



TÍTULO

**INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA PARA
TOLERANCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS MEDIANTE
TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* EN *Cenchrus ciliaris* L.**

AUTORA

Eliana López Colomba

Director
Curso
ISBN

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2011

José Ignacio Cubero Salmerón

Máster Universitario en Biotecnología de Plantas

978-84-694-8912-3

© Eliana López Colomba

© Para esta edición, la Universidad Internacional de Andalucía



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciadore (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
 - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
 - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
-
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
 - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
 - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA
SEDE IBEROAMERICANA SANTA MARÍA DE LA RABIDA
PALOS DE LA FRONTERA – HUELVA – ESPAÑA**



**TESIS DE MAESTRÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MASTER EN
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA
PARA TOLERANCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS
MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO*
EN *Cenchrus ciliaris* L.**

**Tesista
Ing. Agr. ELIANA LOPEZ COLOMBA**

**Tesis de Maestría desarrollada en el
Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal**



Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria



Director de Tesis:

Dr. José Ignacio Cubero

Co-Directora de Tesis:

Dra. Karina Grunberg

Córdoba, Argentina

Año 2009

Agradecimientos

A mis padres, Norma y Juan, por su apoyo incondicional.

Le agradezco al Ing. Agr. Elvio Biderbost la posibilidad de llevar a cabo este proyecto de tesis en el Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE-INTA), Córdoba, Argentina.

Al Dr. José Ignacio Cubero y a la Dra. Karina Grunberg por guiarme en esta etapa.

A mi compañera de trabajo y amiga, Licenciada en Química Amalia Saavedra Pons, por toda la ayuda y dedicación que me ha brindado día a día para que este proyecto se haya visto realizado.

Resumen

El presente trabajo está enmarcado en un proyecto nacional del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) relacionado con la introducción, caracterización y mejoramiento de especies forrajeras subtropicales. En este contexto, el objetivo general del proyecto nacional es incrementar la productividad, la calidad y/o la persistencia de las pasturas cultivadas a través del desarrollo de cultivares forrajeros superiores adaptados a los distintos ambientes y sistemas de producción.

Los estreses abióticos, como salinidad y sequía, son unos de los principales agentes que afectan negativamente la producción de biomasa, rendimiento y persistencia de pasturas forrajeras subtropicales, constituyentes base de la cadena alimentaria de pastoreo en la zona del noroeste argentino. Entre las especies forrajeras subtropicales de amplia difusión en esta zona podemos mencionar a *Cenchrus ciliaris* L. No obstante, su condición de apomíctica obligada, limita la generación de variabilidad y el mejoramiento para caracteres relacionados con tolerancia a estreses abióticos. La implementación de técnicas de mutaciones inducidas y selección *in vitro* podría ser una herramienta útil para acelerar procesos de mejora genética a fin de inducir variabilidad genética asociada a caracteres de tolerancia a salinidad y sequía. El tratamiento con los agentes mutagénicos, EMS y rayos X, incrementó la frecuencia de cambios genéticos, evidenciándose mayores alteraciones morfológicas con la aplicación del agente físico. Como resultado de este trabajo se obtuvo germoplasma novedoso, difícil de obtener por otra vía. Es así que los mutantes obtenidos constituyen una importante fuente de recursos genéticos aprovechable para el lanzamiento de cultivares comerciales con tolerancia incrementada a estreses abióticos.

Palabras claves: mutaciones inducidas, selección *in vitro*, *Cenchrus ciliaris* L.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
LISTA DE TABLAS.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	7
ANTECEDENTES GENERALES	9
<i>Cenchrus ciliaris</i> L. (Buffel grass)	13
La apomixis en el marco del mejoramiento genético	16
Mutaciones inducidas y agentes mutagénicos.....	19
Los estreses abióticos.....	24
Tolerancia de los cultivos a la salinidad	27
El efecto de la sequía en las plantas	30
Mutagénesis inducida y selección <i>in vitro</i>	33
Marcadores moleculares	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
Material vegetal	42
Acondicionamiento y desinfección de semillas.....	42
Inducción de mutaciones mediante agentes mutagénicos	43
<i>Agente mutagénico químico etilmetanosulfonato</i>	44
a. Determinación de la dosis letal 50 (DL50)	44
b. Ensayos masivos	45
<i>Agente mutagénico físico rayos X</i>	46
a. Determinación de la dosis letal 50 (DL50)	46
b. Ensayos masivos	47

Selección <i>in vitro</i> de mutantes con tolerancia a estrés abiótico	48
<i>Salinidad (NaCl)</i>	48
<i>Sequía (manitol)</i>	49
Detección de la variabilidad genética inducida mediante RAPD	51
Material Vegetal	51
Extracción de ADN genómico total	51
Cuantificación del ADN	52
<i>Protocolo de la técnica RAPD.....</i>	52
Cebadores	52
Amplificación RAPD-PCR	53
RESULTADOS	57
Inducción de variabilidad genética mediante agentes mutagénicos.....	58
<i>Agente mutagénico etilmetanosulfonato</i>	58
a. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)	58
b. Ensayos masivos	63
<i>Inducción de variabilidad mediante rayos X</i>	63
a. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)	63
b. Ensayos masivos	67
Selección <i>in vitro</i> de mutantes con tolerancia a estrés abiótico	68
Etilmetanosulfonato – Salinidad (NaCl)	70
Etilmetanosulfonato – Sequía (Manitol)	71
Rayos X – Salinidad (NaCl)	73
Rayos X – Sequía (Manitol)	75
Detección de la variabilidad genética inducida mediante RAPD	77
Análisis con RAPD	77
DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA.....	98

Lista de Tablas

Tabla 1. Secuencia de cebadores de las series A y B de Promega.	53
Tabla 2. Protocolo de Gustine <i>et al.</i> (1996) modificado: reactivos y concentraciones.	54
Tabla 3. Programa de amplificación RAPD-PCR propuesto por Promega.	55
Tabla 4. Cuadro de análisis de la varianza para la variable porcentaje de germinación de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratadas con distintas concentraciones de EMS.	60
Tabla 5. Porcentaje de germinación en medio MS de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratadas con EMS.	61
Tabla 6. Cuadro de análisis de la varianza para ensayo de germinación de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela irradiadas con diferentes dosis de rayos X.	66
Tabla 7. Porcentaje de germinación en medio MS de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela irradiadas con rayos X.	67
Tabla 8. Cebadores usados para la amplificación del ADN de las 54 plantas putativas mutantes y número de fragmentos amplificados y de fragmentos polimórficos obtenidos.	78
Tabla 9. Número de cebadores que mostraron polimorfismo y número de bandas polimórficas obtenidas para cada una de las putativas mutantes.	79
Tabla 10. Número total de plantas obtenidas, número de plantas que mostraron polimorfismo y porcentaje de variación observada para los tratamientos con EMS ó con rayos X.	79

Lista de Figuras

Figura 1. Regiones productoras de ganado vacuno en la República Argentina.	10
Figura 2. <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela, cultivado en el IFFIVE-INTA, Córdoba, Argentina.....	14
Figura 3. Fórmula química del Etilmetanosulfonato.....	21
Figura 4. Acción del EMS sobre el oxígeno 6 de la guanina, formándose O-6-etil-guanina, la cual se aparea con timina.	22
Figura 5. Tolerancia a sales solubles de diversos cultivos forrajeros.....	28
Figura 6. Germinación (%) de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratadas con 0, 5, 6, 7 y 10 mM de EMS durante 23 horas de exposición.	59
Figura 7. Planta obtenida de semilla de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS expuesta durante 23 horas, cultivada 30 días en medio MS.....	62
Figura 8. Plantas obtenidas de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratadas con 5,5 mM de EMS expuestas durante 23 horas, cultivadas durante 15 días en medio basal MS.....	62
Figura 9. Germinación (%) de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela irradiadas con 10, 20, 30 y 40 Kr, cultivadas en medio MS. Recuento a los 7 días de cultivo. Control: 0 Kr.....	64
Figura 10. Plantas de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela correspondientes al tratamiento control (0 Kr) de una misma repetición, a los 20 días posteriores a ser germinadas <i>in vitro</i> en medio MS.	65
Figura 11. Plantas provenientes de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela irradiadas con 40 Kr de una misma repetición, a los 20 días posteriores a ser germinadas <i>in vitro</i> en medio basal MS.....	65
Figura 12. Esquema del proceso de selección <i>in vitro</i> con NaCl y manitol, posterior al tratamiento de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela con EMS ó rayos X y germinadas <i>in vitro</i>	69
Figura 13. Detalle de la inflorescencia atrofiada en planta obtenida a partir de semilla de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS durante 23 horas de exposición y sometida a 100 mM de NaCl.....	70
Figura 14. Detalle de una planta seleccionada <i>in vitro</i> a 200 mM de NaCl, proveniente de semilla de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS.....	71
Figura 15. Detalle de una planta seleccionada <i>in vitro</i> a 100 mM de manitol, proveniente de semilla de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS.....	72
Figura 16. Planta con modificaciones morfológicas, obtenida a partir de semilla de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS y seleccionada con 100 mM de manitol.....	73

Figura 17. Plantas obtenidas de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela, irradiadas con 40 Kr y posterior selección <i>in vitro</i> en medio MS con dosis crecientes de NaCl A) Tallo dicotómico B) hojas enlazadas C) acortamiento de entrenudos D) hojas enrolladas y torcidas E) entrenudos acortado.....	74
Figura 18. En el centro, planta control sin tratar (0 Kr). A la izquierda y derecha se observan plantas obtenidas a partir de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela tratadas con 40 Kr y seleccionadas en NaCl.	75
Figura 19. Plantas obtenidas de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> L. cv. Biloela, tratadas con 40 Kr y seleccionadas con manitol. A) con tallo delgado con brote engrosado B) de reducida altura sin entrenudos y hojas pequeñas.	76
Figura 20. Cebador A3. Plantas seleccionadas por tolerancia a manitol: del 1 al 5: de semillas tratadas con EMS; del 6 al 10: de semillas tratadas con rayos X. Ct: Testigo cv. Biloela. La flecha indica la ausencia de la banda respecto del testigo. MM: marcador ADN Ladder 1 Kb (Promega).....	80
Figura 21. Cebador B2. Plantas seleccionadas por tolerancia a manitol: del 1 al 5: de semillas tratadas con EMS; del 6 al 10: de semillas tratadas con rayos X. Ct: Testigo cv. Biloela. Las flechas indican las bandas ausentes en relación al control. MM: marcador ADN Ladder 1 Kb.	81
Figura 22. Cebador A2. Plantas seleccionadas por tolerancia a NaCl de semillas tratadas con: líneas 1 al 6: EMS, líneas 7 al 10: con rayos X. Ct: Testigo cv. Biloela. Las flechas indican las bandas polimórficas. MM: marcador ADN Ladder 1 kb.....	83
Figura 23. Cebador A10. Plantas seleccionadas por tolerancia a sal: del 1 al 8: de semillas tratadas con EMS. Ct: Control cv. Biloela. La flecha indica la banda adicional en relación al control. MM: marcador ADN Ladder 1 kb.....	83
Figura 24. Cebador A10. Plantas seleccionadas por tolerancia a sal: del 1 al 8: de semillas irradiadas con rayos X. Ct: Testigo cv Biloela. Las flechas indican las bandas adicionales en relación al testigo. MM: marcador ADN Ladder 1 kb.	84

Lista de Abreviaturas y Símbolos

ADN	ácido desoxiribonucleico
atm	atmósfera
cm	centímetro
cv.	cultivar
dNTPs	deoxinucleótidos
ds/m	decisiemens/metro
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EMS	etilmetanosulfonato
°C	grado centígrado
g	gramo
h	hora
ha	hectárea
kb	kilobases: miles de pares de bases
Kg	kilogramo
Kr	kriptón
m	metro
mg	miligramo
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
MPa	megapascales
MS	medio basal Murashige y Skoog (1962)
N°	número
N	Normal
NaCl	cloruro de sodio
ng	nanogramo
nm	nanometro
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
p/v	peso en volumen
%	porcentaje
RAPD	ADN Polimórfico Amplificado al Azar
rpm	revoluciones por minuto
TBE	tris-borato-EDTA
TE	tris-EDTA Tris[hidroximetil]amino-metano
µg	microgramo

μL	microlitro
μm	micrómetro
μmol	micromol
μM	micromolar
v/v	volumen en volumen

ANTECEDENTES GENERALES

La República Argentina se ha identificado históricamente, por ser un país ganadero por antonomasia (Chiossone, 2006). La actividad pecuaria se concentra principalmente en las regiones pampeana, noreste y noroeste del país y tiene como uno de sus principales componentes de la alimentación a las pasturas cultivadas, tanto anuales como perennes (De León, 2004; Reartes, 2007) (Figura 1).



Figura 1. Regiones productoras de ganado vacuno en la República Argentina.

No obstante, en los últimos años, ha tenido lugar un continuo y creciente proceso de agriculturización que tiende a ocupar zonas tradicionalmente dedicadas a la ganadería para la explotación de soja (Reartes, 2004). Esta situación redujo la superficie destinada a la implantación de pasturas e incrementó, además, la carga animal por hectárea. De esta manera, en cada una de las zonas de producción ganadera, se circunscribió esta actividad hacia áreas agroecológicas más desfavorables, generando así, una fuerte demanda de forrajes de buena productividad, calidad y persistencia, y con tolerancia a condiciones ambientes desfavorables, para abastecer los requerimientos nutricionales del ganado (Minson and Bray, 1985).

La región del noroeste del país, área prioritaria de estudio de nuestro grupo de trabajo, se dedica a la cría y recría de ganado vacuno (De León, 2004; Reartes, 2004; Reartes, 2007). Esta región se caracteriza por lluvias escasas y estacionales, altas temperaturas e insolación durante el verano y suelos con diferentes texturas y grados de salinidad (De León, 2004). La estructura de la vegetación se compone casi exclusivamente de gramíneas nativas de crecimiento estival, un estrato arbustivo dominante y un estrato arbóreo que ha sufrido históricamente procesos de talado. El pastizal natural es la base forrajera que sustenta a más de 4.000.000 de cabezas de ganado vacuno (Rearte, 2007), no obstante, presenta una marcada heterogeneidad según la mayor o menor influencia del contenido de sales en el suelo y las precipitaciones, lo que plantea entonces importantes restricciones alimenticio-nutricionales. Asimismo, la rápida degradación de las pasturas nativas, resultado del creciente progreso de la agricultura intensiva, limitan su productividad, con la consecuente reducción en la carga animal (De León, 2004).

Considerando el consumo del mercado interno argentino y pensando en la demanda a futuro del comercio internacional de carnes no puede obviarse la inminente transformación de la región del noroeste, de una zona de cría de terneros a una región productora de carne. Esto obligaría a ajustar sus sistemas de

producción y a incrementar el potencial productivo de las pasturas de dichos sistemas, teniendo en cuenta las limitaciones edafo-climáticas presentes en la región. La genética permite abordar estos desafíos a través del desarrollo de cultivares de especies forrajeras adaptados a diversos ambientes, como una de las prácticas tecnológicas apropiadas para la intensificación de la producción ganadera bajo las condiciones planteadas.

En este contexto, las gramíneas megatérmicas perennes introducidas se presentan como un recurso forrajero cultivado de renovado interés para esta zona, ya que diversos estudios demuestran que pueden duplicar o triplicar la cantidad de forraje producido respecto de los pastizales naturales (Ayerza, 1981a; Pérez, 2005). Entre las especies forrajeras más adecuadas en relación a esta problemática, y con las que se cuenta en la región semiárida del país podemos mencionar a *Cenchrus ciliaris* L. (Buffel grass), *Panicum maximum* L. y *Chloris gayana* K. (Ayerza, 1981a; Ayerza, 1982). Estas especies son capaces de adaptarse a las condiciones imperantes de esta región, produciendo pasto durante períodos de tiempo más prolongados que las pasturas nativas, respondiendo a los aumentos de temperatura, independiente de la ocurrencia de precipitaciones (Ayerza, 1981b).

La introducción de pasturas que produzcan mayor cantidad de materia seca (Kg/ha), de adecuado valor nutritivo, con prácticas culturales y de manejo más eficientes, y/o la implementación de estrategias de mejoramiento genético de germoplasma ya adaptado permitirían un mejor aprovechamiento de los recursos forrajeros, con la consecuente mejora de los esquemas de producción ganadera en esta región.

***Cenchrus ciliaris* L. (Buffel grass)**

Entre las pasturas subtropicales introducidas en Argentina, *Cenchrus ciliaris* L. ha demostrado su excelente comportamiento en zonas de bajas precipitaciones anuales (desde 350 milímetros) y altas temperaturas en verano. Es capaz de producir forraje en condiciones limitantes para el crecimiento de otras especies forrajeras tales como *Panicum maximum* L. y *Chloris gayana* K. (De León, 2004), aunque la producción de materia seca por unidad de superficie se ve reducida y es de menor valor alimenticio.

Cenchrus ciliaris L. (Figura 2), perteneciente a la tribu *Paniceae* (*Gramineae-Panicoideae*), es un pasto vigoroso, estival, perenne, con tolerancia a altas temperaturas (45°C) y algunos de sus cultivares, al frío invernal (-10°C) (Ayerza, 1981a). Asimismo posee una marcada tolerancia a la sequía y moderada a la salinidad (Skerman *et al.*, 1992). Es de fácil implantación y con buen valor forrajero (Hignight *et al.*, 1991; Sherwood *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1994; Ibarra-F. *et al.*, 1995).

En los últimos años, se ha incrementado la importación de semillas forrajeras subtropicales (INASE, 2005), lo que denota la demanda creciente de este tipo de especies. Con respecto a Buffel grass, en la región noroeste de nuestro país, los cultivares más adaptados y difundidos comercialmente son Texas 4464, Biloela y Molopo (De León, 2004; Pérez, 2005).

El Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Córdoba, Argentina) mantiene y propaga una colección activa de 14 cultivares introducidos de Buffel grass, a saber: Americana, Biloela, Boorara, CPI, Gayndah, Messina, Molopo, Molopo Anguil, Nueces, Nunbank, Tarewinnabar, Texas, Thabazimbi y Toowomba. Éstos presentan variaciones respecto a sus caracteres morfológicos, agronómicos y en su respuesta frente a diferentes estreses abióticos (Graham and Humphreys, 1970; Ayerza, 1981a;

Griffa, com. pers.). La mayoría de estos cultivares, de difusión en áreas tropicales y subtropicales, son provenientes de África e India y han sido introducidos a América y Australia a principios del siglo veinte.

Con respecto al cv. Biloela (Figura 2), éste fue introducido a través de recolecciones realizadas en Dodoma, Tanzania, en 1937, por CSIRO, Australia (centro de introducción de plantas) y testeado en Rockhampton, Queensland.



Figura 2. *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela, cultivado en el IFFIVE-INTA, Córdoba, Argentina.

Es un cultivar erecto, de porte alto, de crecimiento estival, llegando a medir en promedio 1,5 metros de altura. En nuestras condiciones de cultivo, los picos de floración ocurren en los meses de enero y febrero, principalmente. Crece en diversos tipos de suelos y posee buenos rendimientos (kg de materia seca/ha) en suelos francos, o franco-arcillosos con abundantes precipitaciones (500-890mm).

Presenta rizomas y forma macollos laterales que aparecen entre los principales. Se adapta a suelos pobres en materia orgánica, sin embargo, no tolera períodos de inundación.

Con respecto a su tolerancia al estrés salino mantiene buenos rendimientos aún en valores de 80 mM de cloruro de sodio (Graham and Humphreys, 1970) por lo que se lo considera un cultivar medianamente tolerante.

Es una pastura de buena aceptación por parte del ganado, de buen valor alimenticio, con valores de digestibilidad de la materia seca y proteína cruda, que lo hacen unos de los cultivares más utilizados en todas las áreas de difusión (De León, 2004; Pérez, 2005).

La apomixis en el marco del mejoramiento genético

Buffel grass es una especie tetraploide ($4x=36$), con manifestación de aneuploidía y pseudogamia, siendo conocida su condición de apomíctica obligada (Snyder *et al.*, 1955; Hignight *et al.*, 1991; Jessup *et al.*, 2003; Ozias-Akins *et al.*, 2003; Bhat *et al.*, 2005; Ozias-Akins, 2006; Singh *et al.*, 2007).

La apomixis ha sido descrita en al menos 33 de las 460 familias que componen las angiospermas, sin embargo, ha sido frecuentemente observada en Poaceae, Asteraceae y Rosaceae (Goel *et al.*, 2003; Goel *et al.*, 2006). Dentro de la familia mencionada en primer término, se encuentran numerosas especies forrajeras, entre las que se menciona a *Cenchrus ciliaris* L. (Gualtieri *et al.*, 2006; Miles, 2007).

