusión general

En esta tesis se abordaron diferentes aspectos de la plasticidad fenotípica de plántulas bajo estrés por sequía, tomando como especie de estudio la especie forrajera *Panicum coloratum*. En primer lugar, se generó información relevante y original respecto a la presencia de variabilidad genética para la plasticidad fenotípica y su relación con las condiciones ambientales de sus sitios de colecta. Luego, se determinó la forma de distribución de esta variabilidad entre y dentro de las familias, sus valores de heredabilidad en sentido estricto y el grado de avance genético que se obtendría en caso de realizar selección para modificar los valores de plasticidad fenotípica. Por último, se determinó que las respuestas plásticas que pueden presentar las plantas de *P. coloratum*, dependen de las condiciones hídricas previas que experimentaron en las etapas tempranas de su desarrollo.

5.1.a. Variabilidad genética para plasticidad fenotípica y relación con las condiciones climáticas de los sitios de origen

Se realizó un experimento en invernadero con plantas de las dos variedades de la especie, analizando las respuestas a nivel morfológico, para determinar su variabilidad genética y si ésta se relaciona con las condiciones ambientales de los sitios de distribución natural de las variedades y/o con los sitios de colecta de las accesiones. El experimento se realizó en el estadio de plántula ya que, en general, en las plantas megatérmicas, el crecimiento de las plántulas es lento y constituye el estadio de la planta más crítico en cuanto a su supervivencia. Como factor de estrés se utilizó la sequía ya que es el principal factor que limita el establecimiento de las pasturas, en las zonas marginales donde usualmente son utilizadas las forrajeras megatérmicas. Luego de analizar 48 familias de medios hermanos (6 familias x 4 accesiones x 2 variedades), se logró determinar que existen diferencias entre variedades para la plasticidad del carácter PAF (proporción de área foliar). La variedad *makarikariense* es la que presenta mayores valores de plasticidad para ese carácter (Cuadro 2.2), confirmando **la hipótesis 1**, que afirma que, al provenir esta variedad de zonas de alta variabilidad en precipitaciones, su plasticidad fenotípica es mayor. A nivel de accesión, se halló variabilidad entre las mismas para la plasticidad fenotípica en tres de los cuatro caracteres analizados, y en la plasticidad fenotípica media. Por su parte, las accesiones difirieron entre sí con respecto a qué caracteres presentaron mayores valores de plasticidad (Cuadro 2.3) y se detectaron accesiones más y menos plásticas para el estrés sequía. Estos resultados permitieron aceptar **la hipótesis 2**, en la que se postula que las accesiones colectadas en diferentes regiones de Argentina difieren en sus valores de plasticidad fenotípica. Además de esto, en general los resultados de esta sección refuerzan el supuesto de que la plasticidad fenotípica es un carácter que puede presentar variabilidad genética determinada (Pigliucci 2005, Pigliucci et al. 2006). Asimismo, hasta donde conocemos, se muestra por primera vez, que la plasticidad del carácter A/S no se relaciona con la plasticidad de otros caracteres involucrados en la respuesta a la sequía. Esto, implicaría una interesante disociación en el tipo de respuestas que generan las plantas frente a la sequía, que podrían tener profundo impacto tanto en la forma de estudiar a la plasticidad como fenómeno, como por las implicancias que podría tener en los programas de mejoramiento para estrés por sequía. Por otro lado, se halló que la plasticidad fenotípica de los caracteres, se correlacionó con la precipitación media anual y/o con la variabilidad interanual de la precipitación de sus sitios de colecta (Figura 2.3). La plasticidad fenotípica media de las accesiones, en particular, mostró una fuerte correlación positiva con el índice de heterogeneidad en la precipitación media anual, lo

que confirma la **hipótesis 3**. En general, estos resultados contribuyen a esclarecer cuáles son las condiciones ambientales que regulan la variabilidad genética y la magnitud de la plasticidad fenotípica en las plantas, complementando lo hallado por otros autores, que hallaron mayores valores de plasticidad en zonas áridas con variabilidad interanual (Lázaro-Nogal et al. 2015), o donde la variabilidad ambiental es espacial (Baythavong 2011).