Este modo de reproducción se caracteriza por eludir la ruta sexual evitando la reducción meiótica y la fecundación (Jessup *et al.*, 2003; Ozias-Akins, 2006). Por tal razón, las semillas que derivan de la reproducción apomíctica, portan embriones genéticamente idénticos al progenitor femenino (Ozias-Akins, 2006; Miles, 2007), con nula expresión de variabilidad intra-cultivar seleccionable.

La condición de apomixis ofrece ventajas en relación a la propagación a través de semillas y por la fidelidad genética que brinda la reproducción asexual (Miles, 2007). Sin embargo, es una dificultad a la hora de buscar recombinación para obtener genotipos de mejor aptitud agronómica (Miles, 2007).

En las especies apomícticas obligadas, los cultivares comerciales lanzados al mercado consisten de líneas (clones) seleccionadas a partir de colecciones naturales (Miles, 2007), mutaciones espontáneas (Bhat *et al.*, 2001) y cruzamientos dirigidos (Jessup, 2005).

Con respecto a los avances logrados en el mejoramiento convencional de *Cenchrus ciliaris* L., esta especie cuenta con dos fuentes de sexualidad reconocidas

a nivel mundial (Bashaw, 1962; Bhat *et al.*, 2005; Kaushal *et al.*, 2005), lo que brinda la posibilidad de obtener híbridos mediante cruzamientos dirigidos resultado de la recombinación genética entre cultivares apomícticos como dadores de polen y la estirpe sexual, como progenitor femenino. A través de esta vía, se obtuvieron nuevos genotipos como son los cultivares registrados: Nueces, Llanos, y Frío Buffel grass (Bashaw, 1980; Hussey and Burson, 2005). Sin embargo, los logros en cuanto a la obtención de nuevos cultivares en esta especie son reducidos y la mayoría se han restringido a los lugares en los que fueron obtenidos.

Nuestro grupo de trabajo cuenta con una de estas fuentes sexuales (Bashaw, 1962) y actualmente se realizan cruzamientos dirigidos entre esta estirpe y los genotipos apomícticos obligados. Sin embargo, la posibilidad de obtener híbridos con características agronómicas superiores a los cultivares difundidos en la zona semiárida de la República Argentina es dificultosa, considerando la barrera que impone la apomixis (Spangenberg, 2004) y dependería de la ocurrencia de un evento heterótico, hecho que sucede en pequeña proporción (Biderbost, com. pers.).

Por otra parte, otra vía para la obtención de nuevo germoplasma en especies apomícticas obligadas es la utilización de métodos no tradicionales (Ahoowalia and Maluszynski, 2001). En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas biotecnológicas y moleculares para el mejoramiento de gramíneas y leguminosas forrajeras (Spangenberg, 2004). Entre ellas pueden citarse la variación somaclonal, transgénesis, inducción de mutaciones, fusión de protoplastos, etc. De esta manera, se pueden generar cultivares mejorados para caracteres de interés agronómico que, a través del mejoramiento convencional, no podrían lograrse (Ahoowalia and Maluszynski, 2001; Mohan Jain, 2001; Mohan Jain, 2005).

Los datos de la FAO/IAEA indican, según informes del año 2000, que se han lanzado al mercado más de 2300 variedades comerciales, difundidas

mundialmente, logradas mediante mutaciones inducidas (Maluszynski, 2001; Ahloowalia and Maluszynski, 2001; Ahloowalia *et al.*, 2004, Joseph *et al.*, 2004; Mohan Jain, 2005 Hossain *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007a). Más del 70% de estas variedades (mutantes *per se*, o generadas por hibridaciones o retrocruzas) se obtuvieron después del año 1985 y corresponden a cereales y leguminosas, mientras que el porcentaje restante, incluye principalmente a ornamentales y decorativas (Ahloowalia *et al.*, 2004; Mohan Jain, 2005).

Los parámetros mejorados a través de mutaciones inducidas incluyen caracteres de altura, sincronización de la floración, maduración rápida, rendimiento de materia seca, incremento en la producción de grano, tolerancia a estreses abióticos y bióticos, contenido de proteínas, porcentaje de aceite, entre los más observados (Ahloowalia *et al.*, 2004). Cabe señalar que, en muchos casos, la mejoría en algunos de estos parámetros tuvo un efecto secundario beneficioso sobre el desarrollo del cultivo a campo, mencionando por ejemplo, el escape a insectos en cultivares de maduración más temprana o tardía según la especie (Ahloowalia *et al.*, 2004).

Mutaciones inducidas y agentes mutagénicos

Contar con variabilidad genética es el principal paso dentro de un programa de mejoramiento, la cual permite la selección de cultivares para diversos fines (Brunner, 1995), como mayor rendimiento, contenido de proteínas o aceites, tolerancia a factores bióticos o abióticos, entre otros.

Dentro de las herramientas de mejoramiento genético disponibles para incrementar la diversidad genética, se mencionan como más importantes, la hibridación, la recombinación y la mutación (natural o inducida) (Donini and Sonnino, 1998; Atak *et al.*, 2004).

Las mutaciones se generan de manera espontánea en la naturaleza, pero en una frecuencia reducida (alrededor de 10^{-5} y 10^{-8}). Para poder incrementar la tasa de ocurrencia (10^{-6} y 10^{-4}) se pueden utilizar diversos agentes mutagénicos químicos y/o físicos (Brunner, 1995; Donini and Sonnino, 1998; Predieri and Zimmerman, 2001; Ravindra *et al.*, 2004; Able and Langridge, 2006; Waugh *et al.*, 2006).

Dentro de los agentes más empleados para inducir estos cambios se pueden mencionar los agentes químicos como azida sódica y etilmetanosulfonato (EMS) y los agentes físicos como rayos gamma y X (Ahloowalia and Maluszynski, 2001; Ahloowalia *et al.*, 2004; Liu, *et al.*, 2005; Mohan Jain, 2005). Estos elementos son reconocidos por inducir cambios a nivel génico, cromosómico y genómico, tanto en el ADN nuclear como en el citoplasmático (Donini and Sonnino, 1998).

Uno de los beneficios que presenta el uso de agentes químicos es la alta tasa de mutaciones puntuales que imponen (Mohan Jain, 2005), evitando la aparición de fenotipos aberrantes (Rocha Latado *et al.*, 2004; Mohan Jain, 2005; Luan *et al.*, 2007). A diferencia de ellos, las radiaciones ionizantes penetran profundamente en los tejidos, generando cambios no puntuales tales como traslocaciones, rearreglos o

rupturas cromosómicas (Donini and Sonnino, 1998; Ahloowalia *et al.*, 2004; Atak *et al.*, 2004; Hohmann, 2005; Mohan Jain, 2005). Sin embargo, la seguridad de la dosimetría, la reproducibilidad y la penetrancia uniforme en los organismos multicelulares (Donini and Sonnino, 1998; Mohan Jain, 2005) han permitido la gran difusión de los agentes físicos en los programas de mejoramiento genético.

Las alteraciones genéticas producidas por los mutágenos físicos son debidas a la ionización y la excitación de la molécula de ADN, induciéndose además diferentes tipos de cambios químicos. Existen evidencias en la bibliografía que demuestran que estos tipos de irradiación estimulan la actividad metabólica de las plantas, como la respiración, la glicólisis, la actividad de la enzima catalasa, y la fosforilación oxidativa (Rekha and Langer, 2007).

Las radiaciones ionizantes han sido utilizadas ampliamente, obteniéndose numerosos mutantes a través de estas técnicas (Mičochova *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2007; Hung and Johnson, 2008). De acuerdo a las bases de la FAO/IAEA, de las 434 variedades de arroz lanzadas al mercado, 225 fueron inducidas por rayos gamma, 16 con rayos X y el resto con otras fuentes de radiación (Ahloowalia *et al.*, 2004).

Se han modificado propiedades físico-químicas del almidón en arroz (Wu *et al.*, 2002) y proteínas en soja (Manjaya *et al.*, 2007) a través de la irradiación de explantos con rayos gamma, permitiendo generar cultivares con características organolépticas superiores a los parentales. Hung and Johnson (2008) a través de la irradiación con rayos X y gamma pudieron obtener mutantes con patrones alterados de componentes químicos en *Wasabia japonica*.

Con respecto a estreses bióticos, genotipos resistentes a enfermedades obtenidos a partir de mutaciones con radiaciones ionizantes han sido mencionados en cultivos de importancia agronómica como arroz, trigo, banana y caña de azúcar (Bhagwat and Duncan, 1998a; Kinane and Jones, 2001; Hung and Johnson, 2008; Patade and Suprasanna, 2008).

Se obtuvieron mutantes con características de tolerancia a salinidad en arroz (Saleem *et al.*, 2005) y en caña de azúcar (Patade and Suprasanna, 2008), combinando rayos gamma con selección *in vitro* para dicho estrés.

Con respecto a los mutágenos químicos, el EMS ($C_3H_8O_3S$) (Figura 3) es un agente mutagénico de tipo alquilante que añade grupos alquilo (etilo) a las bases nitrogenadas, especialmente a guaninas. La adición ocurre, en general, en el oxígeno 6 de esta base, dando lugar a la forma anormal O-6-etil-guanina. Durante la replicación, la ADN polimerasa no reconoce esta forma modificada de guanina e introduce timina como base complementaria en vez de citosina, su complementaria en el silvestre. De este modo, un par G:C acaba convirtiéndose, tras dos replications, en uno A:T (Figura 4), induciendo la aparición de dichas transiciones GC→AT con una tasa de 10^{-4} a 10^{-2} por gen (Griffiths, 1996).

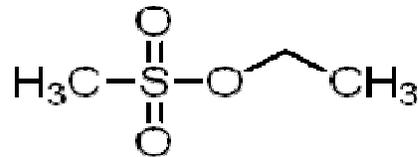


Figura 3. Fórmula química del Etilmetanosulfonato.

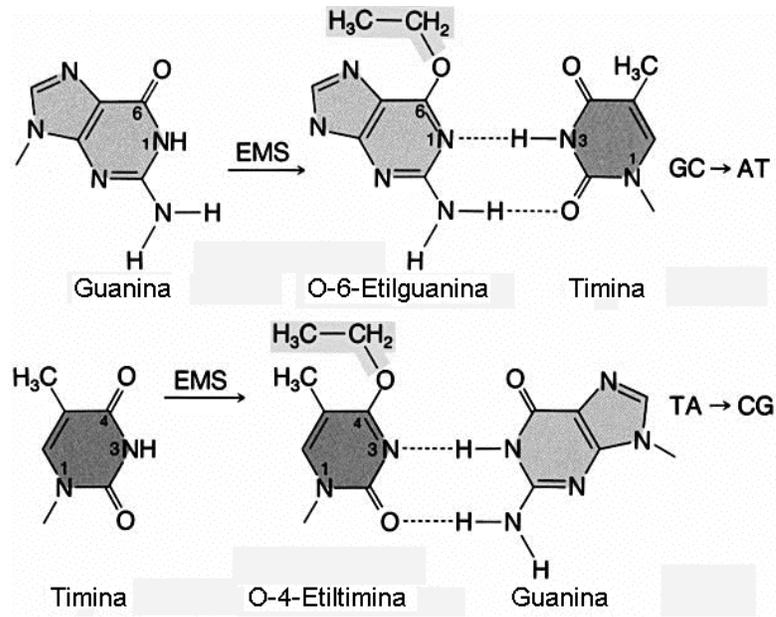


Figura 4. Acción del EMS sobre el oxígeno 6 de la guanina, formándose O-6-etil-guanina, la cual se aparea con timina.

El EMS es conocido por provocar mutaciones puntuales (Luan *et al.*, 2007), con efectos pleiotrópicos, mostrando modificaciones en más de un carácter, quizás en parte porque dichas mutaciones ocurren en diferentes loci (Basu *et al.*, 2008). En este aspecto, Rekha and Langer (2007) indujeron mutantes con caracteres morfo-bioquímicos alterados en *Artemisia pallens* Bess.

Se cita en la bibliografía la aparición de mutantes inducidos a través de EMS, con características mejoradas para producción de semillas en Fenugreek (Basu *et al.*, 2008), para caracteres productivos en remolacha y garbanzo (Hohmann *et al.*, 2005; Gaur *et al.*, 2008), así como también para tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Liu *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2007).

La obtención de cultivares de difusión comercial mejorados para caracteres agronómicos ha permitido la implementación de mutaciones con este agente químico dentro de un programa de mejoramiento genético, por ser una herramienta

barata y fácilmente accesible, siendo su principal desventaja la inespecificidad del carácter mutado (Donini and Sonnino, 1998), por lo cual se requiere gran cantidad de explantos tratados para que se puedan rescatar individuos diferenciales para el carácter de interés. Asimismo, es importante considerar que la tasa de supervivencia de los explantos tratados, se reduce con el aumento de la dosis y conjuntamente es mayor el riesgo de que mutaciones favorables se vean acompañadas de mutaciones desfavorables (Bhagwat and Duncan, 1998b). Es así que la concentración, el tiempo de exposición y el tipo de tratamiento mutagénico deberían ser combinados en forma tal que permitan producir progenies fértiles en generaciones avanzadas (M_2 y M_3). Para ello, es frecuente la utilización de una dosis letal 50 (aquella dosis que permite el 50% de supervivencia del explanto original) (Donini and Sonnino, 1998).

Los estreses abióticos, como salinidad y sequía, son unos de los principales agentes que afectan negativamente la producción de biomasa y el rendimiento de los cultivos, disminuyendo a un valor del 70% su potencial productivo (Xiong and Zhu, 2002; Xiong *et al.*, 2002; Borsani *et al.*, 2003; Ashraf, 2004; Yamaguchi and Blumwald, 2005; Vinocur and Altman, 2005; Agarwal *et al.*, 2006; Umezaka *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2007).

A nivel global, existen aproximadamente 900×10^6 ha de suelo afectadas por salinidad que resultan marginales o no aptas para la agricultura y la ganadería, ya que la mayoría de los cultivos extensivos son susceptibles o escasamente tolerantes a esta condición (Flowers, 2004; Yamaguchi and Blumwald, 2005; Koiwa *et al.*, 2006). El área salinizada crece constantemente, debido a la acción antrópica, por la difusión de la agricultura irrigada y la utilización de aguas de riego de mala calidad (Flowers and Yeo, 1995; Flowers, 2004; Flowers and Flowers, 2005; Yamaguchi and Blumwald, 2005; Verlues *et al.*, 2006). La escasez de precipitaciones en áreas semiáridas y áridas, y la inadecuada disponibilidad de agua durante el ciclo de cultivo, ocasionan pérdidas en la producción de biomasa que representan junto a la salinidad, las limitantes más importantes en la producción de forrajes (Zhang *et al.*, 2006).

Existen diversas estrategias tendientes a reducir el impacto de estos estreses sobre la producción agrícola-ganadera, las cuales involucran tanto acciones sobre los suelos (para reducir la salinización y mejorar su estructura física) como esfuerzos para lograr variedades más tolerantes. Esta última estrategia se considera más sustentable y viable económicamente (Flowers, 2004; Agarwal *et al.*, 2006). Cultivos de mejor comportamiento frente a estreses abióticos pueden generarse a través de metodologías de tipo convencional o mediante la utilización de herramientas biotecnológicas (Sreenivasulu *et al.*, 2007).

En relación al mejoramiento convencional, éste está basado fundamentalmente en la explotación de la variación natural (intra o inter-específica) mediante la selección para caracteres asociados a tolerancia (Ashraf, 2004). Sin embargo, el progreso en la obtención de cultivares tolerantes ha sido lento y con poco éxito (Bajji *et al.*, 2004; Flowers and Flowers, 2005; Yamaguchi and Blumwald, 2005). Entre las principales causas, se pueden mencionar la complejidad de este atributo, la escasa variación genética de los componentes del rendimiento en condiciones de estrés y que los procesos de selección no han sido exitosos en el rescate de individuos tolerantes (Cushman and Bohnert, 2000).

El principal problema que afronta el mejoramiento genético es que los mecanismos que operan para definir la tolerancia a los estreses abióticos, son de difícil comprensión (Gandonou *et al.*, 2006). Los estudios han demostrado que este atributo está conformado por componentes de tipo cuantitativos, complejos, gobernados por numerosos genes, mostrando heterosis, dominancia y efectos aditivos (Borsani *et al.*, 2003; Flowers, 2004; Flowers and Flowers, 2005; Varshney *et al.*, 2005; Yamaguchi and Blumwald, 2005; Varshney *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2007). Debido a ello, ha sido difícil obtener tolerancia a estreses en cultivos, considerando que al intentar mejorar la misma, se ven afectados otros parámetros poligénicos también, como lo son los caracteres componentes de rendimiento (Borsani *et al.*, 2003; Ashraf, 2004; Flowers, 2004).

En la actualidad, con el advenimiento de la genética molecular, aparecen en escena diversas herramientas biotecnológicas para complementar las metodologías tradicionales (Flowers, 2004; Vinocur and Altman, 2005; Yamaguchi and Blumwald, 2005; Sreenivasulu *et al.*, 2007), entre las que se pueden mencionar, el mapeo de loci asociados a caracteres cuantitativos (QTL; del inglés *quantitative trait loci*), la selección asistida por marcadores moleculares (MAS), y la obtención de plantas transgénicas con genes nuevos o que alteran la expresión de genes existentes para

inducir tolerancia a estreses (Flowers and Flowers, 2005; Yamaguchi and Blumwald, 2005; Jauhar, 2006; Varshney *et al.*, 2006).

En relación a las especies forrajeras, diversos factores contribuyen al escaso mejoramiento genético por las metodologías antes mencionadas. Una de las principales limitaciones que se pueden señalar, es que son en su gran mayoría poliploides, genéticamente complejas y las investigaciones en relación a las bases genéticas de la tolerancia se han centrado en cultivos de importancia económica (Zhang *et al.*, 2006).

En diversos trabajos se cita la obtención de cultivares mejorados para caracteres de interés agronómico, entre ellos tolerancia a estreses abióticos y bióticos, a través de mutaciones inducidas (Mohan Jain, 2001; Mohan Jain, 2005). A pesar del carácter azaroso de las mismas, y de la aparición de numerosos caracteres recesivos, se han obtenido genotipos por vía directa o a través de sus progenies de gran trascendencia regional y distribución mundial (Ahloowalia *et al.*, 2004; Mohan Jain, 2005).

Tolerancia de los cultivos a la salinidad

La salinidad es una condición del suelo que se caracteriza por la presencia de altos niveles de sales solubles en su perfil. De esta manera, los suelos son clasificados en salinos cuando la conductividad eléctrica del extracto de saturación (ECe) es igual o superior a 4 ds/m (mmhos/cm), lo que equivale aproximadamente a 40 mM de NaCl, generando una presión osmótica de 0,2 MPa (Munns and Tester, 2008).

Las sales solubles presentes con mayor frecuencia en el perfil del suelo son los cloruros (NaCl, CaCl₂, MgCl₂), siendo de menor trascendencia la presencia de sulfatos y carbonatos (Munns and Tester, 2008). Entre las sales más abundantes y de amplia distribución se cita al NaCl (Munns and Tester, 2008), por lo cual, la mayoría de los trabajos utilizan esta sal para evaluar la respuesta de las plantas frente al estrés salino, y con la finalidad de seleccionar individuos tolerantes (Verlues *et al.*, 2006; Munns and Tester, 2008).

La respuesta de las plantas frente al estrés salino contempla la existencia de un abanico continuo de grados de tolerancia, desde las altamente sensibles a las muy tolerantes, en función de su capacidad para crecer en dichas condiciones (Munns *et al.*, 2002; Sairam and Tyagi, 2004; Verlues *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de los cultivos no toleran estrés salino, y el rango de susceptibilidad es genotipo-dependiente (Munns *et al.*, 2002; Munns and Tester, 2008).

En consideración de que aproximadamente 50 ds/m es la conductividad eléctrica en el agua de mar, se cita que por ejemplo la cebada, un cultivo tolerante muere a concentraciones superiores a 25 ds/m (Munns *et al.*, 2002).

En la siguiente figura (Figura 5) se muestra la tolerancia a salinidad en algunas gramíneas forrajeras, medida en términos de reducción del rendimiento.

	Relative yield decrease — %			
	0	10	25	50
	mmhos/Cm			
Tall wheatgrass	7.5	9.9	13.3	19.4
Wheatgrass	7.5	9.0	11.0	15.0
Crested wheatgrass	3.5	6.0	9.8	16.0
Barley hay	6.0	7.4	9.5	13.0
Perennial ryegrass	5.6	6.9	8.9	12.2
Tall fescue	3.9	5.8	8.6	13.3
Beardless wildrye	2.7	4.4	6.9	11.0
Sweet clover	1.5	3.2	5.9	10.3
Orchardgrass	1.5	3.1	5.5	9.6
Vetch	3.0	3.9	5.3	7.6
Alfalfa	2.0	3.4	5.4	8.8
Corn fodder	1.8	3.2	5.2	8.6
Lovegrass	2.0	3.2	5.0	8.0
Meadow foxtail	1.5	2.5	4.1	6.7
Clover—alsike, red, ladino, strawberry	1.5	2.3	3.6	5.7

Figura 5. Tolerancia a sales solubles de diversos cultivos forrajeros.