5.1.b Heredabilidad en sentido estricto y ganancia genética para plasticidad fenotípica

Dada la variabilidad hallada en el capítulo 2, en la siguiente sección de la tesis se profundizó en el estudio de la distribución de la variabilidad genética de la plasticidad fenotípica. Se analizó la distribución de la variabilidad dentro y entre las familias de medios hermanos, de cada una de las accesiones incluidas en este estudio. Para cada variedad, se estimaron los valores de heredabilidad en sentido estricto tanto de la plasticidad fenotípica, como de los caracteres sobre los que se cuantificó la plasticidad. La plasticidad fenotípica presentó una distribución de la variabilidad mayor dentro de familias de medios hermanos, que entre familias (Cuadro 3.1) confirmando la **hipótesis 4**. La estructura de la variabilidad genética encontrada para los caracteres de plasticidad fenotípica concuerda con lo reportado en otros caracteres para la misma especie (Young 1994, Maina 2012, Armando 2014) y, junto con la sección anterior, confirma que la plasticidad es un carácter con variabilidad genética y distribución de dicha variabilidad similar a la de cualquier carácter. Por su parte, para la plasticidad fenotípica, la heredabilidad en sentido estricto fue relativamente baja y en todos los casos, menor que la heredabilidad de los caracteres sobre los cuales se cuantificó la plasticidad (Cuadro 3.2), confirmando la **hipótesis 5**. Estos resultados además coinciden y refuerzan lo hallado por otros autores (Scheiner y Lyman 1983, Scheiner et al. 1991, Relyea 2005) en cuanto a los valores bajos de heredabilidad reportados para plasticidad fenotípica y a la relación de éstos con la heredabilidad de los caracteres medios. Debido a estos bajos valores de heredabilidad, las ganancias genéticas estimadas para plasticidad fenotípica fueron también bajas (Cuadro 3.3). Una posible razón por la cual se hallarían valores bajos de heredabilidad podría ser que, los valores de la varianza genética aditiva resultaron bajos en proporción a la varianza fenotípica total (que incluye la varianza residual) (Falconer 1990). Como consecuencia, cuando se procedió a la estimación de la heredabilidad (varianza genética aditiva/varianza fenotípica), se obtuvieron valores bajos. Otra posibilidad que explicaría los valores altos de varianza fenotípica es que, debido a la metodología con la que se estima la plasticidad (calculada en base a la performance de al menos dos organismos creciendo en ambientes diferentes), pueden acumularse errores experimentales, lo que generaría variación espúrea. De esta forma, se aumentaría la varianza fenotípica, que impactaría en el cociente de estimación de la heredabilidad (Falconer 1990). Por último, se realizaron estimaciones del porcentaje de ganancia genética que se obtendrían si se aplicara selección con intensidades de 15 y 20%. Los valores de ganancia genética obtenidos fueron en general bajos, aunque difirieron levemente entre caracteres y variedades. La información aquí obtenida indica que, si se deseara implementar un programa de mejoramiento para aumentar o disminuir la plasticidad fenotípica de caracteres morfológicos, el cambio de los valores medios en cada generación obtenida por ciclos de selección tradicional, sería muy lento.

5.1.c. Expresión diferencial de la plasticidad fenotípica

Para determinar si las condiciones de sequía en etapas tempranas del desarrollo de las plántulas influyen sobre las respuestas plásticas cuando el evento de estrés se repite, se realizó un experimento en invernadero con aplicación secuencial de estrés por sequía. Para esto se utilizó la accesión más plástica según los resultados del experimento del capítulo 2, y se formaron familias de medios hermanos que fueron sujetos a tratamientos control y sequía en dos oportunidades sucesivas, alternando con un periodo de recuperación de manera tal que las plantas igualaran su capacidad de crecimiento antes de ser sometidas a un nuevo periodo de estrés. Se estimó la plasticidad fenotípica de las plantas que habían experimentado sequía en etapas tempranas y se comparó con la plasticidad fenotípica de aquellas que no habían sufrido sequía. Los análisis comparando las respuestas plásticas de las plántulas provenientes de diferentes condiciones previas, se realizaron a nivel de accesión y a nivel de familia. Los resultados permitieron aceptar la **hipótesis 6** confirmando que las condiciones experimentadas en etapas tempranas de desarrollo influyen sobre la expresión de la plasticidad fenotípica cuando se produce un nuevo evento de estrés. Se halló que, a nivel de accesión, en dos de los cinco caracteres analizados, la plasticidad fenotípica de las plantas expuestas a sequía fue diferente a la de las no expuestas (Cuadro 4.3). A nivel de familia, por su parte, se detectó que no todas respondieron de la misma forma, encontrándose familias cuya expresión de la plasticidad varía de acuerdo a si experimentaron diferentes condiciones previas, mientras que otras familias presentaban valores de plasticidad similares, independientemente de las condiciones previas experimentadas (Figura 4.3). De la misma forma, el patrón de expresión de la plasticidad no fue homogéneo, ya que, en algunos casos, la plasticidad fue mayor para aquellas plantas que fueron expuestas a sequía, mientras que, en otros, fue mayor en aquellas que provenían de la condición previa control (ver figura 4.3). Estos resultados constituyen un avance importante en la comprensión de los mecanismos y en la diversidad de respuestas que pueden presentar las plantas cuando son expuestas a estrés por sequía. Confirman que, efectivamente, las plantas poseen mecanismos de “memoria” (Bruce et al. 2007), que les permiten reaccionar de forma diferencial cuando un estrés se repite. Los resultados confirman, asimismo, que las respuestas al estrés por sequía no son las mismas en todos los individuos, y que, además, dentro de un mismo individuo, dichas respuestas pueden darse en algunos caracteres, pero no en otros.

5.2 Implicancias y perspectivas

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis indican que, la plasticidad fenotípica para estrés por sequía en plántulas de *Panicum coloratum*, es un carácter complejo, con herencia genética determinada (Capítulos 2 y 3), cuya expresión varía de acuerdo a los genotipos analizados (Capítulos 2, 3 y 4), las condiciones ambientales de los sitios de origen de los mismos (Capítulo 2) y las condiciones que experimentan los individuos en etapas tempranas de su desarrollo (Capítulo 4). Esto lo posiciona como un carácter interesante, tanto para ser tenido en cuenta en los programas de mejoramiento genético de especies forrajeras (en particular de *P. coloratum*), como para contemplar sus efectos al momento de evaluar el comportamiento de las plantas cuando son expuestas a estrés por sequía. La variabilidad hallada tanto en los tipos de respuesta, como en los diferentes caracteres que experimentaron plasticidad, brinda herramientas que pueden y deben ser aprovechadas en el desarrollo de líneas capaces de lidiar con el estrés por sequía. En este sentido, la influencia del ambiente sobre la variabilidad genética para plasticidad fenotípica, debe ser considerada al momento de realizar colectas de material destinado a

programas de mejoramiento para estrés abiótico o para conservar en bancos de germoplasma donde se busca preservar la variabilidad genética. Los bajos valores de heredabilidad y el lento avance genético que se obtendría por cada ciclo de selección (Capítulo 3), obligan a reflexionar sobre la forma en la que debería hacer mejoramiento genético para plasticidad fenotípica, para lograr resultados acordes a las demandas actuales. Es decir, plantea el interrogante sobre si es conveniente aplicar selección tradicional, o deben realizarse esfuerzos adicionales en pos de identificar genes clave en regular el comportamiento de las plantas para responder al estrés por sequía. De la misma forma, debería continuarse con los estudios en plasticidad para establecer, cómo la plasticidad de las respuestas fisiológicas, complementan o reemplazan a las respuestas morfológicas frente a un evento de estrés. Por otro lado, la amplia gama de respuestas plásticas diferenciales obtenidas en plantas expuestas a diferentes condiciones previas, evidencian que existe un campo muy amplio de estudio para identificar variantes epigenéticas, (plantas que varían en el grado de expresión de sus genes, debido a la metilación de su ADN, la modificación de las histonas o la remodelación de la cromatina) (Bruce et al. 2007). De esta forma, podrían hallarse resultados muy fructíferos, tanto para la generación de cultivos capaces de lidiar con el estrés por sequía, como para, principalmente, aumentar la comprensión del fenómeno de la plasticidad fenotípica.