Como se observa, la alfalfa, una leguminosa forrajera por excelencia en nuestro país, es sensible a la presencia de sales y tiene reducciones significativas del rendimiento (50%) a 8,8 ds/m. En rasgos generales, los forrajes disminuyen a un 50% su producción si la conductividad eléctrica es cercana a 15 ds/m.

La acción de la sal sobre las plantas se expresa mediante dos vías principales, la dificultad para la toma de agua por parte de las raíces y la toxicidad debido a concentraciones elevadas de sal (Munns, 2002; Munns and Tester, 2008). De esta manera, la respuesta de la planta al estrés ocurre en dos fases diferentes a través del tiempo. La primera fase, fase osmótica, comienza inmediatamente cuando se eleva la concentración de sal en la zona cercana a las raíces, ocasionando que la tasa de crecimiento se reduzca significativamente. La segunda fase, ión-específica, comprende la respuesta de la planta debido a la acumulación de sal en las hojas a niveles tóxicos y por lo tanto mueren. Las hojas más viejas se ven afectadas en mayor medida que las jóvenes, debido a que las primeras tienen menor expansión y crecimiento y no pueden diluir la sal que llega a ellas (Sairam and Tyagi, 2004; Munns and Tester, 2008).

Es importante destacar que, si bien la salinidad y la sequía comparten algunas similitudes, el factor que genera los mayores daños en la planta, es la toxicidad por Na^+ y el desbalance iónico, más que el efecto de la sal en el estado hídrico (ϕ_w) de la planta. Esta diferenciación es importante en el momento de identificar especies tolerantes a sal (Munns *et al.*, 2002).

Un aspecto significativo a considerar en el estrés es el estado ontogénico de la planta en el cual se impone y la duración del mismo (Munns, 2002; Munns *et al.*, 2002; Flowers and Flowers, 2005; Verlues *et al.*, 2006; Munns and Tester, 2008). Munns (2002) y Munns and Tester (2008) reportan, a partir de diversos estudios, que la reducción inicial en la tasa de crecimiento de una planta expuesta a condiciones salinas en un tiempo relativamente corto (horas de aplicación de la sal) frecuentemente se asemejan a la reducción del potencial hídrico (ϕ_w), observado por la imposición de condiciones restrictivas de agua, más que un efecto iónico, característico de la sal y no nos permitiría discriminar genotipos tolerantes de los susceptibles (Munns, 2002; Munns and Tester, 2008). Sin embargo, respuestas que ocurren en periodos prolongados (días a semanas) son más específicas de salinidad.

El efecto de la sequía en las plantas

Los diversos estreses ambientales (sal, sequía, frío), comparten, una respuesta inicial, que es la disrupción que generan sobre el potencial hídrico de la planta (Verslues *et al.*, 2006). Esto ocurre ya sea en la reducción de la disponibilidad de agua durante la sequía, en la deshidratación celular causada por la formación extracelular de cristales de hielo durante el estrés por frío y en el contenido iónico y la extracción de agua, alterados durante el estrés salino (Verslues *et al.*, 2006; Munns and Tester, 2008). En el caso de la sequía, éste es el factor de mayor trascendencia.

Es necesario en primer término definir el concepto de sequía, la cual puede ser considerada como un período prolongado de escasa precipitación que limita la productividad de los cultivos (Biswas *et al.*, 2002; Verlues *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007). El componente de estrés que genera la sequía es la reducción en la disponibilidad de agua del suelo y puede ser cuantificada como la reducción en el potencial hídrico (ϕ_w) (Verlues *et al.*, 2006). En el caso que este potencial se reduzca, la planta tendrá mayor dificultad para absorber agua y las respuestas que se presenten para evitarla dependerán del tiempo de exposición a dicha situación.

Ante la reducción del ϕ_w , en una primera instancia, el cierre de estomas permite mantener el balance entre la toma y la pérdida de agua. Si el estrés se prolonga, la transpiración se minimiza debido al cierre estomático y el contenido de agua y el ϕ_w del suelo deben llegar a un equilibrio. De esta manera, los tejidos de la planta deben reducir su ϕ_w ajustando su contenido hídrico para evitar la deshidratación (Zhang *et al.*, 1999; Munns, 2002; Verlues *et al.*, 2006).

Aquí es imprescindible recordar la siguiente ecuación:

$$\text{Potencial hídrico } (\varphi_w) = \text{Potencial osmótico } (\varphi_s) + \text{Potencial /presión de turgencia } (\varphi_p)$$

Condiciones de bajos φ_w incrementan la dificultad de la planta para evitar la deshidratación y los mecanismos para tolerar reducidos contenidos de agua toman relevancia. La acumulación de solutos compatibles juega un rol importante para evitar la pérdida de agua, y esta acumulación adicional en la célula como respuesta a bajos φ_w es lo que se denomina ajuste osmótico (Munns, 2002; Verlues *et al.*, 2006; Munns and Tester, 2008). En la bibliografía se cita la transcendencia de este concepto en la tolerancia al estrés hídrico a campo.

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos a lo largo de la evolución para tolerar períodos de sequía, entre los que se pueden mencionar la reducción en la pérdida de agua lograda con el ajuste estomático, el incremento de la captura de agua a través de la modificación en la longitud y profundidad de las raíces, y la acumulación de osmolitos (Rampino *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007). Estudios fisiológicos demostraron que osmolitos tales como azúcares (sucrosa, sorbitol y manitol), aminoácidos (prolina) y aminos (glicinbetaína y poliamidas) se acumulan bajo déficit de agua en diferentes especies de plantas (Rampino *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007). Estos componentes juegan un rol importante en prevenir la desintegración de la membrana y la inactivación enzimática en estas condiciones (Rampino *et al.*, 2006).

En la evaluación del comportamiento de un nuevo germoplasma obtenido, (híbridos, mutantes y plantas transgénicas) frente a estrés por sequía, existen diversas sustancias que permiten reducir el potencial hídrico al medio de crecimiento en el que se encuentra la planta (Verlues *et al.*, 2006). La ventaja principal, es que se puede controlar el φ_w de manera precisa y reproducible, realizando un gran número de tratamientos en poco espacio y tiempo (Verlues *et*

al., 2006), hecho más importante aún cuando se trabaja en condiciones *in vitro* (Almansouri *et al.*, 2001; Gopal and Iwama, 2007). Entre estos agentes simuladores de estrés hídrico se encuentran el sorbitol, el polietilenglicol (PEG) y el manitol (Almansouri *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2002; Mollassiotis *et al.*, 2006; Verlues *et al.*, 2006). Estas sustancias han sido ampliamente utilizadas en estudios de mecanismos de tolerancia (Munns, 2002; Teixeira *et al.*, 2006; Verlues *et al.*, 2006; Sajid Aqeel Ahmad *et al.*, 2007), en la discriminación de genotipos (Almansouri *et al.*, 2001), en la selección *in vitro* de explantos (Gopal and Iwama, 2007) y para obtener líneas celulares o cultivares tolerantes a sequía (Biswas *et al.*, 2002; Bajji *et al.*, 2004).

Mutagénesis inducida y selección in vitro

A fin de desarrollar tolerancia a estreses abióticos se requiere, en primera instancia, generar variabilidad genética (natural o inducida) y a partir de ello, hacer uso de técnicas eficientes que permitan identificar individuos tolerantes (Munns and James, 2003). En el caso de mutaciones inducidas con agentes mutagénicos, por su carácter de azarosas, se requiere de técnicas precisas que, a través de caracteres morfológicos, fisiológicos, y/o moleculares, permitan rescatar y caracterizar tanto los nuevos genotipos como sus progenies, y evaluar la estabilidad del carácter mejorado (Munns *et al.*, 2002).

Las estrategias para evaluar los genotipos son diversas. En la mayoría de los trabajos, los métodos de selección se llevan a cabo a campo, en hidroponia o mediante selección *in vitro* y se basan en parámetros relacionados al rendimiento en condiciones control versus el estrés en estudio (Munns *et al.*, 2002; Verlues *et al.*, 2006).

Se han identificado mutantes inducidos química o físicamente, mediante la caracterización morfológica a campo de sus progenies en diversos cultivos (Hohmann *et al.*, 2005). Sin embargo, estas evaluaciones son ineficientes y dificultosas, por un lado, debido a la heterogénea distribución de las sales en el suelo y la dificultad de medir potenciales hídricos a campo, entre otras, y por el otro, debido al tiempo, personal y espacio que demandan este tipo de ensayos (Munns *et al.*, 2002; Verlues *et al.*, 2006).

También se pueden evaluar genotipos en condiciones de hidroponia, a través de parámetros fisiológicos (Luna *et al.*, 2000; de Luca *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2002) que han sido citados como indicadores de tolerancia a salinidad y han permitido la discriminación de cultivares tolerantes (Luna *et al.*, 2002). El uso de estos marcadores, basados en mecanismos que confieren tolerancia, puede ser un instrumento valioso a la hora de rescatar individuos promisorios frente a estreses

abióticos (Ashraf, 2004; Ashraf and Harris, 2004; Ashraf and Foolad, 2007; Ashraf, 2009). Caracteres tales como inclusión de Na⁺ y acumulación de prolina han sido utilizados para discriminar germoplasma (Munns *et al.*, 2002; Munns and James, 2003; Verlues *et al.*, 2006). No obstante, uno de los aspectos a determinar es cuál o cuáles son los parámetros que se consideran indicadores de selección (Ashraf, 2004). Se suma a esto, la dificultad de mantener ensayos de crecimiento por períodos prolongados, y de convalidar metodologías fáciles y relativamente rápidas de implementar dentro de un programa de mejoramiento genético (Luna *et al.*, 2000; Munns and James, 2003).

La complejidad de estos análisis y la dificultad de probar grandes poblaciones (Luna *et al.*, 2000) han alentado la utilización de otro tipo de metodologías. Asimismo, se cita la demanda creciente de una herramienta útil para el reconocimiento de genotipos con características diferenciales (Munns *et al.*, 2002; Munns and James, 2003; Verlues *et al.*, 2006).

Es así que aparece en escena otra estrategia, como la selección *in vitro* (Maralappanavar *et al.*, 2000; Predieri and Zimmerman, 2001; Kim *et al.*, 2003; Atak *et al.*, 2004; Flowers, 2004). Numerosos estudios han sido realizados en tejidos meristemáticos y poco diferenciados como protoplastos, callos, etc., (Carretero *et al.*, 2007). Se cita en la bibliografía que las técnicas de cultivo *in vitro* han sido exitosas en la obtención de líneas celulares y cultivos con tolerancia a estreses abióticos (Gangopadhyay *et al.*, 1997; Ochatt *et al.*, 1999; Mohamed *et al.*, 2000; Zair *et al.*, 2003; Bajji *et al.*, 2004; Lutts *et al.*, 2004; Roy and Mandal, 2005; Gandonou *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2007).

Mediante esta metodología se han identificado variantes con tolerancia a pH extremos, aluminio, a salinidad y sequía, a diversas enfermedades, a herbicidas, etc. (Gangopadhyay *et al.*, 1997; Samantaray *et al.*, 1999; Naga Amrutha *et al.*, 2007). Además, se han individualizado líneas de *Brassica napus* con tolerancia a *Sclerotinia sclerotiorum* (Liu *et al.*, 2005), en papa se han obtenido plantas

tolerantes a sal a partir de explantos irradiados y seleccionados *in vitro* (Luan *et al.*, 2007). En forrajeras, como es el caso de Bermudagrass, se generaron plantas con tolerancia a salinidad y sequía a partir de callos embriogénicos subcultivados en presencia de agentes de selección (Lu *et al.*, 2007c).

Los cultivos rescatados después de la fase *in vitro*, pasan a una etapa posterior de multiplicación y evaluación. De esta manera, se confirma la característica diferencial del individuo seleccionado.

Esta técnica ofrece la ventaja de ser un sistema rápido y eficiente para el *screening* de numerosos individuos en poco espacio y en un tiempo relativamente reducido (Ahloowalia and Maluszynski, 2001; Dziadczyk, *et al.*, 2003, Bajji *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007a,c; Luan *et al.*, 2007), ya que admite incorporar al medio de cultivo agentes de selección para diferentes estreses (Mohan Jain, 2001; Pathirana *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2007). En diversos trabajos, soluciones osmóticas de NaCl, sorbitol, manitol y PEG han sido incorporados al medio basal como agentes de selección para seleccionar genotipos tolerantes en diversos cultivos agronómicos (Tewary *et al.*, 2000; Dziadczyk *et al.*, 2003; Carretero *et al.*, 2007; Gopal *et al.*, 2008).

A pesar de la efectividad de las técnicas de selección *in vitro* en la identificación de genotipos tolerantes (Maralappanavar *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2004; Mohamed and Tawfik, 2006; Texeira *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007c), la reducción en las tasas de regeneración de plantas *in vitro* a partir de células o callos estresados puede ser una dificultad para la aplicación de esta metodología (Carretero *et al.*, 2007; Luan *et al.*, 2007).

Otra alternativa disponible es la utilización de explantos diferenciados como vástagos clonales o semillas (Tewary *et al.*, 2000; Dhawan *et al.*, 2003; Dziadczyk *et al.*, 2003; Carretero *et al.*, 2007; Gopal *et al.*, 2008). En frutilla, semillas y plántulas fueron seleccionadas *in vitro*, a través de la exposición a 200 mM de NaCl. En el segundo ciclo de selección, los clones tolerantes fueron evaluados con otros

materiales comerciales (Dziadczyk *et al.*, 2003). Asimismo, Gopal and Iwama (2007) han realizado *screening in vitro* de vástagos de papa, para encontrar genotipos tolerantes a sequía incorporando en el medio de propagación sorbitol y PEG.

Desde sus comienzos, uno de los primordiales objetivos del mejoramiento vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir del reconocimiento de fenotipos superiores.

Diversas metodologías están disponibles para detectar variación genética entre las que se incluyen la identificación fenotípica y técnicas de análisis de ADN. Caracteres morfológicos y fisiológicos pueden ser usados para el reconocimiento de materiales superiores (Palombi *et al.*, 2007). Sin embargo, este tipo de metodología consume tiempo y es laborioso (Lu *et al.*, 2007a), requiriendo de ensayos en diferentes localidades y campañas agrícolas para garantizar la correcta discriminación de individuos.

En la actualidad, la identificación y el análisis de nuevos genotipos pueden llevarse a cabo mediante la información genética que ellos portan, principalmente a través del uso de marcadores moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; del inglés *Polymerase Chain Reaction*) tales como ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD; del inglés *Randomly Amplified Polymorphic*) (Williams *et al.*, 1990), Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP; del inglés *Amplification Fragment Length Polymorphism*) (Vos *et al.*, 1995) y microsatélites (SSR; del inglés *Simple Sequence Repeat*) (Spangenberg, 2004; Lu *et al.*, 2007a).

La técnica RAPD consiste en el empleo de cebadores decaméricos arbitrarios, permitiendo la amplificación de secuencias de ADN a lo largo de todo el genoma. Esta metodología puede detectar, a través de un procedimiento relativamente sencillo, polimorfismos genéticos (Degani *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2007a).

La eficiencia de los RAPDs como herramienta en la diferenciación de genotipos ha sido establecida ampliamente (Martin *et al.*, 2006). Estos marcadores han

permitido la discriminación de cultivares en diversas especies tales como cereales, gramíneas y leguminosas forrajeras (Johnson *et al.*, 2002; Sharma and Jana, 2002; Salem *et al.*, 2007) y han sido empleados con éxito en la detección de variantes somaclonales obtenidas por cultivo *in vitro*, y mutantes obtenidos mediante la aplicación de mutágenos químicos y físicos (Raimondi *et al.*, 2001; Gesteira *et al.*, 2002; Polanco and Ruiz, 2002; Nayak *et al.*, 2003; Atak *et al.*, 2004; Bennici *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2004; Gagliardi *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007a; Prado *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2008). Se menciona en la bibliografía que esta técnica se ha usado para la localización e identificación de genes de tolerancia y/o resistencia para diversos estreses bióticos y abióticos (Degani *et al.*, 2001; Salem *et al.*, 2007). Si bien presenta algunas limitaciones relacionadas a la baja reproducibilidad, estas dificultades pueden ser minimizadas al ajustar cuidadosamente las condiciones de reacción y amplificación de manera de obtener patrones de amplificación reproducibles (Carvalho *et al.*, 2004). Si estas condiciones son controladas, los RAPDs son los sistemas más habituales en las comparaciones intra-especie (Carvalho *et al.*, 2004). En la actualidad, este marcador es uno de los más empleados por su facilidad, bajo costo y menor tiempo de ejecución (Carvalho *et al.*, 2004). Se suma a esto, que ha demostrado un nivel de polimorfismo útil en la discriminación de genotipos y cultivares del género *Cenchrus* (Chandra and Dubey, 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a lo expuesto se proponen la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPÓTESIS

Es posible obtener variabilidad genética mediante inducción de mutaciones en caracteres asociados con la tolerancia a estreses abióticos en *Cenchrus ciliaris* L.

OBJETIVOS

➤ OBJETIVO GENERAL

Generar variabilidad genética para caracteres asociados con la tolerancia a estreses abióticos a través de mutaciones inducidas en *Cenchrus ciliaris* L.

➤ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Inducir variabilidad genética a partir del clon apomíctico Biloela (*Cenchrus ciliaris* L.) mediante agentes mutagénicos químicos (EMS) y físicos (rayos X)
- II. Seleccionar *in vitro* aquellos posibles mutantes en caracteres asociados con la tolerancia a estrés abiótico
- III. Detectar la variación genética inducida mediante técnicas moleculares tales como RAPD

MATERIALES Y MÉTODOS

Biloela, es uno de los 14 cultivares presentes en la colección activa de *Cenchrus ciliaris* L. (Buffel grass), establecido a campo en el IFFIVE-INTA, Córdoba, Argentina.

Las plantas están implantadas en un suelo franco-limoso, con un distanciamiento de 1 metro entre hileras y entre plantas. Se cuenta en la actualidad con aproximadamente 30 plantas de este genotipo, colocadas en dos hileras consecutivas.

Las plantas se fertilizaron con N:P:K (15:15:15) en la etapa previa a floración, y la parcela se mantuvo limpia con desmalezado manual. En caso de ser necesario, se realizaron riegos mediante surcos.

Buffel grass cuenta con cultivares apomícticos obligados (Ozias-Akins, 2006; Miles, 2007) y en vista de que las semillas que derivan de la reproducción apomíctica portan embriones genéticamente idénticos al progenitor femenino (Bashaw and Hanna, 1990; Ozias-Akins, 2006), las semillas del cv. Biloela se recolectaron en una única bolsa, para llevar a cabo cada uno de los ensayos planteados en este trabajo.

Acondicionamiento y desinfección de semillas

Las semillas maduras fueron recolectadas manualmente, en épocas de plena fructificación (en los meses de enero y febrero), colocadas en bolsas de papel etiquetadas, y conservadas en heladera (4°C). Las mismas fueron desprovistas de sus envolturas (involucros) manualmente, y para su desinfección se colocaron en

lavandina comercial (NaClO 55 g/L) al 30% en agitación constante durante 20 minutos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril.

Para el ensayo de irradiación con rayos X, las semillas cosechadas y desprovistas de sus involucros, fueron enviadas al Instituto de Genética Edward A. Favret, dependiente del INTA Castelar (Buenos Aires, Argentina). Una vez tratadas fueron reenviadas al IFFIVE para su evaluación.

Inducción de mutaciones mediante agentes mutagénicos

Uno de los puntos críticos en la inducción de mutaciones es la dosis a utilizar del agente mutagénico, ya que es importante conocer la sensibilidad del explanto (semillas, callos, flores, etc) al ser expuesto al mismo (Predieri and Zimmerman, 2001; Joseph *et al.*, 2004; Rocha Latado *et al.*, 2004; Hohmann *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2007).

Por tal motivo el primer paso antes de utilizarlos, fue establecer la dosis de semiletalidad, que es aquella dosis a la cual la supervivencia del explanto utilizado disminuye un 50% respecto al control sin tratar (Rocha Latado *et al.*, 2004; Witjaksono and Litz, 2004; Luan *et al.*, 2007).

El explanto a utilizar fueron semillas maduras del cv. apomítico Biloela, desprovistas de sus involucros, y sobre ellas se aplicaron los agentes mutagénicos etilmetanosulfonato (EMS) y rayos X. Se evaluó el porcentaje de germinación respecto al control sin tratar (0 Kr y 0 mM de EMS) como variable para medir la eficiencia del agente mutagénico.