Bibliografía

- Abraham, W.C. & Bear, M.F. 1996. Metaplasticity: The plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 19(4):126–130.
- Acquaah, G. 2010. Principles of plant genetics and breeding. Blackwell publishing. Oxford. UK. pp:569.
- Araújo, M.R.A. & Coulmann, B.E. 2002. Genetic variation, heritability and progeny testing in meadow bromegrass. *Plant Breeding*. 21:417-424.
- Armando, L.V. 2014. Caracterización morfológica y molecular de *Panicum coloratum* var. *makarikariense* Goossens. Tesis doctoral.
- Armando, L.V., Carrera, A.D. & Tomas, M.A. 2013. Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(5):1737–1747.
- Armando, L.V., Tomás, M.A., Garayalde, A.F. & Carrera, A.D. 2015. Assessing the genetic diversity of *Panicum coloratum* var. *makarikariense* using agro-morphological traits and microsatellite-based markers. *Annals of Applied Biology*, 167(3):373–386.
- Armando, L. V., Tomás, M.A., Garayalde, A.F. & Carrera, A.D. 2017. Effect of pollination mode on progeny of *Panicum coloratum* var. *makarikariense*: Implications for conservation and breeding. *Tropical Grasslands-Forrajeras Tropicales*. 5(3):117–128.
- Baldwin, J.M. 1902. Development and evolution: including psycho-physical evolution, evolution by orthoplasy, and the theory of genetic modes. New York, NY: Macmillan.
- Bhargava, S. & Sawant, K. 2013. Drought stress adaptation: Metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant breeding*. 132(1):21-32.
- Bartels, D. & Sunkar, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1):.23–58.
- Baythavong, B.S. 2011. Linking the spatial scale of environmental variation and the evolution of phenotypic plasticity: selection favors adaptive plasticity in fine-grained environments. *The American Naturalist*. 178(1):75-87.
- Bell, D.L. & Sultan, S.E. 1999. Dynamic phenotypic plasticity for root growth in *Polygonum*: A comparative study. *American Journal of Botany*, 86(6):807–819.
- Boe, A.A. 2003. Genetic and environmental effects on seed weight and seed yield in switchgrass. *Crop Science*, 43(1):63–67.
- Bradshaw, A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics*. 13:115-155.
- Brommer, K.E. 2013. Phenotypic plasticity of labile traits in the wild. *Current Zoology*, 59(4):485–505.
- Brown, J. & Caligari, C. 2009. An introduction to plant breeding. Blackwell Publishing. Oxford, UK. pp:209.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C.; Napier, J.A. & Pickett, J.A. 2007. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173(6):603-608.
- Burgos, E., Thompson, C., Giordano, M.C. & Tomás, M.A. 2018. Pre-breeding studies in *Panicum coloratum* var. *coloratum*: Characterization using agro-morphological traits and molecular markers. *Tropical Grasslands-Forrajeras Tropicales*, 6(2):82–92.