☞ Agente mutagénico químico etilmetanosulfonato

a. Determinación de la dosis letal 50 (DL50)

Con la finalidad de establecer la dosis de semiletalidad, las semillas desinfectadas del cv. Biloela fueron incubadas en tubos plásticos estériles tipo Falcon (45 mL) conteniendo una solución acuosa con diferentes concentraciones de etilmetanosulfonato (EMS) (Sigma-Aldrich), bajo condiciones de asepsia, en cámara de flujo laminar. Cada concentración de EMS se preparó en 50 mL de agua bidestilada autoclavada a 1 atm de presión y 121°C durante 20 minutos.

Las semillas se expusieron a concentraciones de 0, 5, 6, 7, 10, 20, 30, 45, 60, 75 mM de EMS durante 23 y 48 horas, en agitación continua (100 rpm), a 26°C ± 2°C y en oscuridad, con la finalidad de garantizar un contacto homogéneo y permanente con el agente mutagénico (Rocha Latado *et al.*, 2004; Vagera *et al.*, 2004; Hohmann *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2007). Al concluir las horas de incubación, las semillas se enjuagaron repetidas veces con agua destilada autoclavada. Posterior al tratamiento con EMS, las semillas fueron colocadas bajo cámara de flujo laminar, en tubos de vidrio (15 mL) conteniendo 4 mL de medio basal de cultivo Murashige and Skoog (MS) (1962) (una semilla por cada tubo), con 7 g/L de agar y 3% de sacarosa (p/v).

El pH del medio basal MS fue ajustado a 5,8 con Na(OH) 0,5 N y el medio fue autoclavado a 121°C y 1 atm de presión por 20 minutos.

Los tubos fueron cultivados a 26°C ± 2°C, a un fotoperíodo de 16 horas de luz (7-11 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con 8 horas de oscuridad. El recuento de semillas germinadas se realizó a los siete días del cultivo y se registró la presencia de plántulas normales.

Análisis estadístico

El diseño experimental para la determinación de la dosis de semiletalidad, se realizó bajo un ensayo completamente aleatorizado con repeticiones de 10 tubos cada una, para cada concentración testada en los dos tiempos de incubación (23 y 48 horas). Para el análisis de los datos correspondientes a la variable porcentaje de germinación (%) y con la finalidad de discernir diferencias entre los tratamientos explicados anteriormente, se llevó a cabo el análisis de la varianza (ANAVA) y el test de comparación de medias DGC (Di Rienzo *et al.*, 2001) a un nivel de significancia estadística del 5% ($P < 0,05$). El modelo lineal para la observación j -ésima del i -ésimo tratamiento es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

De este modo,

Y_{ij} es la observación j -ésima del i -ésimo tratamiento

μ es la media global

T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento

ϵ_{ij} es el error experimental de la j -ésima observación en i -ésimo tratamiento, tal que $\epsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ independientes entre sí, $E[\epsilon_{ij}] = 0$ y $\text{Var}[\epsilon_{ij}] = \sigma^2$

Para la variable porcentaje de germinación cuyos datos no fueran normales en su distribución, se realizó la transformación siguiente:

$\arcsen \sqrt{P/100}$ siendo P : porcentaje de germinación (%)

b. Ensayos masivos

Luego de establecida la dosis letal 50 (DL50) se realizaron ensayos masivos, para lo cual aproximadamente 500 semillas del cv. Biloela fueron expuestas a la dosis DL50 del agente EMS determinada anteriormente, bajo las condiciones descriptas.

☞ Agente mutagénico físico rayos X

a. Determinación de la dosis letal 50 (DL50)

La aplicación de las radiaciones ionizantes (rayos X) se realizó en el Instituto de genética E. A. Favret (INTA-Castelar) (Buenos Aires, Argentina). Semillas cosechadas y desprovistas de sus involucros del cv. Biloela fueron expuestas a dosis de 0, 10, 20, 30 y 40 Kr. Estas dosis corresponden aproximadamente a unos 0, 100, 200, 300 y 400 Gray (Gy). Asimismo, se irradiaron con 0, 1, 2, 4 y 8 kr, semillas previamente humedecidas en agua destilada estéril durante 20 horas, las que fueron secadas para su posterior evaluación.

En el IFFIVE-INTA, las semillas irradiadas se desinfectaron con lavandina comercial (NaClO 55 g/L) al 30% durante 20 minutos en agitación, luego fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril.

Posterior a la desinfección, las semillas fueron germinadas *in vitro* en tubos de vidrio conteniendo 4 mL de medio basal de cultivo MS, con 7 g/L de agar y 3% de sacarosa (p/v). El pH del medio MS fue ajustado a 5,8 con Na(OH) 0,5 N previo a ser autoclavado a 121°C y 1 atm de presión por 20 minutos.

Los tubos fueron cultivados a 26°C ± 2°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz (7-11 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad, evaluándose a los siete días del cultivo, el porcentaje de germinación y la presencia de plántulas normales.

Análisis estadístico

El diseño experimental para la determinación de la dosis de semiletalidad, se realizó bajo un ensayo completamente aleatorizado con repeticiones de 10 tubos cada una, para cada concentración testeada (ya sea las concentraciones correspondientes a semillas secas y/o humedecidas previamente).

Para el análisis de los datos correspondientes a la variable porcentaje de germinación (%) y con la finalidad de discernir diferencias entre los tratamientos explicados anteriormente, se llevó a cabo el análisis de la varianza (ANAVA) y el test de contraste de medias DGC (Di Rienzo *et al.*, 2001) a un nivel de significancia estadística del 5% ($P < 0,05$).

El modelo lineal para la observación *j*-ésima del *i*-ésimo tratamiento es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

De este modo,

Y_{ij} es la observación *j*-ésima del *i*-ésimo tratamiento
 μ es la media global
 T_i es el efecto del *i*-ésimo tratamiento
 ε_{ij} es el error experimental de la *j*-ésima observación en *i*-ésimo tratamiento, tal que $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ independientes entre sí, $E[\varepsilon_{ij}] = 0$ y $\text{Var}[\varepsilon_{ij}] = \sigma^2$

Con respecto a la variable porcentaje de germinación, cuyos datos no fueran normales en su distribución, se realizó la transformación siguiente:

$\arcsen \sqrt{P/100}$

Siendo P: el porcentaje de germinación (%)

b. Ensayos masivos

Luego de determinar las condiciones de irradiación y establecida la dosis de trabajo (DL50) se realizaron ensayos masivos, los cuales consistieron en exponer a semillas del cv. Biloela (aproximadamente unas 500 semillas) a la dosis DL50 del agente rayos X determinada anteriormente, bajo las condiciones descriptas.

Selección in vitro de mutantes con tolerancia a estrés abiótico

Los estreses que se consideraron fueron: salinidad y sequía. Los agentes de selección utilizados para simular dichos estreses fueron NaCl y manitol, respectivamente.

Para realizar la selección *in vitro*, aquellas plántulas correspondientes a los ensayos masivos anteriormente descritos, derivadas de semillas expuestas a EMS o a rayos X, que germinaron y formaron una plántula viable a los siete días posteriores a la exposición, fueron repicadas a nuevos tubos de vidrio conteniendo medio basal MS con 7 g/L de agar y 3% de sacarosa (p/v) adicionado con el agente de selección. El pH del medio MS de selección fue ajustado a 5,8 con Na(OH) 0,5 N y el medio fue autoclavado a 121°C y 1 atm de presión por 20 minutos. Las condiciones de cultivo fueron 26°C ± 2°C, a un fotoperíodo de 16 horas de luz (7-11 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con 8 horas de oscuridad.

Salinidad (NaCl)

El cloruro de sodio (NaCl) es la sal soluble presente con mayor frecuencia en el perfil del suelo (Munns and Tester, 2008). Debido a esto, se lo utilizó como agente simulador de estrés salino (Verlues *et al.*, 2006).

En la bibliografía se cita la importancia de evitar la plasmólisis como consecuencia de someter a la planta a altas dosis de NaCl y provocar así, un “*shock osmótico*” en la misma (Luna *et al.*, 2000; Munns, 2002; Verlues *et al.*, 2006; Munns and Tester, 2008). Esto puede ser evitado al adicionar la sal gradualmente, a intervalos que le permitan a la planta ajustarse a esta nueva condición. De esta manera es posible recuperar a los individuos que soportaron condiciones extremas de estrés (Luna *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, las plántulas germinadas (7 días) se trasladaron a un nuevo tubo conteniendo medio MS adicionado con el agente de selección (en este caso NaCl) (Sigma-Aldrich), para ser expuestas a selección *in vitro*. Las plántulas fueron repicadas secuencialmente cada 20 días, partiendo de una concentración inicial de 50 mM de NaCl e incrementando la concentración 50 mM en cada repique hasta alcanzar una dosis final de 200 mM. Luego de permanecer 20 días en dicha condición, tanto para el tratamiento con EMS o con rayos X, las plantas fueron repicadas a concentraciones menores hasta mantenerse en medio MS a los fines de que adquirieran un tamaño suficiente como para ser trasplantadas de la condición *in vitro* hasta la tierra.

☞ Sequía (manitol)

En diversos estudios donde se observan las repuestas frente al estrés por sequía, se utilizan osmolitos para reducir el potencial ϕ_w en el medio de crecimiento y de esta manera simular este tipo de estrés. Dentro de los osmolitos que pueden usarse se cita al manitol.

Luego de la exposición a cualquiera de los dos agentes mutagénicos (EMS o rayos X), las plántulas que germinaron en los tubos conteniendo medio MS, se repicaron a un nuevo tubo conteniendo medio basal MS, adicionado con el agente de selección manitol (Sigma-Aldrich).

Para el caso de la selección *in vitro* para caracteres asociados con tolerancia a sequía se partió de una concentración inicial de 25 mM de manitol, siendo las plántulas repicadas secuencialmente cada 20 días, incrementándose la concentración de manitol 25 mM en cada repique hasta alcanzar una dosis de 100 mM. Luego de permanecer durante 20 días en dicha concentración, tanto para el tratamiento con EMS o con rayos X, las plantas fueron repicadas a concentraciones

menores hasta mantenerse en medio MS a los fines de que las plantas alcanzaran un tamaño suficiente como para ser trasplantadas de la condición *in vitro* hasta la tierra.

DetECCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDUCIDA MEDIANTE RAPD

Las plantas resultantes de los tratamientos mutagénicos y del proceso de selección con NaCl y manitol fueron trasplantadas a macetas pequeñas conteniendo como sustrato una mezcla de tierra estéril y vermiculita en proporción 2:1, manteniéndose en invernáculo en condiciones de elevada humedad para su rusticación.

Cada planta considerada como evento único, se colocó en una maceta y de cada una se realizaron muestreos para la extracción de ADN. Es importante recalcar que las plantas eran pequeñas y aún no se encontraban en etapa de macollaje cuando se tomaron las muestras de material vegetal.

Material Vegetal

Láminas de hojas frescas completamente expandidas fueron cortadas de cada una de las plantas, del tercio superior y medio del tallo. Las hojas fueron colocadas en bolsas plásticas transparentes y almacenadas en hielo hasta su utilización.

Extracción de ADN genómico total

Aproximadamente 100 mg de hojas frescas se molieron con aire líquido en morteros de porcelana y posteriormente se realizó la extracción del ADN siguiendo las instrucciones detalladas en el protocolo del Kit Phytopure (Amersham, Pharmacia). El ADN fue resuspendido en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 - 1 mM de EDTA pH 8,0).

Cuantificación del ADN

Para determinar la calidad y cantidad del ADN obtenido se realizó la cuantificación mediante espectrofotómetro (ND1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA). Además se efectuó la siembra del mismo en geles de agarosa al 0,8% (p/v) y se corrió en cuba de electroforesis a 50 Voltios durante dos horas en tampón TBE 0,5X. Posteriormente el gel se reveló con bromuro de etidio (10 mg/mL, GIBCO BRL).

Los morteros, pilones, placas de Petri, pinzas, espátulas y todo el material de vidrio utilizado fueron esterilizados en estufa a 180°C durante 4 horas.

🌀 Protocolo de la técnica RAPD

Para evitar contaminaciones en la técnica de RAPD, todos los componentes utilizados en las amplificaciones se tomaron desde tubos nuevos que se abrieron solamente bajo cámara de flujo laminar, de uso exclusivo para esta técnica y manipulados por un solo operario.

El agua utilizada fue tipo mili Q deionizada tratada con luz UV, sin autoclavar. El material de plástico (puntas y tubos de 1,7 mL) fue abierto, utilizado y guardado bajo cámara de flujo laminar. Para realizar la mezcla de reacción de la PCR se utilizaron pipetas automáticas bajo cámara de flujo laminar.

Cebadores

Se utilizaron 20 diferentes cebadores decaméricos arbitrarios de las series A y B de Promega (Biodynamics), en la búsqueda de polimorfismos para evaluar la existencia de modificaciones a nivel genético en las plantas bajo estudio.

Cada serie consiste en 10 cebadores que contienen 10 pares de bases cada uno, con un contenido aproximado de G-C del 60% (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de cebadores de las series A y B de Promega.

SERIE A		SERIE B	
Cebadores	SECUENCIA (sentido 5'- 3')	Cebadores	SECUENCIA (sentido 5'- 3')
A1	CCCAAGGGAA	B1	TCGAAGTCCT
A2	GGTGCGGGAA	B2	GCATGTCAGA
A3	AAGACCCCTC	B3	ACTTCGACAA
A4	CTTCACCCGA	B4	TGCCATCAGT
A5	CACCAGGTGA	B5	GCGCTCACGC
A6	GAGTCTCAGG	B6	GTGACATCGC
A7	CCCGATTCGG	B7	AGATCGAGCC
A8	ACGCACAACC	B8	TCACCACGGT
A9	CTAATGCCGT	B9	ATGGCTCAGC
A10	ACGGCGTATG	B10	CAGGCACTAG

Amplificación RAPD-PCR

Las mezclas de reacción se realizaron según el protocolo propuesto por Gustine *et al.*, (1996), puestas a punto con algunas modificaciones para Buffel grass (Griffa, com. pers.) donde los reactivos y sus concentraciones se detallan a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Protocolo de Gustine *et al.* (1996) modificado: reactivos y concentraciones.

Reactivos de PCR	Volumen utilizado por tubo (μL)
agua tipo mili Q deionizada	19,8 μL
tampón 10x	3 μL
cebadores 10x	3 μL
dNTPs 10x	3 μL
taq polimerasa (Amershan Ph.)	0,2 μL (1 unidad)
ADN	1 μL (25 ng/ μL)
volumen final	30 μL

Las condiciones del ciclado se ejecutaron de acuerdo al protocolo de Promega para dichos cebadores (Tabla 3), ya que permitió un patrón de amplificación de mayor cantidad de bandas y muy buena resolución e intensidad de las mismas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf AG 22331, Eppendorf, Germany), de acuerdo a las condiciones antes mencionadas (Tabla 3).

Tabla 3. Programa de amplificación RAPD-PCR propuesto por Promega.

Número de ciclos	Condiciones	
	T ^o (°C)	tiempo
1	94	3 min
	94	1 min
40	36	1 min
	Incremento térmico 0,6 °C/ s	
	72	2 min
	72	5 min

Se realizaron tres repeticiones de cada PCR para cada uno de los 54 genotipos y el genotipo control (cv. Biloela), para los 20 cebadores que componen las series de Promega.

Un control negativo (sin ADN) se empleó en la mezcla de reacción, el cual fue incluido en cada ensayo con la finalidad de descartar alguna contaminación en los reactivos.

Se sembraron 15 µL de cada producto de amplificación en geles de agarosa al 2% (p/v) sobre TBE 1X, respetando siempre el mismo orden y se corrieron en cuba de electroforesis con TBE 0,5X a 50 Voltios durante dos horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL, GIBCO BRL) y la presencia o ausencia de bandas se observó bajo luz ultravioleta, en analizador de imágenes.

Las diferencias en el patrón de bandas generado entre cada genotipo y el control cv. Biloela fueron determinadas por comparación en el gel para cada uno de los 20 cebadores, utilizando el marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Promega) como marcador de referencia.

Análisis estadístico

Los productos de amplificación (bandas) generados con los diferentes cebadores para cada uno de los genotipos bajo estudio, que presentaron patrones reproducibles, se usaron para construir una matriz binaria, tomando como 1 a cada banda presente y 0 si la banda estuvo ausente, considerando bandas iguales a las que presentan la misma movilidad en el gel (igual peso molecular).

RESULTADOS

Inducción de variabilidad genética mediante agentes mutagénicos

➤ Agente mutagénico etilmetanosulfonato

a. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)

El ensayo para la determinación de la DL50 consistió en exponer semillas del cv. Biloela a concentraciones de EMS comprendidas entre 0 mM y 75 mM durante 23 y 48 horas de incubación. En el rango de concentraciones de EMS entre valores superiores a 10 mM hasta 75 mM, no se observó formación de plántulas a las dosis y los tiempos de incubación probados, a los 7 días de ser sembrados en medio basal MS.

En relación a la dosis comprendidas entre 0 a 10 mM de EMS (0, 5, 6, 7 y 10 mM) para el tiempo de exposición a 48 horas, a los 7 días posteriores a la siembra de las semillas en medio basal, las semillas no germinaron (datos no mostrados). De esta manera, sólo se consideraron para posteriores análisis, los datos obtenidos de los tratamientos de 0 a 10 mM de EMS y exposición durante 23 horas. Con respecto a este tiempo de incubación, luego de 7 días de cultivo, las semillas germinaron en todas las concentraciones de EMS, reduciéndose el porcentaje de germinación a medida que aumentó la dosis (Figura 6).

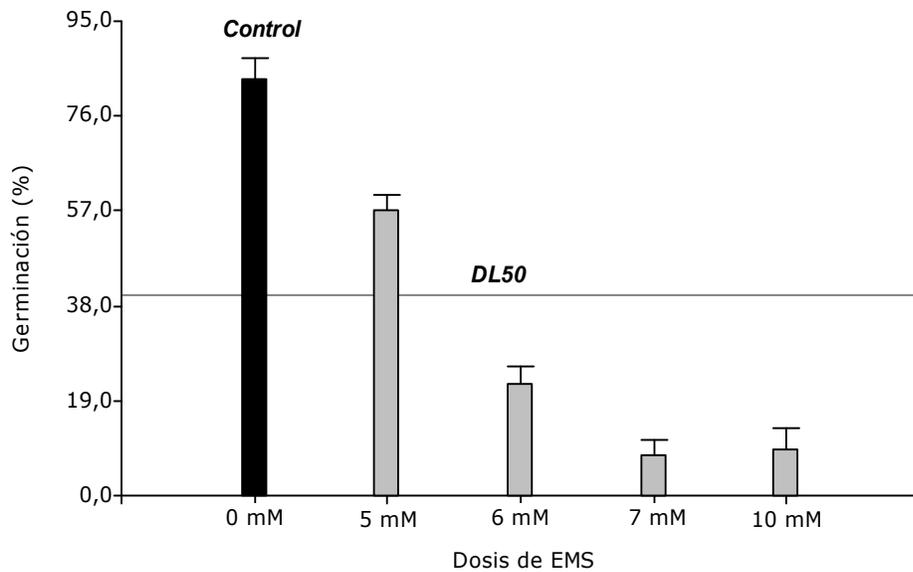


Figura 6. Germinación (%) de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratadas con 0, 5, 6, 7 y 10 mM de EMS durante 23 horas de exposición. Recuento a los 7 días. Promedio \pm error estándar.

Como se puede apreciar en la Figura 6, el porcentaje de semillas germinadas del tratamiento control (0 mM) fue del 79,7%. Este porcentaje se consideró como el total para establecer *a posteriori* la DL50. A la mayor concentración de EMS planteada (10 mM), el porcentaje de germinación fue del 9,3%.

A la dosis de 7 mM, el porcentaje de germinación fue del 8,0%, observándose plantas con escaso crecimiento de parte aérea, hojas pequeñas, entrenudos cortos y poco número de raíces. En observaciones posteriores a los 7 días de recuento, estas plantas no incrementaron su altura, ni desarrollaron su sistema radicular y aéreo.

A una concentración de 5 mM se observó un porcentaje de germinación del 57,0%, mientras que a 6 mM, el mismo se redujo a 22,3%.

Con la finalidad de hallar si las diferencias entre las concentraciones de EMS ensayadas eran significativas se llevó a cabo el test de contraste de medias DGC (Infostat, 2006). La variable porcentaje de germinación presentó una distribución normal, de manera que no fue necesaria realizar la transformación de los datos correspondientes a dicho parámetro.

El análisis de varianza (ANAVA) permitió discernir diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las dosis de EMS planteadas y el control sin tratar (0 mM), para la variable porcentaje de germinación (Tabla 4).