- Carneiro, M. 2001. Estrategias de biotecnología agropecuaria para el Cono Sur. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. Coord: Mauro Carneiro. PROCISUR. Montevideo. Uruguay. 154 p.
- Carren, C.J., Wilson, A.M., Cuany, R.L. & Thor, G.L. 1987. Caryopsis weight and planting depth of Blue Grama I. Morphology, emergence, and seedling growth. *Journal of range management*, 40(3): 207-211.
- Chen, D., Neumann, K., Friedel, S., Kilian, B., Chen, M., Altmann, T. & Klukas, C. 2014. Dissecting the phenotypic components of crop plant growth and drought responses based on high-throughput image analysis. *The plant cell*. 26(12):4636-55.
- Cheplick, G.P. 1995. Genotypic variation and plasticity of clonal growth in relation to nutrient availability in *Amphibromus scabrivalvis*. *Journal of Ecology*. 83:459-468.
- Chevin, L.M. & Lande, R. 2011. Adaptation to marginal habitats by evolution of increased phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(7):1462–1476.
- Codesido, V., Zas, R. & Fernández-López, J. 2012. Juvenile-mature genetic correlations in *Pinus radiata* D. Don. under different nutrient × water regimes in Spain. *European Journal of Forest Research*, 131(2):297–305.
- Couso, L.L. & Fernández, R.J. 2012. Phenotypic plasticity as an index of drought tolerance in three Patagonian steppe grasses. *Annals of Botany*. DOI: 10.1093/aob/mcs147.
- De Kort, H., Vander Mijnsbrugge, Vanderpitte, K., Mergeay, J, Ovaskainen, O. & Honnay, O. 2016. Evolution, plasticity and evolving plasticity of phenology in the tree species *Alnus glutinosa*. *Journal of evolutionary biology*. 29:253–264.
- Dickerson, G.E. 1969. Techniques for research in quantitative animal genetics. En Techniques and procedures in animal science research. American society of animal Sci., Albany, N.Y. pp. 36-79.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dreher, N.S. 2011. Variabilidad genética en caracteres asociados al vigor de plántula entre y dentro de poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariensis*. Tesis de maestría.
- Droste, T., Flory, S.L. & Clay, K. 2010. Variation for phenotypic plasticity among populations of an invasive exotic grass. *Plant Ecology*, 207(2):297–306.
- Duncan, E.J., Gluckman, P.D. & Dearden, P.K. 2014. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(4):208–220.
- Falconer, D.S. 1990. Introducción a la Genética Cuantitativa. Tercera edición. Compañía Editorial Continental S.A. México. 383 pp.
- Fehr, W.R. 1987. Principles of cultivar development. Vol. 1. Theory and technique. E.L. Fehr & H.J. Jensen (Eds.). Collier Macmillan Publishers. Londres. 535 pp.
- Flórez-Velasco, N., Balaguera-López, H.E. & Restrepo-Díaz, H. 2015. Effects of foliar urea application on lulo (*Solanum quitoense* cv. *septentrionale*) plants grown under different waterlogging and nitrogen conditions. *Scientia Horticulturae*, 186:154–162.
- Freschet, G.T., Swart, E.M. & Cornelissen, J.H.C. 2015. Integrated plant phenotypic responses to contrasting above- and below-ground resources: Key roles of specific leaf area and root mass fraction. *New Phytologist*, 206(4):1247–1260.
- Gardner, C.O. 1963. Estimates of genetic parameters in cross-fertilizing plants and their implications in plant breeding. In Statistical genetics and plant breeding (eds. Hanson, W.D.; Robinson, H.F.), pp. 225-252. Washington, D.C.: NAS-NRC Publ. 982.

- Gianoli, E. & Palacio-López, K. 2009. Phenotypic integration may constrain phenotypic plasticity in plants. *Oikos*, 118(12):1924–1928.
- Giordano, M.C., Berone, G.D. & Tomás, M.A. 2013. Selection by seed weight improves traits related to seedling establishment in *Panicum coloratum* L. var. *makarikariense*. *Plant breeding*. 132(6): 620-624.
- Goh, C.H., Nam, H.G. & Park, Y.S. 2003. Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of rd22 gene to light in abscisic acid-entrained Arabidopsis plants. *The plant journal*. 36:240–255.
- Gonzalez, L. & Gonzalez-Vilar, Marco. 2001. Chapter 14. Determination of relative water content. In: Handbook of Plant Ecophysiology Techniques. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp: 207-212.
- Grogan, S.M., Anderson, J., Baenziger, P.S., Frels, K., Guttieri, M.J., Haley, S.D., Kim, K.S., Liu, S., McMaster, G.S., Newell, M., Vara Prasad, P.V., Reid, S.D., Shroyer, K.J., Zhang, G., Akhunov, E., & Byrne, P.F. 2016. Phenotypic plasticity of winter wheat heading date and grain yield across the US great plains. *Crop Science*. 56(5): 2223-2236.
- Ho, W. & Zhang, J. 2018. Evolutionary adaptations to new environments generally reverse plastic phenotypic changes. *Nature communications*. 9-350 DOI: 10.1038/s41467-017-02724-5
- Hu, H & Xiong, L. 2014. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annual review of plant biology*. 65:3.1-3.27.
- Huber, H., Chen, X., Hendriks, M., Keijsers, D., Voesenek, L.A.C.J., Pierik, R., Poorter, H., de Kroon, H. & Visser, E.J.W. 2012. Plasticity as a plastic response: How submergence-induced leaf elongation in *Rumex palustris* depends on light and nutrient availability in its early life stage. *New Phytologist*, 194(2):572–582.
- Hunt, R. 1978. Demography versus plant growth analysis. *New Phytologist*. 80:269-272.
- Hutchison, D.J., & Bashaw, E.C. 1964. Cytology and reproduction of *Panicum coloratum* and related species. *Crop Science*. 4(15): 1-153.
- Isik, F., Holland, J. & Maltecca, C. 2017. Genetic data analysis for plant and animal breeding. Springer. 400 pp.
- Kaufman, S.R. & Smouse, P.E., 2001. Comparing indigenous and introduced populations of *Melaleuca quinquenervia* (Cay.) Blake: Response of seedlings to water and pH levels. *Oecologia*, 127(4):487–494.
- Kleine, S., Weissinger, L. & Müller, C. 2017. Impact of drought on plant populations of native and invasive origins. *Oecologia*. 183(1): 9-20.
- Klingenberg, C.P. 2014. Studying morphological integration and modularity at multiple levels: concepts and analysis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1649): 2010249.
- Komatsu T., Ubi B.E. & Enoki H. 2007. Crossability and amplified fragment length polymorphism variation among four types of *Panicum coloratum* L. and meiotic chromosome pairing of their F1 hybrids. *Grassland Science*. 53:97–102.
- Kumar, S. 2018. Epigenetic memory of stress responses in plants. *Journal of phytochemistry & biochemistry*. 2: e102.
- Lambers, H. & Poorter, H. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research*. 23: 188-261.

- Larson, J.E. & Funk, J.L. 2016. Seedling root responses to soil moisture and the identification of a belowground trait spectrum across three growth forms. *New Phytologist*. 210 (doi: 10.1111/nph.13829).
- Lázaro-Nogal, A., Matesanz, S., Godoy, A., Pérez-Trautman, F., Gianoli, E. & Valladares, F. 2015. Environmental heterogeneity leads to higher plasticity in dry-edge populations of a semi-arid Chilean shrub: insights into climate change responses. *Journal of ecology*. 103(2):338-350.
- Li, X., Cai, J., Liu, F., Zhou, Q., Dai, T., Cao, W. & Jiang, D. 2015. Wheat plants exposed to winter warming are more susceptible to low temperature stress in the spring. *Plant Growth Regulation*, 77(1):11-19.
- Lind, M.I., Ingvarsson, P.K., Johansson, H., Hall, D. & Johansson, F. 2011. Gene flow and selection on phenotypic plasticity in an island system of *Rana temporaria*. *Evolution*. 65(3):684-697.
- Lundgren, M.R. & Sultan, S.E. 2005. Seedling expression of cross-generational plasticity depends on reproductive architecture. *American Journal of Botany*, 92(2): 377–381.
- Macdonald, S.E. & Chinappa, C.C. 1989. Population differentiation for phenotypic plasticity in the *Stellaria longipes* complex. *American journal of botany*. 76(11):1627-1637.
- Magliano, P.N., Fernández, R.J., Mercau, J.L. & Jobbágy E.G. Precipitation event distribution in Central Argentina: spatial and temporal patterns. *Ecohydrology*. 8:94–104.
- Maina, M. 2012. Variabilidad en caracteres relacionados a la producción de semilla en poblaciones de *Panicum coloratum* var. *makarikariensis*. Tesis de maestría.
- Marchiori, P.E.R., Machado, E.C., Sales, C.R.G., Espinoza-Núñez, E., Magalhães Filho, J.R., Souza, G.M. Pires, R.C.M. & Ribeiro, R.V. 2017. Physiological plasticity is important for maintaining sugarcane Growth under Water Deficit. *Frontiers in plant science*. 8. DOI: 10.3389/fpls.2017.02148.
- Maseda, P.H. & R. J. Fernández. 2015. Growth potential limits drought morphological plasticity in seedlings from six Eucalyptus provenances. *Tree physiology*. 36(2):243-251.
- Matesanz, S., Gianoli, E. & Valladares, F. 2010. Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206: 35–55.
- Moser, L.E. 2000. Morphology of Germinating and Emerging Warm-Season Grass Seedlings. En *Native Warm –Season Grasses: Research Trends and Issues*. Moore, K. J y B. E. Anderson. CSSA Special publication Number 30. Crop Science Society of America. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin. pp: 35-47.
- Murren, J.C. 2002. Phenotypic integration in plants. *Plant species biology*. 17(2):89-99.
- Münzbergová, Z., Hadincová, V., Skálová, H. & Vandvik, V. 2017. Genetic differentiation and plasticity interact along temperature and precipitation gradients to determine plant performance under climate change. *Journal of ecology*. 105:1358-1373.
- Ng, C.W.W., Ni, J.J., Leung, A.K., & Wang, Z.J. 2016. A new and simple water retention model for root-permeated soils. *Geotechnique Letters*. 6(1): 1-6.
- Nguyen, H.T. & Sleper, D.A. 1983. Theory and application of half-sib matings in forage grass breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 64(3): 187–196.
- Noreikiene, K., Herczeg, G., Gonda, A., Balázs, G., Husby, A. & Merilä, J. 2015. Quantitative genetic analysis of brain size variation in sticklebacks: support for the mosaic model of brain evolution. *Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences*. 282: 20151008. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.1008>.
- Novoplansky, A. 2009. Picking battles wisely: Plant behaviour under competition. *Plant, Cell and Environment*, 32(6):726–741.