Tabla 4. Cuadro de análisis de la varianza para la variable porcentaje de germinación de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv Biloela tratadas con distintas concentraciones de EMS.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Modelo	23473,03	4	5868,26	42,41	<0,0001
Dosis	23473,03	4	5868,26	42,41	<0,0001
Error	5672,63	41	138,36		
Total	29145,65	45			

Los tratamientos difirieron entre sí, observándose una reducción del porcentaje de germinación a medida que la dosis del agente mutagénico se incrementaba (Tabla 5).

Como se observa en los datos (Tabla 5), no existió una diferencia significativa entre el porcentaje de germinación obtenido con concentraciones de 7 y 10 mM de EMS, pero sí entre 5 mM y 6 mM. Considerando que el control (0 mM) presentó un 79,7%, la DL50 correspondería a un porcentaje de germinación de aproximadamente 40,0%.

Tabla 5. Porcentaje de germinación en medio MS de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratadas con EMS.

Dosis de EMS	Porcentaje de Germinación (%)
0 mM	79,73 ^c
5 mM	57,00 ^b
6 mM	28,89 ^a
7 mM	20,00 ^a
10 mM	21,67 ^a

Medias con distintas letras difieren significativamente ($P \leq 0,05$)

Es así que una concentración intermedia entre 5 y 6 mM se ajustaría a la dosis letal 50. En consecuencia se decidió trabajar con 5,5 mM de EMS durante 23 horas de exposición como DL50.

En el ensayo de determinación de la DL50, no se registró presencia de plántulas cloróticas y/o albinas, se observaron algunas plantas de reducido tamaño (Figura 7) a pesar de permanecer en medio MS posterior a los 7 días de recuento. Como se observa en la Figura 8 algunas semillas no formaron parte aérea y sólo desarrollaron raíces, otras semillas germinaron presentando hojas no expandidas y poco desarrolladas y algunas plántulas crecieron normalmente.



Figura 7. Planta obtenida de semilla de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS expuesta durante 23 horas, cultivada 30 días en medio MS.



Figura 8. Plantas obtenidas de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratadas con 5,5 mM de EMS expuestas durante 23 horas, cultivadas durante 15 días en medio basal MS.

b. Ensayos masivos

Se colocaron aproximadamente 500 semillas a incubar en una solución de EMS (5,5 mM) durante 23 horas, y posteriormente fueron germinadas *in vitro* bajo las condiciones descritas anteriormente. A los 7 días de cultivo, unas 250 plántulas se repicaron a medio de selección (125 plántulas a medio con NaCl y 125 a medio con manitol) para el proceso de selección *in vitro*.

☞ Inducción de variabilidad mediante rayos X

a. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)

Las semillas irradiadas en el Instituto de Genética E. A. Favret (INTA-Castelar) con dosis comprendidas entre 0 y 40 Kr fueron desinfectadas y germinadas en medio basal MS. El mismo procedimiento se llevó a cabo con las semillas del cv. Biloela, humedecidas durante 20 horas con anterioridad a la irradiación con 0, 1, 2, 4 y 8 Kr. Con respecto a este último tratamiento, las semillas no germinaron en ninguna de las dosis ensayadas.

Para las semillas tratadas con dosis comprendidas entre 0 y 40 Kr (sin previo humedecimiento a la irradiación), a los 7 días se observó formación de plántulas en todas las dosis ensayadas (Figura 9).

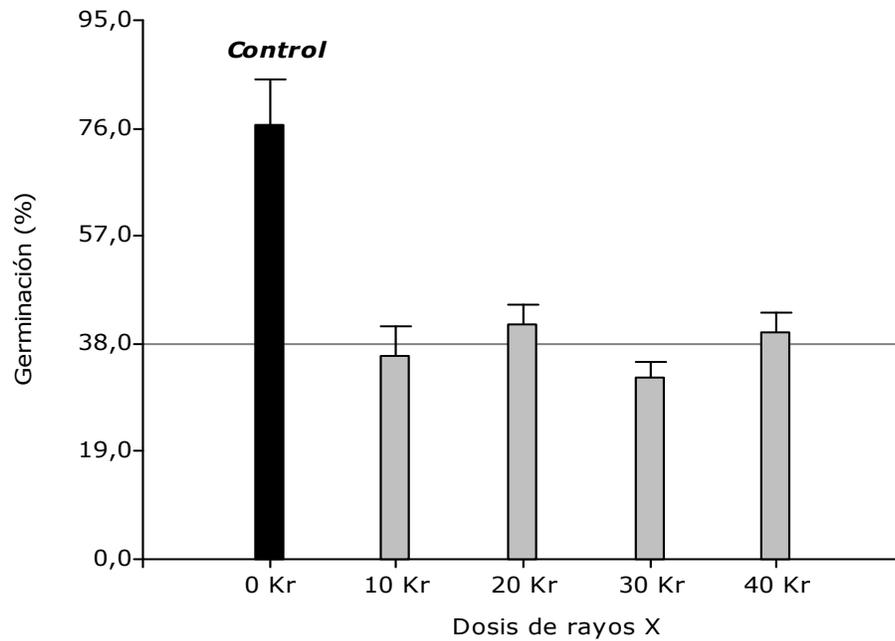


Figura 9. Germinación (%) de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela irradiadas con 10, 20, 30 y 40 Kr, cultivadas en medio MS. Recuento a los 7 días de cultivo. Control: 0 Kr. Promedio \pm error estándar.

El porcentaje de germinación del tratamiento control (0 Kr) fue del 76,7%. Si consideramos este porcentaje como el total para establecer *a posteriori* la DL50, las distintas dosis de Kriptón (10, 20, 30, 40 Kr) redujeron a casi el 50% los valores de germinación de las semillas tratadas respecto al control (Figura 9). Por ejemplo, a 40 Kr la formación de plántulas fue del 40,0%.

En la Figuras 10 y 11, se aprecian las plántulas germinadas en tratamiento control y luego de la irradiación con la mayor dosis de rayos X aplicada (40 Kr), respectivamente.



Figura 10. Plantas de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela correspondientes al tratamiento control (0 Kr) de una misma repetición, a los 20 días posteriores a ser germinadas *in vitro* en medio MS.



Figura 11. Plantas provenientes de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela irradiadas con 40 Kr de una misma repetición, a los 20 días posteriores a ser germinadas *in vitro* en medio basal MS.

Con la finalidad de analizar si las diferencias entre los tratamientos fueron significativas se llevó a cabo el test DGC (Infostat, 2006). La variable porcentaje de germinación presentó una distribución normal, de manera que no fue necesaria realizar la transformación de los datos correspondientes a dicho parámetro.

Tabla 6. Cuadro de análisis de la varianza para ensayo de germinación de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela irradiadas con diferentes dosis de rayos X.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Modelo	6360,30	4	1590,08	14,51	<0,0001
Dosis	6360,30	4	1590,08	14,51	<0,0001
Error	2521,31	23	109,62		
Total	8881,61	27			

Se discriminó el tratamiento control (0 Kr) de las 4 dosis de Kriptón utilizadas, si bien no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre dosis (Tabla 7). Además, como se aprecia en la Figura 9, no se redujo la tasa de supervivencia cuando se incrementó la dosis de irradiación. Por lo tanto, se decidió trabajar con la mayor dosis a fin de aumentar la frecuencia de cambios (40 kr).

Tabla 7. Porcentaje de germinación en medio MS de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela irradiadas con rayos X.

Dosis de rayos X	Porcentaje de Germinación (%)
0 Kr	76,67 ^b
10 Kr	40,00 ^a
20 Kr	41,43 ^a
30 Kr	32,04 ^a
40 kr	40,00 ^a

Medias con distintas letras difieren significativamente (P≤0,05)

La dosis seleccionada de rayos X (40 Kr) produjo alteraciones con bajo daño, ya que las plantas, si bien mostraron diferencias morfológicas respecto de control, florecieron y produjeron semillas.

b. Ensayos masivos

A partir de estos resultados, se realizaron ensayos masivos con la finalidad de generar plantas con alta variabilidad inducida, a ser utilizadas en la selección de genotipos para tolerancia a salinidad y sequía. A tal fin se colocaron a germinar *in vitro* 500 semillas previamente irradiadas con 40 Kr, de las cuales aproximadamente unas 250 plántulas entraron en fase de selección *in vitro* (125 plántulas a medio con NaCl y 125 a medio con manitol).

Selección in vitro de mutantes con tolerancia a estrés abiótico

En la etapa de inducción de mutaciones, aproximadamente 500 semillas del cv. Biloela habían sido tratadas con EMS y 500 fueron irradiadas con rayos X (ensayos masivos), y posteriormente germinadas *in vitro* en medio basal MS. A los 7 días de haber sido cultivadas en este medio, aproximadamente 250 de las semillas correspondientes a cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente, germinaron. La mitad de estas plántulas (125) (tanto para el tratamiento con EMS ó con rayos X) fueron repicadas a medio de selección MS adicionado con NaCl (50 mM) y la otra mitad restante se colocaron en medio MS con manitol (25 mM). Se muestra a continuación un esquema del proceso de selección (Figura 12).

Con respecto al tratamiento con manitol, concentraciones superiores a 100 mM no permitieron la supervivencia de las plántulas, las que no se recuperaron a pesar de ser repicadas gradualmente a una condición sin estrés, por lo que se decidió no incrementar la concentración de manitol a valores superiores a esta dosis.

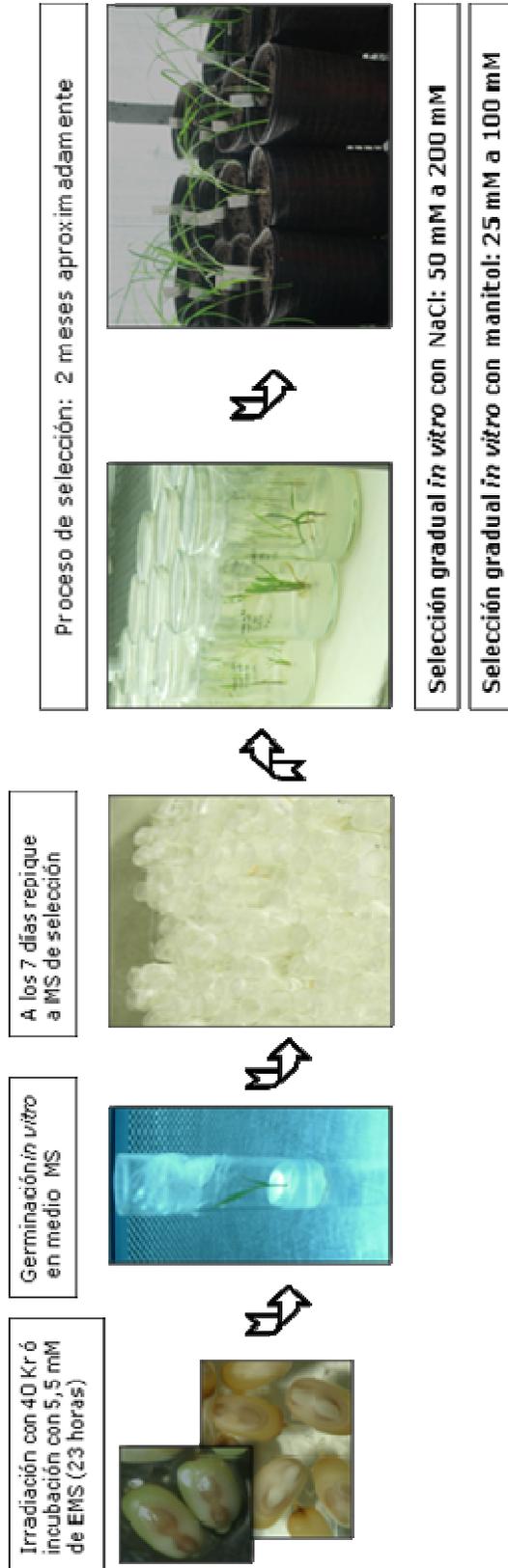


Figura 12. Esquema del proceso de selección *in vitro* con NaCl y manitol, posterior al tratamiento de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela con EMS ó rayos X y germinadas *in vitro*.

Etilmetanosulfonato – Salinidad (NaCl)

De las 500 semillas tratadas con EMS, aproximadamente 250 germinaron en medio MS y 125 pasaron a la etapa de selección *in vitro* con NaCl. En un caso particular, durante el proceso de selección, se evidenció la presencia de floración en una plántula sometida a 100 mM de NaCl, siendo la inflorescencia anormal, sin pedúnculo, con acortamiento de los entrenudos dentro del raquis de la inflorescencia, y contando con anteras y estigmas plumosos como se aprecia en la Figura 13.



Figura 13. Detalle de la inflorescencia atrofiada en planta obtenida a partir de semilla de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS durante 23 horas de exposición y sometida a 100 mM de NaCl.

Como resultado de esta etapa, se obtuvieron 21 plantas que fueron sometidas a dosis crecientes de NaCl en el medio de cultivo MS, y toleraron hasta 200 mM de este agente de selección. Todas las plántulas obtenidas a partir de este proceso de selección *in vitro* presentaron engrosamiento del tallo y hojas carnosas como se aprecia en la Figura 14.



Figura 14. Detalle de una planta seleccionada *in vitro* a 200 mM de NaCl, proveniente de semilla de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS.

Las plantas fueron posteriormente trasplantadas a macetas pequeñas conteniendo como sustrato una mezcla de tierra estéril y vermiculita en proporción 2:1, manteniéndose en invernáculo en condiciones de elevada humedad para su rusticación. En estas condiciones las plantas crecieron y no evidenciaron modificaciones morfológicas observables a simple vista respecto del cv. Biloela, inclusive la planta que en la etapa de selección *in vitro* presentó una inflorescencia anormal.

Etilmetanosulfonato – Sequía (Manitol)

De aproximadamente 125 semillas que habían sido tratadas con EMS y germinadas *in vitro* en medio basal, sólo se obtuvieron 5 plántulas de la etapa de selección con manitol. Se observó que el tallo y las raíces presentaban una apariencia humedecida con hojas senescentes, a medida que se incrementaba la concentración de manitol, y la mayoría de las plantas no se recuperaron a pesar de reducirseles la concentración del agente de selección.

En general, las plantas que toleraron los 100 mM de manitol presentaron una apariencia delgada, con tallo y raíces humedecidas, con presencia de hojas amarillas como se observa en la Figura 15.



Figura 15. Detalle de una planta seleccionada *in vitro* a 100 mM de manitol, proveniente de semilla de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS.

En condiciones de invernáculo, una planta (V302) de las 5 plantas obtenidas presentó alteraciones morfológicas evidentes a simple vista con respecto al cv. Biloela. Como se observa en la siguiente figura (Figura 16), la planta era de reducida altura con tallo extremadamente delgado hasta el primer nudo que luego se engrosaba abruptamente.



Figura 16. Planta con modificaciones morfológicas, obtenida a partir de semilla de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratada con 5,5 mM de EMS y seleccionada con 100 mM de manitol.

Rayos X – Salinidad (NaCl)

A partir de las 500 semillas irradiadas con rayos X, aproximadamente 250 de ellas germinaron en medio MS y 125 pasaron a la etapa de selección *in vitro* con NaCl. Durante el proceso de selección, las plántulas presentaron reducida altura, con tallos engrosados y hojas suculentas y gruesas. De este ensayo se obtuvieron 20 plantas que fueron trasplantadas a tierra y vermiculita en condiciones de invernáculo y nueve de ellas presentaron a simple vista modificaciones morfológicas bajo estas condiciones. Entre las alteraciones se pueden mencionar, una planta con tallo dicotómico, otras presentaban hojas enrolladas y entrenudos cortos (Figura 17).

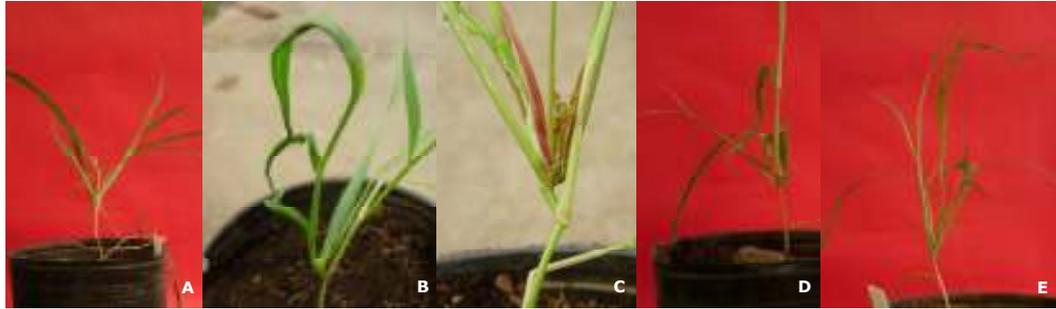


Figura 17. Plantas obtenidas de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela, irradiadas con 40 Kr y posterior selección *in vitro* en medio MS con dosis crecientes de NaCl A) Tallo dicotómico B) hojas enlazadas C) acortamiento de entrenudos D) hojas enrolladas y torcidas E) hojas enrolladas y entrenudos cortos.

Como se observa en la Figura 17.B, dos plantas mostraron las hojas enganchadas entre sí (V209 y V214). Además, la reducida altura fue otro carácter que se evidenció en dos plantas obtenidas de este tratamiento (V210 y V217), sin embargo, una de ellas tenía hojas oscuras y de apariencia seca, mientras que la otra tenía hojas verdes y turgentes. Cabe destacar que una mutante (V212) fue más alta que el control y floreció anticipadamente (Figura 18), mientras que la planta V211 fue de menor altura respecto del cv. Biloela, con estolones aéreos, floreció anticipadamente y no encañó mostrando mucho follaje.



Figura 18. En el centro, planta control sin tratar (0 Kr). A la izquierda y derecha se observan plantas obtenidas a partir de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela tratadas con 40 Kr y seleccionadas en NaCl.

Rayos X – Sequía (Manitol)

De las 125 plántulas derivadas de semillas irradiadas con 40 Kr, solamente 8 de ellas sobrevivieron la etapa de selección con manitol. Las plántulas, durante este período presentaron tallos delgados y hojas de escaso desarrollo. Las plantas trasplantadas, en condiciones de invernáculo, presentaron modificaciones morfológicas. Entre las alteraciones más destacadas se puede mencionar una planta (V305) con un tallo extremadamente delgado, y luego el brote engrosado (Figura 19.A.). Además, otra mutante (V310) presentó reducida altura y tallos cortos, con hojas pequeñas (Figura 19.B.).



Figura 19. Plantas obtenidas de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela, tratadas con 40 Kr y seleccionadas con manitol. A) con tallo delgado con brote engrosado B) de reducida altura sin entrenudos y hojas pequeñas.

Detección de la variabilidad genética inducida mediante RAPD

Análisis con RAPD

El ADN obtenido a partir de hojas de las 54 plantas logradas de los tratamientos de mutagénesis inducida y selección *in vitro*, fue amplificado junto al ADN control, con los 20 cebadores decaméricos de las series A y B de Promega.

En las tres amplificaciones independientes de PCR, realizadas con cada uno de los cebadores ensayados, no se logró amplificación con cinco de ellos (A5, A7, B5, B6, B9). Con los 15 cebadores restantes se obtuvieron diferentes patrones de amplificación y 13 de ellos generaron patrones altamente reproducibles, con múltiples bandas discretas, en las tres repeticiones probadas (Tabla 8).

Las plantas obtenidas de las mutaciones inducidas y la selección *in vitro* produjeron un total de 60 bandas, al ser amplificadas con los 13 cebadores, con una frecuencia promedio de 4,6 bandas por cebador. El número de productos amplificados varió entre 1 (para el cebador B3) a 11 (para el A2) y el tamaño de los amplicones osciló desde 1.500 pb a 6.000 pb, aproximadamente.

De las 60 bandas amplificadas, 11 correspondieron a fragmentos polimórficos (18,3%) detectados con los cebadores A2, A3, A10 y B2 (Tabla 8), siendo el resto de los patrones amplificados monomórficos. Los fragmentos polimórficos obtenidos presentaron un tamaño que osciló entre 1.500 pb y 2.500 pb.

Tabla 8. Cebadores usados para la amplificación del ADN de las 54 plantas putativas mutantes y número de fragmentos amplificados y de fragmentos polimórficos obtenidos.

Cebador	Número de Fragmentos Amplificados	Número de Fragmentos Polimórficos
A1	4	0
A2	11	4
A3	4	1
A4	4	0
A6	4	0
A8	8	0
A9	2	0
A10	2	3
B2	4	3
B3	1	0
B7	4	0
B8	4	0
B10	8	0
Total	60	11

De las 54 plantas analizadas, 10 de ellas mostraron variación en los patrones de amplificación respecto del control cv. Biloela y sólo 1 (V210) fue discriminada con dos cebadores (A2 y el A10) (Tabla 9). Esto corresponde a una frecuencia de variación genética del 18,5% (Tabla 10). Si consideramos el tipo de tratamiento mutagénico, independiente del agente de selección utilizado, para el EMS se obtuvo una variación genética del 19,2%, y con respecto al de rayos X del 17,8% (Tabla 10). Como los datos muestran, ambos agentes mutagénicos presentaron similares porcentajes de variación genética inducida.

Tabla 9. Número de cebadores que mostraron polimorfismo y número de bandas polimórficas obtenidas para cada una de las putativas mutantes.

Variante	Cebadores que mostraron polimorfismo (N°)	Total de bandas polimórficas (N°)	Tratamiento	Fenotipo en R0
V200	1 (A2)	1 (presencia)	EMS-NaCl	Idéntico al parental
V201	1 (A2)	1 (presencia)	EMS-NaCl	Idéntico al parental
V207	1(A10)	1 (presencia)	EMS-NaCl	Idéntico al parental
V208	1 (A2)	1 (presencia)	Rayos X-NaCl	Idéntico al parental
V210	2 (A2-A10)	2 (presencias)	Rayos X-NaCl	Enana con hojas verdes
V211	1 (A10)	1 (presencia)	Rayos X-NaCl	Baja y floreció sin encañiar
V300	1 (B2)	1 (ausencia)	EMS-manitol	Idéntico al parental
V302	1 (B2)	1 (ausencia)	EMS-manitol	Tallo delgado y brote robusto
V310	1 (B2)	1 (ausencia)	Rayos X-manitol	Enana y sin turgencia
V311	1 (A3)	1 (ausencia)	Rayos X-manitol	Planta robusta

Tabla 10. Número total de plantas obtenidas, número de plantas que mostraron polimorfismo y porcentaje de variación observada para los tratamientos con EMS ó con rayos X.

Tratamiento	Total de plantas obtenidas (N°)	Plantas que presentaron polimorfismo (N°)	Variación genética observada (%)
EMS	26	5	19,2
Rayos X	28	5	17,8
Total	54	10	18,5

Los perfiles obtenidos con el cebador A3, muestran que una planta derivada del tratamiento con rayos X y selección posterior con manitol (línea 10 (V311)) carece de una banda, de aproximadamente 2.500 pb, respecto del control testigo (cv. Biloela).

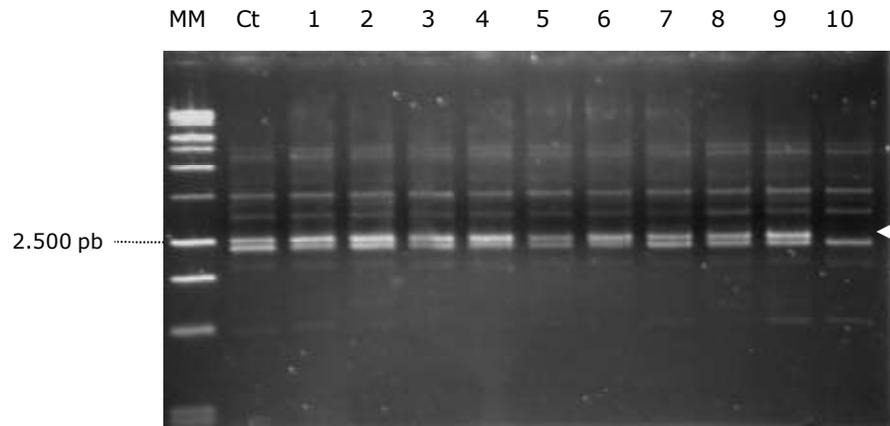


Figura 20. Cebador A3. Plantas seleccionadas por tolerancia a manitol: del 1 al 5: de semillas tratadas con EMS; del 6 al 10: de semillas tratadas con rayos X. Ct: Testigo cv. Biloela. La flecha indica la ausencia de la banda respecto del testigo. MM: marcador ADN Ladder 1 Kb (Promega).

Con el cebador B2, se observó ausencia de una banda de aproximadamente 2.000 pb en el perfil de amplificación correspondientes a las líneas 1 (V300), 3 (V302) y 9 (V310) respecto al control Ct (Figura 21). Estas plantas provenían de selección *in vitro* con manitol de tratamientos con EMS y rayos X.

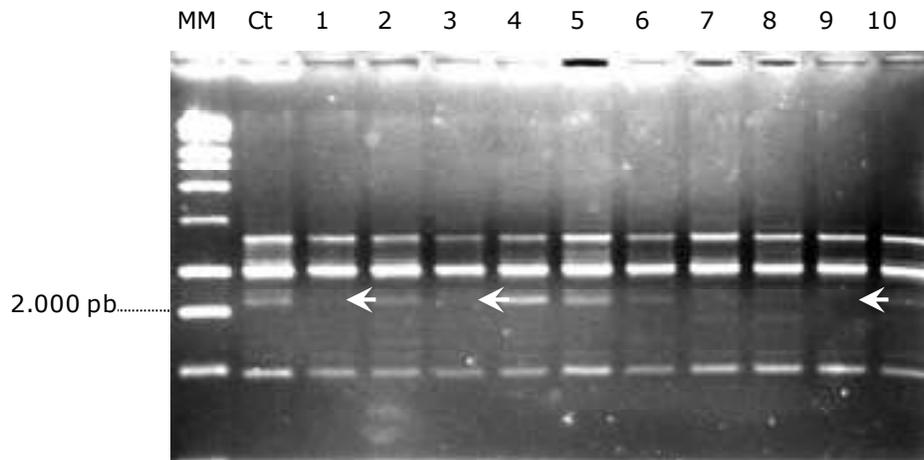


Figura 21. Cebador B2. Plantas seleccionadas por tolerancia a manitol: del 1 al 5: de semillas tratadas con EMS; del 6 al 10: de semillas tratadas con rayos X. Ct: Testigo cv. Biloela. Las flechas indican las bandas ausentes en relación al control. MM: marcador ADN Ladder 1 Kb.

En dos plantas seleccionadas para tolerancia a salinidad, provenientes de semillas tratadas con EMS, se observó la presencia de una banda adicional para cada una de ellas, que no está presente en los patrones de amplificación del control (Figura 22. línea 1: V200 y línea 2: V201). Con respecto a la línea 1 (V200), la banda presente correspondió a aproximadamente 1.700 pb, mientras que en el caso de la línea 2 (V201) fue de 1.900 pb.

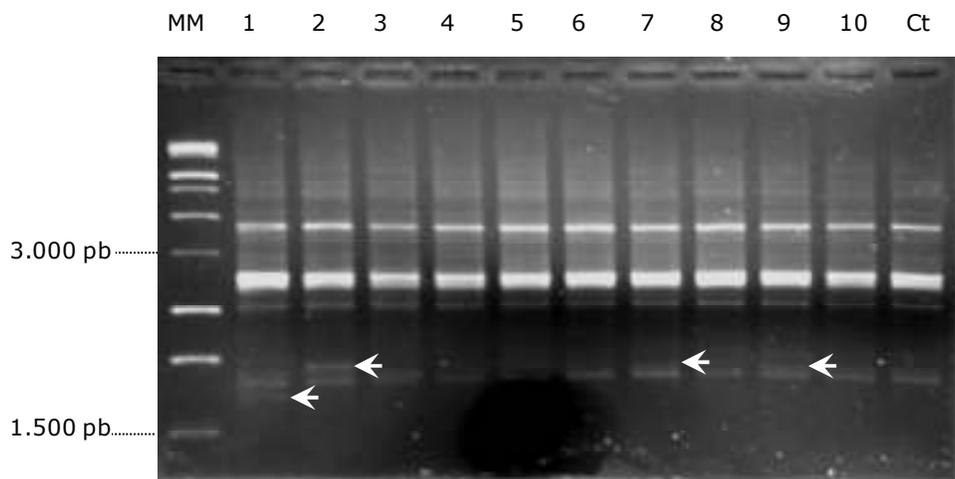


Figura 22. Cebador A2. Plantas seleccionadas por tolerancia a NaCl de semillas tratadas con: líneas 1 al 6: EMS, líneas 7 al 10: con rayos X. Ct: Testigo cv. Biloela. Las flechas indican las bandas polimórficas. MM: marcador ADN Ladder 1 kb.

En dos plantas seleccionadas para tolerancia a salinidad, provenientes de semillas irradiadas con 40 Kr (línea 7: V208 y línea 9: V210) se halló una banda que no estaba presente en el control Ct (cv. Biloela). Esta banda adicional corresponde aproximadamente a 1.900 pb.

Como se puede apreciar en la Figura 23, para el cebador A10, la línea 8 (V207) presenta una banda adicional con respecto al control Ct de aproximadamente 1.500 pb. Este genotipo fue obtenido a partir de semillas tratadas con EMS y selección posterior con NaCl.

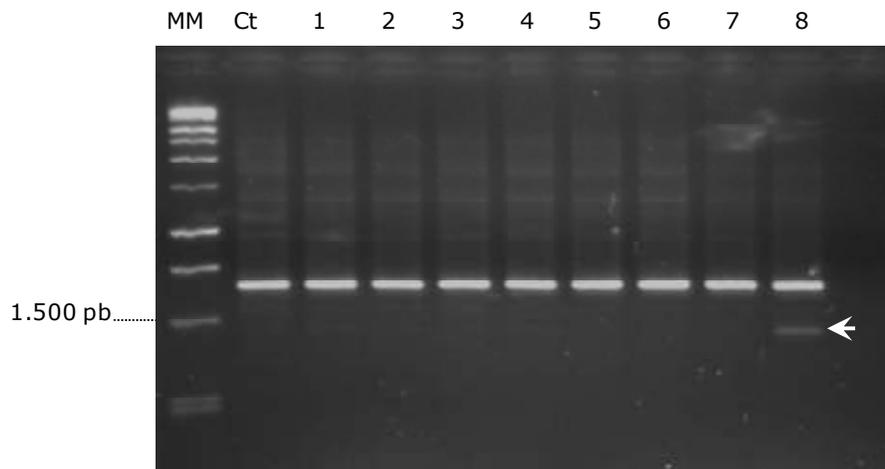


Figura 23. Cebador A10. Plantas seleccionadas por tolerancia a sal: del 1 al 8: de semillas tratadas con EMS. Ct: Control cv. Biloela. La flecha indica la banda adicional en relación al control. MM: marcador ADN Ladder 1 kb.

Para el mismo cebador, pero en el perfil de amplificación de plantas seleccionadas para tolerancia a sal, derivadas de semillas irradiadas con rayos X (Figura 24), se observó la presencia adicional de una banda de aproximadamente 1.500 pb, en los genotipos V210 (línea 3) y V211 (línea 4).

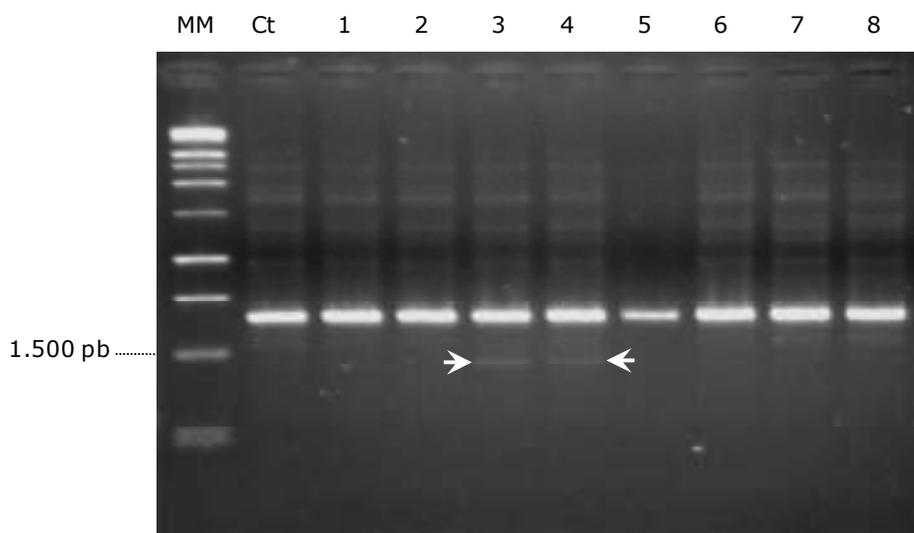


Figura 24. Cebador A10. Plantas seleccionadas por tolerancia a sal: del 1 al 8: de semillas irradiadas con rayos X. Ct: Testigo cv Biloela. Las flechas indican las bandas adicionales en relación al testigo. MM: marcador ADN Ladder 1 kb.

Todas las bandas ausentes en los patrones de amplificación respecto al control cv. Biloela (Ct), correspondieron a genotipos (V300, V302, V310, V311) que fueron seleccionados por tolerancia a sequía (ya sea de semillas tratadas con EMS ó con rayos X) (Tabla 9).

Con respecto a las plantas seleccionadas por tolerancia a salinidad, todas ellas presentaron un fragmento adicional polimórfico que las discriminó con respecto al control independiente del cebador utilizado (Tabla 9).

De las 10 plantas (18,5% respecto de las 54 analizadas) que presentaron polimorfismos diferentes del parental (cv. Biloela) a través de la técnica RAPD, sólo en 5 se observaron modificaciones morfológicas en condiciones *ex vitro*, correspondiendo 4 a tratamientos con rayos X y 1 con EMS (Tabla 9). Sin embargo, es importante considerar, que en condiciones de invernáculo se evidenciaron alteraciones morfológicas observables a simple vista en 14 de las 54 plantas obtenidas del proceso de mutagénesis inducida y posterior selección *in vitro*. De

estas 14 plantas, sólo una de ellas (V302) provenía de semillas tratadas con EMS y las restantes se obtuvieron de semillas irradiadas con rayos X, independiente del proceso de selección al que fueron sometidas.

Entre los fenotipos alterados, se identificó una planta de temprana floración respecto al control (V211), que no encañó para emitir la inflorescencia, de reducida altura y con mucho follaje. Una banda adicional en el patrón de amplificación obtenido con el cebador A10 la diferenció del cultivar control (Figura 24. línea 4).

El genotipo V210 fenotípicamente es una planta de menor altura que el control cv. Biloela, se mantuvo sin macollar con hojas verdes y turgentes (Tabla 9). Presentó dos bandas amplificadas con los cebadores A2 y A10 que lo discriminaron molecularmente del control Ct (Figura 22. línea 9 y Figura 24. línea 3).

El genotipo V310, fenotípicamente pequeño, de reducida altura y con hojas más oscuras y secas (características observables en condiciones controladas de invernáculo) tuvo diferencias en el perfil de amplificación respecto del cultivar control Biloela (Ct), para el cebador B2 (Figura 21. línea 9).

El genotipo V311 es una planta robusta de gran porte, mayor en altura que el cultivar control y la diferencia molecular con respecto al mismo fue la ausencia de una banda (Figura 20. línea 10).

Resultado de semillas tratadas con EMS, se obtuvo el genotipo V302 (Figura 21. línea 3) que tenía tallo delgado con brotes robustos y la ausencia de una banda en el patrón de amplificación obtenido con el cebador B2 la diferenció del cultivar control.

DISCUSIÓN

El presente trabajo ha demostrado que es posible generar variabilidad genética en *Cenchrus ciliaris* L. mediante la utilización de agentes mutagénicos, con posterior selección *in vitro*. Si bien no existen antecedentes sobre el empleo en esta especie de las técnicas antes mencionadas, fue posible obtener genotipos que toleraron 100 mM de manitol y 200 mM de NaCl.

Para inducir variabilidad genética con agentes químicos y físicos, entre los factores importantes a tener en cuenta se pueden mencionar, tipo y dosis de mutágeno a utilizar, tiempo de exposición al mismo, y genotipo y clase de explanto a mutar (Donini and Sonnino, 1998). Dado que en tratamientos de mutagénesis inducida es imprescindible que se generen tasas de mutación elevadas, combinadas con mínimos efectos deletéreos (Hohmann *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 2008), este equilibrio debe ser optimizado para cada especie.

La dosis que causa una reducción del 50% en la germinación de la semilla (DL50) es un parámetro apropiado para comparar la eficiencia del tratamiento mutagénico (Hohmann *et al.*, 2005). Diferentes protocolos con EMS revelaron una reducción en el número de plantas obtenidas al aumentar la concentración de este agente (Rocha Latado *et al.*, 2004). En semillas tratadas de Fenugreek (Basu *et al.*, 2008) se utilizaron concentraciones crecientes de 10 a 200 mM de EMS durante exposiciones de 2 a 24 horas, encontrándose que tratamientos prolongados y dosis elevadas de este agente incrementaban el número de mutantes letales. En remolacha, si bien se usó una dosis por debajo de la DL50, se obtuvo sólo un 16% de plantas infértiles en la generación M₂ (Hohmann *et al.*, 2005). Esto conlleva a una combinación aceptable de mínimos efectos fisiológicos, bajas tasas de plantas estériles y buenas tasas de mutación.

A consideración de los resultados logrados en *Cenchrus ciliaris* L., la determinación y el empleo de la DL50 del agente mutagénico EMS (5,5 mM de EMS durante 23 horas) permitió combinar exposición prolongada y baja dosis del mismo.

La puesta a punto de la dosis de semiletalidad es importante dentro del programa de mejoramiento genético de esta especie, debido a que se pretende posteriormente realizar selección y obtener plantas que produzcan semillas, siendo necesario entonces no reducir en demasía la cantidad de material de partida.

Con respecto a la aplicación de rayos X, las semillas de *Cenchrus ciliaris* L. presentaron alta resistencia a la irradiación ya que aún llegando a emplear dosis de 40 Kr (400 Gy), no fue posible establecer curvas de radiosensibilidad. Este efecto puede deberse a la cantidad de agua presente en la semilla, factor de relevancia en tratamientos con radiaciones ionizantes (Brunner, 1995; Donini and Sonnino, 1998).

La aplicación de los agentes mutagénicos antes descritos (EMS y rayos X) ha sido citada en la obtención de un amplio espectro de mutantes de interés agronómico (Hohmann *et al.*, 2005; Luan *et al.*, 2007). Mutantes morfo-químicos obtenidos tanto con EMS como con rayos gamma permitieron recuperar en generaciones M₂ y M₃, individuos con parámetros agronómicos diferentes respecto del control (Rekha and Langer, 2007). Cambios morfo-métricos y reproductivos, tales como mejor rendimiento de semillas (Basu *et al.*, 2008) y genotipos con hábito de crecimiento determinado (Gaur *et al.*, 2008), se observaron a través de la exposición de semillas al EMS. En estas investigaciones, se afectaron caracteres como tiempo a floración, ramificación, número de órganos florales, rendimiento de aceite, altura de planta, hábito de crecimiento, forma de hojas y número de semillas, entre algunos de los rasgos observados (Basu *et al.*, 2008; Gaur *et al.*, 2008).

Como resultado de la irradiación con rayos X en semillas maduras de *Cenchrus ciliaris* L., un amplio número de plantas presentaron modificaciones morfológicas, al momento de establecerse condiciones *ex vitro*, independiente de la selección a las que fueron sometidas *in vitro*. Altura de planta, número y longitud

de entrenudos, forma y tamaño de hojas, macollaje, y tiempo a floración son algunos de los caracteres alterados, los cuales al ser gobernados por pocos genes, frecuentemente resultan afectados en tratamientos de mutagénesis inducida (Basu *et al.*, 2008; Gaur *et al.*, 2008).

Se identificó una planta (V211) de reducida altura y notable precocidad en la floración respecto al control cv. Biloela sin tratar. La causa de la reducción en la altura de planta podría deberse al acortamiento de entrenudos, ya que se ha determinado que una mayor altura se debe al incremento del número y longitud de entrenudos, el cual se ve acompañado de mayor longitud de células y número de éstas por área (Rekha and Langer, 2007).

En relación a las plantas derivadas de semillas tratadas con EMS, en este trabajo sólo un genotipo (V302) evidenció, en condiciones de invernáculo, reducida altura. Si bien existen antecedentes de alteraciones en caracteres morfométricos y reproductivos, la falta de variación fenotípica generada por el EMS podría deberse al tamaño y el nivel del ploidía del genoma de esta especie, factores que al parecer dificultarían la expresión fenotípica consecuente de la acción de este mutágeno. Otra posible causa es que algunos cambios genéticos puedan no ser evidenciados fácilmente, debido a que la diferencia estructural en el producto génico no siempre implica la alteración de una función biológica lo suficiente como para modificar el fenotipo (Palombi *et al.*, 2007).

La identificación y la evaluación de parámetros morfométricos y reproductivos toma relevancia en la discriminación de putativos mutantes respecto al cultivar base en generaciones avanzadas M_2 y M_3 . A consecuencia se plantea la necesidad de caracterizar a través de parámetros de interés agronómico a las progenies de los mutantes obtenidos, con la finalidad no sólo de caracterizarlos y diferenciarlos respecto de su parental sino también de observar la estabilidad de los

putativos caracteres alterados. Diversos trabajos avalan estas consideraciones (Johnson *et al.*, 2002; Basu *et al.*, 2008; Gaur *et al.*, 2008).