- Novoplansky, A. & Goldberg, D. 2001. Interactions between neighbour environments and drought resistance. *Journal of Arid Environments*, 47(1):11–32.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. & Tran, L.P. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5:86. doi: 10.3389/fpls.2014.00086.
- Pedrol, N., Ramos, P. & Reigosa, M.J. 2000. Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvet-grass: a long-term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. *Journal of plant physiology*.157(4):387-393.
- Pigliucci, M. 2003. Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology letters*. 6:265-272.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution*, 20(9): 481–486.
- Pigliucci, M., Murren, C.J. & Schlichting, C.D. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The journal of experimental biology*. 209: 2362-2367.
- Plaistow, S.J. & Collin, H. 2014. Phenotypic integration plasticity in *Daphnia magna*: An integral facet of G × E interactions. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(9):1913-20. doi: 10.1111/jeb.12443.
- Poorter, H. 1990. Interspecific variation in relative growth rate: On ecological causes and physiological consequences. En: Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants. Editores: H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Konings & T.L. Pons. SPB Academic Publishing bv, La Haya, Países bajos. pp: 45-68.
- Poorter, H. & Nagel, O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27: 595–607.
- Poorter, H., Niklas, K.J., Reich, P.B., Oleksyn, J., Poot, P. & Mommer, L. 2011. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist*. 193(1): 30-50.
- Ramírez, D.A., Rolando, J.L., Yactayo, W., Monneveux, P., Mares, V. & Quiroz, R. 2015. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. *Plant Science*, 238: 26–32.
- Reed, T.E., Schindler, D.E., Hague, M.J., Patterson, D.A., Meir, E., Waples, R.S. & Hinch, S.G. 2011. Time to evolve? Potential evolutionary responses of Fraser River sockeye salmon to climate change and effects on persistence. *PLoS One*. 6:e20380. doi:10.1371/journal.pone.0020380.
- Relyea, R. 2005. The heritability of inducible defenses in tadpoles. *Journal of evolutionary Biology*. 18(4): 856-866.
- Richards, C.L., Bossdorf, O., Muth, N.Z., Gurevitch, J. & Pigliucci, M. 2006. Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters*, 9(8): 981–993.
- Sadras, V.C. & Slafer, G. 2012. Environmental modulation of yield components in cereals: Heritabilities reveal a hierarchy of phenotypic plasticities. *Field crops research*. 127: 215-224.
- Salinas, S. & Munch, S.B. 2014. Phenotypic complexity: Integrated responses of life-history characters to multiple environmental factors. *Evolutionary Ecology Research*. 16(3): 267-284.
- SAS Institute Inc. 2009. SAS OnlineDoc® 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.

- Scheiner, S.M., Caplan, R.L. & Lyman, R.F., 1991. The genetics of phenotypic plasticity. III. Genetic correlations and fluctuating asymmetries. *Journal of Evolutionary Biology*, 4(1): 51–68.
- Scheiner, S. M. & Lyman, R.F. 1989. The genetics of phenotypic plasticity. 1. Heritability. *Journal of Evolutionary Biology*. 2(2): 95–107.
- Smart, A.J., Vogel, K.P., Moser, L.E. & Stroup, W.W. 2003. Divergent selection for seedling tiller number in big bluestem and switchgrass. *Crop Science*, 43(4): 1427–1433.
- Sprague G.F. & Eberhart, S.A. 1977. Corn breeding. En: Corn and corn improvement (ed. Sprague, G.F.), pp: 305-362. Madison, Wisconsin: Am. Soc. of Agron.
- Staniak, M. & Kocóń, A. 2015. Forage grasses under drought stress in conditions of Poland. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(6):116. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1864-1>
- Steel, R. G. & Torrie, J.H.. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd edition. McGraw-Hill. New York. 633 p.
- Stritzler N.P. 2008. Producción y calidad nutritiva de especies forrajeras megatérmicas. *Revista argentina de producción animal*. 28: 165-168.
- Sultan, S.E. 1995. Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica*. 44: 363-383.
- Sultan, S.E. & Matesanz, S. 2015. An ideal weed: Plasticity and invasiveness in *Polygonum cespitosum*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1360(1): 101-119.
- Sultan, S.E. & S.C. Stearns. 2005. Environmentally contingent variation: Phenotypic plasticity and norms of reaction. Variation. (B. Hallgrímsson and B. Hall, eds.). Boston: Elsevier Academic Press.
- Sutka, M.R., Manzur, M.E., Vitali, V.A., Micheletto, S. & Amodeo, G. 2016. Evidence for the involvement of hydraulic root or shoot adjustments as mechanisms underlying water deficit tolerance in two Sorghum bicolor genotypes. *Journal of plant physiology*. 192: 13-20.
- Taiz, L. & E. Zeiger. 2002. Chapter 3. Water and Plant Cells. En Plant Physiology. Third edition. Páginas 33-46. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D. 1991. Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. *Tree*. 6(8):246-249.
- Tischler, C.R & W.R. Ocumpaugh. 2004. Kleingrass, Blue Panic, and Vine Mesquite. Warm-Season (C₄) Grasses, Agronomy Monograph no 45. Moser et al. (eds). Pp: 623-649.
- Tonsor, S.J. & Scheiner, S.M. 2007. Plastic trait integration across a CO₂ gradient in *Arabidopsis thaliana*. *The American naturalist*, 169(5): E119–E140.
- Valladares, F., Sanchez-Gomez, D. & Zavala, M.A. 2006. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: Bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*. 94(6): 1103-1116.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Julio, J., Corcuera, L. & Sisó, S. 2004. CAPÍTULO 6 Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. *Water*. 163–190.
- Visser, M.E., 2008. Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1635): 649–659.
- Wang, S., Callaway, R.M., Zhou, D. & Weiner, J. 2016. Experience of inundation or drought alters the responses of plants to subsequent water conditions. *Journal of Ecology*. 105(1): 176-18.

- Wang, X., Vignjevic, M., Liu, F., Jacobsen, S., Jiang, D. & Wollenweber, B. 2015. Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat. *Plant Growth Regulation*, 75(3): 677–687.
- Weinig, C. & Delph, L.F. 2001. Phenotypic plasticity early in life constrains developmental responses later. *Evolution; international journal of organic evolution*, 55(5): 930–936.
- Yan, K., Xu, H., Cao, W., & Chen, X. 2015. Salt priming improved salt tolerance in sweet sorghum by enhancing osmotic resistance and reducing root Na⁺ uptake. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37:203.
- Yan, M., 2015. Seed priming stimulate germination and early seedling growth of Chinese cabbage under drought stress. *South African Journal of Botany*, 99: 88–92.
- Young, B.A. 1994. Genetic variation in a *Panicum coloratum* L. population with a limited germplasm base. *Euphytica*, 75(7): 71–76.
- Zeng, X., Durka, W., Welk, E. & Fischer, M. 2017. Heritability of early growth traits and their plasticity in 14 woody species of Chinese subtropical forest. *Journal of Plant Ecology*. 10(1): 222-231.