Todos los individuos generados como resultado de la aplicación de agentes mutagénicos son una importante fuente de recursos genéticos, aprovechable en un programa de mejoramiento, fundamentalmente en especies de base genética estrecha como las apomícticas (Luan *et al.*, 2007). No obstante, el principal inconveniente es la identificación de aquellos genotipos que presenten rasgos de interés agronómico. A fin de sobrellevar esta problemática, numerosos trabajos utilizan agentes químicos o físicos combinados con técnicas de cultivo *in vitro* (Pathirana *et al.*, 2002; Hossain *et al.*, 2006; Luan *et al.*, 2007). Este sistema ofrece la ventaja de trabajar con un gran número de individuos, en poco espacio y bajo condiciones controladas (Hossain *et al.*, 2006; Luan *et al.*, 2007), a lo que se suma la posibilidad de incorporar agentes de selección en el medio de cultivo, fundamentalmente cuando los caracteres a medir son factibles de ser evaluados a través de la adición de un agente simulador (Donini and Sonnino, 1998; Dörffling *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios usan como explanto inicial tejidos poco diferenciados (inflorescencias inmaduras), sin embargo, la regeneración de estos materiales no siempre es fácil, y las plantas pueden o no retener la tolerancia lograda inicialmente (Carretero *et al.*, 2007). Si bien *Cenchrus ciliaris* L. cuenta con protocolos de regeneración *in vitro*, sus porcentajes son reducidos (Ross *et al.*, 1995; López Colomba *et al.*, 2006) y realizar selección para tolerancia a estreses decrece ampliamente estos valores, debido principalmente, al fuerte estrés al que son sometidas las células (Luan *et al.*, 2007). Además, la incorporación de un tratamiento mutagénico previo o posterior, reduciría la formación potencial de plántulas *in vitro*.

Como alternativa, otros autores han utilizado explantos como semillas o vástagos (tejidos diferenciados) debido a la disponibilidad estacional de los mismos, para ser sometidos a estrés (Fuller *et al.*, 2006; Carretero *et al.*, 2007). Se pueden mencionar la selección de clones con tolerancia a salinidad en cassava (Carretero *et al.*, 2007), en frutilla (Dziadczyk *et al.*, 2003), en tomate (Shibli *et al.*, 2007) y en papa (Shaterian *et al.*, 2008), entre otros.

En este trabajo, mediante selección *in vitro*, se pudieron rescatar genotipos que toleraron 200 mM de NaCl y 100 mM de manitol. La utilización de manitol permitió la recuperación de un número reducido de individuos, y aquellos que sobrevivieron tuvieron dificultad para recuperarse del estrés al que habían sido sometidos, ya sea luego del tratamiento con EMS ó con rayos X. Si bien no hay antecedentes previos sobre la utilización de este agente en *Cenchrus ciliaris* L., se menciona su posible efecto tóxico. Verlues *et al.* (2006) cita que el manitol penetra libremente por los poros y provoca un fenómeno denominado plasmólisis, que no es característico de estrés hídrico, ocasionando un daño celular superior al ocurrido bajo sequía.

Por otra parte, la presión de selección ejercida *in vitro*, ha sido considerada no sólo como un mecanismo de rescate de mutaciones asociadas al estrés impuesto sino además como un proceso inductor de cambios *per se*. Al respecto, Lu *et al.*, (2007b) han observado modificaciones genéticas y epigenéticas en plántulas de *Brassica napus* sometidas a estrés salino bajo condiciones de hidroponia.

Posteriores análisis serán necesarios para determinar si la presión de selección *in vitro* ha permitido y/o favorecido la recuperación de aquellas mutaciones asociadas con tolerancia a salinidad y sequía. Sin embargo, es importante considerar que, con la finalidad de aumentar la probabilidad de hallar mutaciones con énfasis en caracteres relacionados con tolerancia a estreses abióticos, se requeriría a futuro incrementar el tamaño de la población sobre la cual

se aplique mutagénesis inducida, por la naturaleza poligénica de estos caracteres a seleccionar *in vitro* y por el nivel de ploidía de *Cenchrus ciliaris* L., factores que disminuirían la chance de obtener alteraciones genéticas para dichos estreses.

A fin de determinar la ocurrencia de variabilidad genética en las plantas obtenidas de tratamientos mutagénicos y posterior selección *in vitro*, se empleó la técnica molecular RAPD, la cual ha sido ampliamente utilizada en estudios de discriminación genética (Kim *et al.*, 2003; Salem *et al.*, 2007), para test de progenie (Phong *et al.*, 2001) y en la identificación de mutantes inducidos (Atak *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007). En los análisis con marcadores moleculares, se evita las variaciones ocasionadas por la interacción genotipo-ambiente, desventaja principal de las evaluaciones a través de caracteres agronómicos (Johnson *et al.*, 2002).

Como resultado de la aplicación de los RAPDs, se obtuvieron 11 bandas polimórficas con 4 de los 20 cebadores testeados, que podrían ser originadas por modificaciones cromosómicas en la región de amplificación o ser consecuencia de alteraciones en el sitio de unión del cebador (Williams *et al.*, 1990; Phong *et al.*, 2001). De esta manera, Las plantas derivadas de semillas tratadas con EMS y rayos X, y seleccionadas *in vitro* revelaron en sus patrones de amplificación un 18,5% de variación genética en promedio, respecto al control sin tratar cv. Biloela. Este porcentaje de alteración fue similar para ambos agentes mutagénicos (rayos X y EMS) y superior al obtenido en otros estudios. Al respecto, Lu *et al.*, (2007) en tratamientos de mutagénesis inducida combinado con cultivo *in vitro* en *Narcissus* detectaron polimorfismos del 8,3%.

No obstante, en la bibliografía se cita la necesidad de emplear un número elevado de juegos de primers (40 ó 50 juegos) lo que permitiría realizar una búsqueda (al azar) más exhaustiva del genoma (Lu *et al.*, 2007a; Palombi *et al.*, 2007). Asimismo, la utilización de más de un marcador molecular con diferentes regiones de amplificación del genoma, podría incrementar la posibilidad de hallar

polimorfismos y realizar un mejor análisis de la estabilidad/variación genética lograda en estos individuos (Orbović *et al.*, 2008).

Los resultados aquí presentados muestran que técnicas moleculares, como RAPD, podrían ser útiles en la identificación de mutantes inducidos en estadíos tempranos de desarrollo. No obstante, futuros estudios se requerirán para determinar si estas alteraciones están asociadas o se traducen en variaciones de interés agronómico.

La presencia de bandas adicionales en aquellas plantas mutadas y seleccionadas *in vitro*, alienta el interés de rescatar las bandas diferenciales, clonarlas y secuenciarlas a fin de identificar las mismas mediante análisis por homología en bases de datos. Posteriores análisis serán necesarios para clarificar qué regiones del genoma han sido modificadas y qué genes se encuentran localizados en las mismas (Palombi *et al.*, 2007) y si la selección *in vitro* ha favorecido el rescate de modificaciones asociadas a tolerancia a salinidad y sequía, o ha actuado como un proceso adaptativo generador de cambios genéticos y/o epigenéticos (Nissim Amzallag, 2000; Lu *et al.*, 2007b).

Cabe señalar que sólo 2 de las 9 plantas (obtenidas a partir de tratamientos con EMS y rayos X en semillas y selección *in vitro*) que presentaban alteraciones fenotípicas en condiciones *ex vitro*, mostraron polimorfismos a nivel molecular. Algunos autores atribuyen la falla de los RAPDs en discriminar genotipos a la escasa porción del genoma que es cubierto por estos marcadores (Raimondi *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2008; Orbović *et al.*, 2008). Sumado a esto, el amplio tamaño genómico de *Cenchrus ciliaris* (1.300 Mpb) (Gaut, 2002; Ozias-Akins, 2006), es un importante factor a considerar en el análisis molecular (Orbović *et al.*, 2008). Por otro lado, la ausencia de polimorfismo no excluye que bandas con similar tamaño puedan corresponder a diferentes productos de amplificación (Carvalho *et al.*, 2004).

Otro aspecto a tener en cuenta es la segregación del marcador. La naturaleza dominante de los RAPDs impide distinguir a los homocigotos dominantes de los heterocigotos, de esta manera las mutaciones que afecten uno de los alelos para un homocigoto dominante de un determinado locus pueden no ser detectadas (Palombi *et al.*, 2007), más aún en el caso de los poliploides.

Basados en los presentes resultados y posteriores evaluaciones de productividad, digestibilidad y persistencia, así como también la aplicación de otras técnicas moleculares, se determinará si las plantas obtenidas presentan potencial para ser incorporadas como nuevos cultivares en el mercado local.

CONCLUSIONES

En la actualidad, limitados logros han sido realizados en la obtención de forrajeras con tolerancia a estreses, de buena producción y persistencia a campo.

Este trabajo es la primer referencia en la utilización de mutaciones inducidas y selección *in vitro* como vía para la obtención de variabilidad genética en *Cenchrus ciliaris* L. en caracteres asociados con tolerancia a salinidad y sequía. La combinación de estas metodologías nos permitió obtener 54 plantas tratadas con mutágenos químicos y físicos y seleccionadas *in vitro*, en un lapso de tiempo relativamente corto, en contraste con el requerido en un programa de mejoramiento convencional.

En el marco de un proyecto de mejoramiento genético, sería necesario aumentar el número inicial de individuos de la población a tratar con mutágenos, con el fin de que se incremente la chance de hallar mutantes con modificaciones en algún carácter o caracteres relacionados con tolerancia a estrés salino y osmótico, a consideración de la naturaleza poligénica de los caracteres a seleccionar *in vitro* y por el nivel de ploidía de *Cenchrus ciliaris* L., factores que limitarían la probabilidad de inducir alteraciones genéticas para dichos estreses.

A partir del nuevo germoplasma obtenido por mutagénesis, el rescate de aquellas mutaciones asociadas a caracteres involucrados en tolerancia a estreses abióticos, requiere de la implementación de técnicas eficientes, rápidas y sencillas que permitan testear grandes cantidades de material, ya que las evaluaciones a campo son dificultosas por la imposibilidad de mantener grandes ensayos y por el costo de los mismos.

Aquí se presenta la metodología de selección *in vitro*, la cual ofrece la ventaja de integrar técnicas convencionales con selección de material en condiciones controladas y dirigidas para características de interés agronómico. Posteriormente, contando con un menor número de individuos ya preseleccionados, el germoplasma promisorio puede ser caracterizado en condiciones de campo.

Con respecto a la evaluación a través de marcadores RAPDs, cambios a nivel de ADN producto del tratamiento mutagénico, resultaron en patrones polimórficos que fueron detectados por dicha técnica.

Los resultados de este trabajo alientan la utilización de los marcadores RAPDs como una herramienta sencilla y útil en la identificación de mutantes inducidos física y químicamente, en estadíos tempranos de desarrollo, dentro de un esquema de mejoramiento no convencional. Asimismo, no debe excluirse la posibilidad de encontrar variabilidad genética adicional, siendo imperiosa la necesidad de utilizar un mayor número de cebadores y/o diversos marcadores de manera de cubrir diferentes regiones del genoma y de este modo, realizar una búsqueda más exhaustiva de las putativas modificaciones inducidas por los tratamientos mutagénicos.

Cabe señalar la necesidad de implementar conjuntamente evaluaciones a nivel morfológico, y molecular en generaciones avanzadas (M_2 y M_3), con la finalidad no sólo de discriminarlos respecto de su parental sino también de observar la estabilidad de las alteraciones halladas inicialmente.

Es así, que el mejoramiento a través de mutaciones inducidas es una importante y valiosa herramienta que brinda la posibilidad de alterar algunos genes pero conservando la información genética propia de la especie (Gulsen *et al.*, 2007). Otro factor de relevancia es que las variedades obtenidas son de gran aceptación a nivel del consumidor, en contraste con los organismos genéticamente modificados (OGM) (Piagnani *et al.*, 2008) y de libre disponibilidad para propósitos de mejoramiento (Ahloowalia *et al.*, 2004).

Los nuevos genotipos obtenidos constituyen una importante fuente de recursos genéticos aprovechable para el lanzamiento de cultivares comerciales con tolerancia incrementada a estreses abióticos, que puedan ser incluidos dentro de planteos ganaderos en la zona del noroeste de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

ABLE J. AND P. LANGRIDGE. 2006. Wild sex in the grasses. Trends in Plant Science 11: (6): 261-263.

AGARWAL P. K., P. AGARWAL, M. K. REDDY AND S. K. SOPORY. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Reports 25: 1263-1274.

AHLOOWALIA B. S. AND M. MALUSZYNSKI. 2001. Induced mutations- A new paradigm in plant breeding. Euphytica 118: 167-173.

AHLOOWALIA B. S., M. MALUSZYNSKI. AND K. NICTERLEIN. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica 135: 187-204.

ALMANSOURI M., J.-M. KINET AND S. LUTTS. 2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Plant and Soil 231: 243-254.

ASHRAF M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. Flora 199: 361-376.

ASHRAF M. AND P. J. C. HARRIS. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science 166: 3-16.

ASHRAF M. AND M. R. FOOLAD. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

ASHRAF M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology Advances 27: 84-93.

ATAK Ç., S. ALIKAMANOĞLU, L. AÇIK AND Y. CANBOLAT. 2004. Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD. Mutation Research 556: 35-44.

AYERZA R. 1981a. El Buffel grass: utilidad y manejo de una promisoría gramínea. Editorial Hemisferio Sur. 120.

AYERZA R. 1981b. Pasturas tropicales en el Noroeste Argentino. Rangelands 3: (4): 149-150.

AYERZA R. 1982. El Buffel y El Nelore: Legado de la India para las zonas áridas de Argentina. Rangelands 4: (4): 155-157.

BAJJI M., P. BERTIN, S. LUTTS, AND J.-M. KINET. 2004. Evaluation of drought resistance-related traits in durum wheat somaclonal lines selected *in vitro*. Australian Journal of Experimental Agriculture 44: 27-35.

BASHAW E. C. 1962. Apomixis and sexuality in Buffel grass. Crop Science 2: 412-415.

BASHAW E. C. 1980. Registration of Nueces and Llano Buffel grass. Crop Science Registro N°. 58 and 59.

BASHAW E. C. AND W. W. HANNA. 1990. Apomictic Reproduction. In Reproductive Versatility in the Grasses. G. P. Chapman (Ed). Cambridge University Press. pp. 100-130.

BASU S. K., S. N. ACHARYA AND J. E. THOMAS. 2008. Genetic improvement of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through EMS induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions. Euphytica 160: 249-258.

BENNICI A., M. ANZIDEI AND G. G. VENDRAMIN. 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant Science 166: 221-227.

BHAGWAT B. AND E. J. DUNCAN. 1998a. Mutation breeding of Highgate (*Musa acuminata*, AAA) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using gamma irradiation. Euphytica 101: 143-150.

BHAGWAT B. AND E. J. DUNCAN. 1998b. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. Scientia Horticulturae 73: 11-22.

BHAT V., S. J. DALTON, S. KUMAR, B. V. BHAT, M. G. GUPTA AND P. MORRIS. 2001. Particle-inflow-gun-mediated genetic transformation of Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.): optimizing biological and physical parameters. Journal of Applied Genetics 42: (4): 405-412.

BHAT V., K. K. DWIVEDI, J. P. KHURANA AND S. K. SOPORY. 2005. Apomixis: An enigma with potential applications. Current Science 89: (11): 1879-1893.

BISWAS J., B. CHOWDHURY, A. BHATTACHARYA, AND A. B. MANDAL. 2002. *In vitro* screening for increased drought tolerance in rice. In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant 38: 525-530.

BORSANI O., V. VALPUESTA AND M. A. BOTELLA. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 101-115.

BRUNNER H. 1995. Radiation induced mutations for plant selection. Applied Radiation and Isotopes 46: (6/7): 589-594.

CARVALHO L. C., L. GOULÃO, C. OLIVEIRA, J. C. GONÇALVES AND S. AMÂNCIO. 2004. RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic

stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 23-27.

CARRETERO C. L., M. CANTOS, J. L. GARCIA AND A. TRONCOSO. 2007. *In vitro*-*ex vitro* salt (NaCl) tolerance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant 43: 364-369.

CHANDRA A. AND A. DUBEY. 2008. Evaluation of genus *Cenchrus* based on malondialdehyde, proline content, specific leaf area and carbon isotope discrimination for drought tolerance and divergence of species at DNA level. Acta Physiologia Plantarum 30: 53-61.

CHAPMAN G. P. AND N. BUSRI. 1994. Apomixis in *Pennisetum*: an ultrastructural study. International Journal of Plant Sciences 155: 492-497.

CHIOSSONNE G. 2006. Sistemas de producción ganaderos del noreste Argentino. Situación actual y propuestas tecnológicas para mejorar su productividad. X Seminario de Pastos y Forrajes.

CUSHMAN J. C. AND H. J. BOHNERT. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. Current Opinion in Plant Biology 3: 117-124.

DA SILVA C. M., C. A. MANGOLIN, A. S. MOTT AND M. F. P. S. MACHADO. 2008. Genetic diversity associated with *in vitro* and conventional bud propagation of *Saccharum* varieties using RAPD analysis. Plant Breeding 127: (2): 160-165.

DE LEON M. 2004. Las pasturas subtropicales en la región semiárida central del país. Informe técnico N° 1. Ampliando la frontera ganadera. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. INTA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimento. En página web:www.inta.gov.ar/manfredi/info/documentos/docprodani/deleon/calicarne.htm-13k-Consulta 11/8/2005

DE LUCA M., L. GARCIA SEFFINO, K. GRUNBERG, M. SALGADO, A. CORDOBA, C. LUNA, L. ORTEGA, A. RODRIGUEZ, A. CASTAGNARO AND E. TALEISNIK. 2001. Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar. Australian Journal of Agricultural Research 52: 903-910.

DEGANI C., L. J. ROWLAND, J. A. SAUNDERS, S. C. HOKANSON, E. OGDEN, A. GOLAN-GOLDHIRSH AND G. J. GALLETTA. 2001. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. Euphytica 117: 1-12.

DHAWAN S., A. K. SHASANY, A. A. NAQVI, S. KUMAR AND S. P. S. KHANUJA. 2003. Menthol tolerant clones of *Mentha arvensis*: approach for *in vitro* selection of menthol rich genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 87-94.

DI RIENZO J. A., A. W. GUZMAN AND F. CASANOVES 2001. A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environment Statistics* 7: (1): 146-159.

DONINI P. AND A. SONNINO. 1998. Induced mutation in plant breeding: current status and future outlook. In *Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement*. S. Mohan Jain, D. S. Brar and B. S. Ahloowalia Editors. Kluwer Academic Publishers. pp. 255-291.

DÖRFFLING K., H. DÖRFFLING AND E. LUCK. 2009. Improved frost tolerance and winter hardiness in proline overaccumulating winter wheat mutants obtained by *in vitro*-selection is associated with increased carbohydrate, soluble protein and abscisic acid (ABA) levels. *Euphytica* 165: (3): 545-556.

DZIADCZYK P., H. BOLIBOK, M. TYRKA AND J. A. HORTYNSKI. 2003. *In vitro* selection of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) clones tolerant to salt stress. *Euphytica* 132: 49-55.

FLOWERS T. J. AND A. R. YEO. 1995. Breeding for Salinity Resistance in Crop Plants: Where Next?. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: (6): 875-884.

FLOWERS T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55: (396): 307-319.

FLOWERS T. J. AND S. A. FLOWERS. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders?. *Agricultural Water Management* 78: 15-24.

FULLER M. P., E. M. R. METWALI, M. H. EED AND A. J. JELLINGS. 2006. Evaluation of abiotic stress resistance in mutated populations of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 86: 239-248.

GAGLIARDI R. F., L. R. HANAI, G. PACHECO, C. A. OLIVEIRA, L. A. CARNEIRO, J. F. MONTENEGRO VALLS, E. MANSUR AND M. L. CARNEIRO VIEIRA. 2007. Assessment of genetic stability among *in vitro* plants of *Arachis retusa* using RAPD and AFLP markers for germplasm preservation. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: (3): 307-312.

GANGOPADHYAY G., S. BASU AND S. GUPTA. 1997. *In vitro* selection and physiological characterization of NaCl- and mannitol-adapted callus lines in *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 161-169.

GANDONOU C. B., T. ERRABII, J. ABRINI, M. IDAOMAR AND N. S. SENHAJI. 2006. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum sp.*) tolerant to NaCl and their response to salt stress. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 87: 9-16.

GAUR P. M., V. K. GOUR AND S. SRINIVASAN. 2008. An induced brachytic mutant of chickpea and its possible use in ideotype breeding. *Euphytica* 159: 35-41.

GAUT B. S. 2002. Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytologist* 154: 15-28.

GESTEIRA A. S., W. C. OTONI, E. G. BARROS AND M. A. MOREIRA. 2002. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. *Plant Breeding* 121: 269-271.

GOEL S., Z. CHEN, J. A. CONNER, Y. AKIYAMA, W. W. HANNA AND P. OZIAS-AKINS. 2003. Delineation by fluorescence *in Situ* hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporous embryo sac formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics* 163: 1069-1082.

GOEL S., Z. CHEN, Y. AKIYAMA, J. A. CONNER, M. BASU, G. GUALTIERI, W. W. HANNA AND P. OZIAS-AKINS. 2006. Comparative Physical Mapping of the Apospory-Specific Genomic Region in Two Apomictic Grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics* 173: 389-400.

GOPAL J. AND K. IWAMA. 2007. *In vitro* screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports* 26: 693-700.

GOPAL J., K. IWAMA AND Y. JITSUYAMA. 2008. Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* 44: 221-228.

GRAHAM T. W. G. AND L. R. HUMPHREYS. 1970. Correction-Salinity response of cultivars of Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*). *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 10: 725-728.

GRIFFITHS A. J. F., J. H. MILLER, D. T. SUZUKI, R. C. LEWONTIN AND W. M. GELBART. 1996. *An Introduction to Genetic Analysis* (6 Ed.). W. H. Freeman & Company. New York. Traducida al castellano. *Introducción al análisis genético*. Interamericana-McGraw-Hill. (Madrid).

GUALTIERI G., J. A. CONNER, D. T. MORISHIGE, L. DAVID MOORE, J. E. MULLET AND P. OZIAS-AKINS. 2006. A segment of the apospory-specific genomic region is highly microsyntenic not only between the apomicts *Pennisetum squamulatum* and Buffel grass, but also with a rice chromosome 11 centromeric-proximal genomic region. *Plant Physiology* 140: 963-971.

GULSEN O., A. UZUN, H. PALA, E. CANIHOS AND G. KAFA. 2007. Development of seedless and *Mal Secco* tolerant mutant lemons through budwood irradiation. *Scientia Horticulturae* 112: 184-190.

GUSTINE D. L., R. T. SHERWOOD, Y. GOUNARIS AND D. HUFF. 1996. Isozyme, protein, and RAPD markers within a half-sib family of buffelgrass segregating for apospory. *Crop Science* 36: 723-727.

HIGNIGHT K. W., E. C. BASHAW AND M. A. HUSSEY. 1991. Cytological and morphological diversity of native apomictic Buffel grass, *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Botanical Gazette* 152: 214-218.

HOFMANN N. E., R. RAJA, R. L. NELSON AND S. S. KORBAN. 2004. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. *Biologia Plantarum* 48: (2): 173-177.

HOHMANN U., G. JACOBS AND C. JUNG. 2005. An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. *Plant Breeding* 124: 317-321.

HOSSAIN Z., A. K. A. MANDAL, S. K. DATTA AND A. K. BISWAS. 2006. Isolation of a NaCl-tolerant mutant of *Chrysanthemum morifolium* by gamma radiation: *in vitro* mutagenesis and selection by salt stress. *Functional Plant Biology* 33: 91-101.

HOSSAIN Z., A. K. A. MANDAL, S. K. DATTA AND A. K. BISWAS. 2007. Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *Journal of Biotechnology* 129: 658-667.

HUNG C. D. AND K. JOHNSON. 2008. Effects of ionizing radiation on the growth and allyl isothiocyanate accumulation of *Wasabia japonica* *in vitro* and *ex vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* 44: 51-58.

HUSSEY M. A. AND B. L. BURSON. 2005. Registration of 'Frio' buffelgrass. *Crop Science* 45: 411-412.

IBARRA-F. F. A., J. R. COX, M. H. MARTIN-R., T. A. CROWL AND C. A. CALL. 1995. Predicting Buffel grass survival across a geographical and environmental gradient. *Journal Range Management* 48: 53-59.

INASE. 2005. Importación de semillas forrajeras subtropicales. En página web: <http://www.argenseeds.com.ar/mercador9.php>. Consulta 10/04/07.

INFOSTAT PROGRAM. 2006. InfoStat/Profesional, Versión 1.6. Software Estadístico. Grupo InfoStat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

JAUHAR P. P. 2006. Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: The prospects and challenges. *Crop Science* 46: 1841-1859.

JESSUP R. W., B. L. BURSON, G. BUROW, Y.-W. WANG, C. CHANG, Z. LI, A. H. PATERSON AND M. A. HUSSEY. 2003. Segmental allotetraploidy and allelic interactions in Buffel grass (*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.) as revealed by genome mapping. *Genome* 46: (2): 304-313.

JESSUP R. 2005. Molecular tools for marker-assisted breeding of Buffel grass. Doctoral dissertation, Texas A&M University. Available electronically from <http://handle.tamu.edu/1969.1/2656>.

JIN S., R. MUSHKE, H. ZHU, L. TU, Z. LIN, Y. ZHANG AND X. ZHANG. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports* 27: 1303-1316.

JOHNSON R. C., W. J. JOHNSTON, C. T. GOLOB, M. C. NELSON AND R. J. SORENG. 2002. Characterization of the USDA *Poa pratensis* collection using RAPD markers and agronomic descriptors. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 349-361.

JOSEPH R., H. YEOH AND C. LOH. 2004. Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. *Plant Cell Reports* 23: 91-98.

KAUSHAL P., S. N. ZADOO, D. R. MALAVIYA AND A. K. ROY. 2005. Apomixis research in India: past efforts and future strategies. *Current Science* 89: (7): 1092-1096.

KIM D. S., I. S. LEE, D. Y. HYUN, C. S. JANG, H. S. SONG, Y. W. SEO AND Y. I. LEE. 2003. Detection of DNA instability induced from tissue culture and irradiation in *Oryza sativa* L. by RAPD analysis. *Journal of Plant Biotechnology* 5: (1): 25-31.

KIM D. S., I. S. LEE, C. S. JANG, D. Y. HYUN, Y. W. SEO AND Y. I. LEE. 2004. Selection of 5-methyltryptophan resistant rice mutants from irradiated calli derived from embryos. *Euphytica* 135: 9-19.

KINANE J. T. AND P. W. JONES. 2001. Isolation of wheat mutants with increased resistance to powdery mildew from small induced variant populations. *Euphytica* 117: 251-260.

KOIWA H., R. A. BRESSAN AND P. M. HASEGAWA. 2006. Identification of plant stress-responsive determinants in arabidopsis by large-scale forward genetic screens. *Journal of Experimental Botany* 57: (5): 1119-1128.

LIU S., H. WANG, J. ZHANG, B. D. L. FITT, Z. XU, N. EVANS, Y. LIU, W. YANG AND X. GUO. 2005. *In vitro* mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Cell Reports 24: 133-144.

LOPEZ COLOMBA E., K. GRUNBERG, S. GRIFFA, A. RIBOTTA, L. MROGINSKI AND E. BIDERBOST. 2006. The effect of genotype and culture medium on somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryos of apomictic cultivars of *Cenchrus ciliaris* L. Grass and Forage Science 61: 2-8.

LU G., X. ZHANG, Y. ZOU, Q. ZOU, X. XIANG AND J. CAO. 2007a. Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. Plant Cell Tissue Organ Culture 88: 319-327.

LU G., X. WU, B. CHEN, G. GAO AND K. XU. 2007b. Evaluation of Genetic and Epigenetic Modification in Rapeseed (*Brassica napus*) Induced by Salt Stress. Journal of Integrative Plant Biology 49: (11): 1599-1607.

LU S., X. PENG, Z. GUO, G. ZHANG, Z. WANG, C. WANG, C. PANG, Z. FAN AND J. WANG. 2007c. *In vitro* selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* × *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. Plant Cell Reports 26: (8): 1413-1420.

LUAN Y.-S., J. ZHANG, X.-R. GAO AND L.-J. AN. 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 88: 77-81.

LUNA C., L. GARCIA SEFFINO, C. ARIAS AND E. TALEISNIK. 2000. Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. Plant Breeding 119: 903-910.

LUNA C., M. DE LUCA AND E. TALEISNIK. 2002. Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar. II. Oxidative stress. Australian Journal of Agricultural Research 53: 663-669.

LUTTS S., M. ALMANSOURI AND J.-M. KINET. 2004. Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. Plant Science 167: 9-18.

MALUSZYNSKI M. 2001. Officially released mutant varieties – The FAO/IAEA database. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 175-177.

MANJAYA J. G., K. N. SUSEELAN, T. GOPALAKRISHNA, S. E. PAWAR AND V. A. BAPAT. 2007. Radiation induced variability of seed storage proteins in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Food Chemistry 100: 1324-1327.

MARTIN K. P., S. K. PACHATHUNDIKANDI, C.-L. ZHANG, A. SLATER AND J. MADASSERY. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp.*) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant 42: 188-192.

MARALAPPANAVAR M. S., M. S. KURUVINASHETTI AND C. C. HARTI. 2000. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Euphytica 115: 173-180.

MILES J. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. Crop Science 47: (S3): S238-S249.

MINSON D. J. AND R. A. BRAY. 1985. *In vivo* digestibility and voluntary intake by sheep of five lines of *Cenchrus ciliaris* selected on the basis of *in vitro* digestibility. Australian Journal of Experimental Agriculture 25: 306-310.

MLČOCHOVA L., O. CHLOUPEK, R. UPTMOOR, F. ORDON AND W. FRIEDT. 2004. Molecular analysis of the barley cv. Valticky and its X-ray-derived semidwarf-mutant Diamant. Plant Breeding 123: 421-427.

MOHAMED M. A.-H., P. J. C. HARRIS AND J. HENDERSON. 2000. *In vitro* selection and characterization of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. Plant Science 159: 213-222.

MOHAMED F. M. AND A. A. TAWFIK. 2006. Dehydration-induced alterations in growth and osmotic potential of callus from six tepary bean lines varying in drought resistance. Plant Cell Tissue Organ Culture 87: 255-262.

MOHAN JAIN S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166.

MOHAN JAIN S. 2005. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 113-123.

MOLASSIOTIS A. N., T. SOTIROPOULOS, G. TANOU, G. KOFIDIS, G. DIAMANTIDIS AND I. THERIOS. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. Biologia Plantarum 50: (1): 61-68.

MUNNS R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant, Cell and Environment 25: 239-250.

MUNNS R., S. HUSAIN, A. R. RIVELLI, R. A. JAMES, A. G. CONDON, M. P. LINDSAY, E. S. LAGUDAH, D. P. SCHACHTMAN AND R. A. HARE. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil* 247: 93-105.

MUNNS R. AND R. A. JAMES. 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploide wheat. *Plant and Soil* 253: 201-218.

MUNNS R. AND M. TESTER. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-81.

MURASHIGE T. AND SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

NAGA AMRUTHA R., G. JOGESMAR, P. SRILAXMI AND P. B. KAVI KISHOR. 2007. Rubidium chloride tolerant callus cultures of rice (*Oryza sativa* L.) accumulate more potassium and cross tolerate to other salts. *Plant Cell Reports* 26: 1647-1662.

NAYAK S., B. K. DEBATA, V. K. SRIVASTAVA AND N. S. SANGWAN. 2003. Evaluation of agronomically useful somaclonal variants in Jamrosa (a hybrid *Cymbopogon*) and detection of genetic changes through RAPD. *Plant Science* 164: 1029-1035.

NISSIM AMZALLAG G. 2000. Maternal transmission of adaptive modifications in salt-treated *Sorghum bicolor*: a first stage in ecotypic differentiation?. *New Phytologist* 146: 483-492.

OCHATT S. J., P. L. MARCONI, S. RADICE, P. A. ARNOZIS AND O. H. CASO. 1999. *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 1-8.

ORBOVIC V., M. CALOVIC, Z. VILORIA, B. NIELSEN, F. G. GMITTER JR., W. S. CASTLE AND J. W. GROSSER. 2008. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161: 329-335.

OZIAS-AKINS P., Y. AKIYAMA AND W. W. HANNA. 2003. Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. *Functional and Integrative Genomics* 3: 94-104.

OZIAS-AKINS P. 2006. Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 199-214.

PALOMBI M. A., B. LOMBARDO AND E. CABONI. 2007. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraeaster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis

and somaclonal variation analysis by RAPD markers. Plant Cell Reports 26: 489-496.

PATADE V. Y. AND P. SUPRASANNA. 2008. Radiation induced *in vitro* mutagenesis for sugarcane improvement. Sugar Tech 10: (1): 14-19.

PATHIRANA R., W. A. WIJITHAWARNA, K. JAGODA AND A. L. RANAWAKA. 2002. Selection of rice for iron toxicity tolerance through irradiated caryopsis culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: (1): 83-90.

PEREZ H. 2005. Características de las especies forrajeras adaptadas a las condiciones del Noroeste del país. Forrajes 2005. Seminario técnico. Hotel Holiday Inc. Córdoba. Argentina.

PHONG D. T., L. T. MUOI AND L. T. BINH. 2001. RAPD variability in rice (*Oryza sativa* L.) plants derived from desiccation-tolerant calli. Euphytica 121: 297-303.

PIAGNANI M. C., D. MAFFI, M. ROSSONI AND R. CHIOZZOTTO. 2008. Morphological and physiological behavior of sweet cherry 'somaclone' HS plants in field. Euphytica 160: 165-173.

POLANCO C. AND M. L. RUIZ. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. Plant Science 162: 817-824.

PRADO M. J., M. V. GONZALEZ, S. ROMO AND M. T. HERRERA. 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. Plant Cell Tissue Organ Culture 88: 1-10.

PREDIERI S. AND R. H. ZIMMERMAN. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. Euphytica 117: 217-227.

RAIMONDI J. P., R. W. MASUELLI AND E. L. CAMADRO. 2001. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. Scientia Horticulturae 90: 19-29.

RAMPINO P., S. PATALEO, C. GERARDI, G. MITA AND C. PERROTTA. 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant, Cell and Environment 29: 2143-2152.

RAVINDRA N. S., R. N. KULKARNI, M. C. GAYATHRI AND S. RAMESH. 2004. Somaclonal variation for some morphological traits, herb yield, essential oil content and essential oil composition in an Indian cultivar of rose-scented geranium. Plant Breeding 123: 84-86.

REARTES D. 2004. Situación de la ganadería argentina. En INTA expone 2004 en la pampa húmeda. En la página web [http:](http://)

//www.inta.gov.ar/balcarce/noticias/inta_expone/AuditorioCarlosLSaubidet/SituacG
anad.pdf. Consulta 18/08/2006

REARTES D. 2007. Situación de la ganadería argentina en el contexto mundial. En páginaweb:

<http://www.inta.gov.ar/balcarce/carnes/SituacGanad2007.pdf>. Consulta 10/10/2008

REKHA K. AND A. LANGER. 2007. Induction and assessment of morpho-biochemical mutants in *Artemisia pallens* Bess. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 437-443.

ROCHA LATADO R., A. H. ADAMES AND A. TULMANN NETO. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 103-106.

ROSS A. H., J. M. MANNERS AND R. G. BIRCH. 1995. Embryogenic callus production, plant regeneration and transient gene expression following particle bombardment in the pasture grass, *Cenchrus ciliaris* (Gramineae). Australian Journal of Botany 43: (2): 193-199.

ROY B. AND A. B. MANDAL. 2005. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation. Euphytica 145: 221-227.

SAIRAM R. K. AND A. TYAGI. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science 86: (3): 407-421.

SAJID AQEEL AHMAD M., F. JAVED AND M. ASHRAF. 2007. Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Journal of Plant Growth Regulation 53: 53-63.

SALEEM M. Y., Z. MUKHTAR, A. A. CHEEMA AND B. M. ATTA. 2005. Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). International Journal of Environmental Science and Technology 2: (2): 141-145.

SALEM H. H., B. ALI, T. HUANG, D. QIN, X. WANG AND Q. XIE. 2007. Use of Random Amplified Polymorphic DNA analysis for economically important food crops. Journal of Integrative Plant Biology 49: (12): 1670-1680.

SAMANTARAY S., G. R. ROUT AND P. DAS. 1999. *In vitro* selection and regeneration of zinc tolerant calli from *Setaria italica* L. Plant Science 143: 201-209.

SEKI M., T. UMEZAWA, K. URANO AND K. SHINOZAKI. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 296-302.

SHARMA T. R. AND S. JANA. 2002. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation in *Fagopyrum tataricum* Gaertn. accessions from China and the Himalayan region. *Euphytica* 127: 327-333.

SHATERIAN J., D. R. WATERER, H. DE JONG AND K. K. TANINO. 2008. Methodologies and Traits for Evaluating the Salt Tolerance in Diploid Potato Clones. *American Journal of Potato Research* 85: 93-100.

SHERWOOD R. T., C. C. BERG AND B. A. YOUNG. 1994. Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Science* 34: 1490-1494.

SHIBLI R. A., M. KUSHAD, G. G. YOUSEF AND M. A. LILA. 2007. Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Journal of Plant Growth Regulation* 51: 159-169.

SINGH M., B. L. BURSON AND S. A. FINLAYSON. 2007. Isolation of candidate genes for apomictic development in Buffel grass (*Pennisetum ciliare*) *Plant Molecular Biology* 64: 673-682.

SKERMAN P. J., CAMERON D. G. AND F. RIVEROS. 1992. Gramíneas Tropicales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Colección de la FAO: Producción y protección vegetal Nº12. pp 707.

SNYDER L. A., A. R. HERNANDEZ AND H. E. WARMKE. 1955. The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. *Botanical Gazette* 116: 209-221.

SPANGENBERG G. 2004. Mejoramiento de plantas forrajeras en la era genómica. En *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*. VIII. Capítulo 2. Editorial INTA.

SREENIVASULU N., S. K. SOPORY AND P. B. KAVI KISHOR. 2007. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene* 388: 1-13.

TEWARY P. K., A. SHARMA, M. K. RAGHUNATH AND A. SARKAR. 2000. *In vitro* response of promising mulberry (*Morus* sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 17-21.

TEXEIRA J., S. PEREIRA, F. QUEIROS AND F. FIDALGO. 2006. Specific roles of potato glutamine synthetase isoenzymes in callus tissue grown under salinity: molecular and biochemical responses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 1-7.

UMEZAKA T., M. FUJITA, Y. FUJITA, K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI AND K. SHINOZAK. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 113-122.

VAGERA J., J. NOVOTNY AND L. OHNOUTKOVA. 2004. Induced androgenesis *in vitro* in mutated populations of barley, *Hordeum Vulgare*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 55-61.

VARSHNEY R. K., A. GRANER AND M. E. SORRELLS. 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science* 10: (12): 621-630.

VARSHNEY R. K., D. A. HOISINGTON AND A. K. TYAGI. 2006. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends in Biotechnology* 24: (11): 490-499.

VERLUES P. E., M. AGARWAL, S. KATIYAR-AGARWAL, J. ZHU AND J-K. ZHU. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45: 523-539.

VINOCUR B. AND A. ALTMAN. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.

VOS P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. V. DE LEE, M. HONES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER AND M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: (21): 4407-4414.

WANG Y., F. WANG, H. ZHAI AND Q. LIU. 2007. Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. *Scientia Horticulturae* 111: 173-178.

WAUGH R., D. J. LEADER, N. MCCALLUM AND D. CALDWELL. 2006. Harvesting the potential of induced biological diversity. *Trends in Plant Science* 11: (2): 71-79.

WITJAKSONO AND R. E. LITZ. 2004. Effect of gamma irradiation on embryogenic avocado cultures and somatic embryo development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 139-147.

WILLIAMS J. G., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, L. A. RAFALSKI AND S. V. TINGEY. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

WU D., Q. SHU, Z. WANG AND Y. XIA. 2002. Effect of gamma irradiation on starch viscosity and physicochemical properties of different rice. *Radiation Physics and Chemistry* 65: 79-86.

XIONG L. AND J.-K. ZHU. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 131-139.

XIONG L., K. S. SCHUMAKER AND J.-K. ZHU. 2002. Cell Signaling during Cold, Drought and Salt Stress. *The Plant Cell* 165-183.

YAMAGUCHI T. AND E. BLUMWALD. 2005. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science* 10: (12): 615-620.

ZAIR I., A. CHLYAH, K. SABOUNJI, M. TITTAHSEN AND H. CHLYAH. 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 237-244.

ZHANG J., H. T. NGUYEN AND A. BLUM. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plant. *Journal of Experimental Botany* 50: (332): 291-302.

ZHANG Y., M. A. R. MIAN AND J. H. BOUTON. 2006. Recent molecular and genomic studies on stress tolerance of forage and turf grasses. *Crop Science* 46: 497-511.