

**AVANCES DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS
GENÉTICOS EN EL CONO SUR**

PRESENTACIÓN

El Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur – PROCISUR, creado en 1980 con el apoyo del Banco Interamericano de Desarrollo – BID, constituye un esfuerzo conjunto de los Institutos Nacionales de Investigación Agropecuaria – INIAs de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura – IICA.

La preocupación por los recursos genéticos de la región ha estado presente desde la creación de PROCISUR utilizando a través de este tiempo distintos mecanismos para apoyar la cooperación regional. Actualmente cuenta con una organización en red (Red de Recursos Genéticos del Cono Sur- REGENSUR) en la que participan y articulan los principales actores e instituciones vinculadas a la conservación y utilización del material genético, constituyendo un capital de alto valor para el presente y futuro del desarrollo agrícola de la región.

En ese contexto, PROCISUR ha estimulado y apoyado la realización de esta publicación sobre “Avances de Investigación en Recursos Genéticos de los Países del Cono Sur”.

Esta segunda publicación de PROCISUR sobre investigación en recursos genéticos pretende recoger un conjunto de trabajos de investigación relevantes para la región abarcando los últimos 5 años, período en cierto modo coincidente desde la creación la red REGENSUR. Se seleccionaron un total de 20 contribuciones en Recursos Genéticos (12 de investigación y 8 comunicaciones) que representan el laborioso trabajo de 70 investigadores, principalmente provenientes de los Institutos de Investigación vinculados a PROCISUR, pero también a varias Universidades y otras organizaciones públicas y privadas de la región.

Con esta publicación PROCISUR desea subrayar la importancia y su compromiso con los recursos genéticos, que son la materia prima indispensable para satisfacer la creciente demanda de alimento de la humanidad, promoviendo su conservación y aprovechamiento racional que garantice la mantención de la biodiversidad para las generaciones futuras.

Emilio Ruz
Secretario Ejecutivo
PROCISUR

PRÓLOGO

El objetivo general de la Red de Recursos Genéticos de PROCISUR, REGENSUR, es promover el fortalecimiento de la capacidad técnica y operativa de las instituciones de los países miembros de la red con el fin de conservar, enriquecer, valorar, identificar, caracterizar y utilizar los recursos genéticos para asegurar la disponibilidad de germoplasma e información.

Entre sus objetivos específicos figura disponer de un ámbito de discusión de temas de interés común y divulgar los avances de investigación obtenidos en los países miembros de la red como forma de dar a conocer los trabajos que se realizan en los países en el área de los recursos genéticos.

El disponer de un ámbito regional donde los investigadores relacionados a la disciplina puedan periódicamente volcar el resultado de sus investigaciones permitirá también cumplir el objetivo de identificar y relacionar equipos de investigadores, tanto de los países del Cono Sur entre si como extraregionales, así como colaborar en divulgar a la comunidad científica las capacidades de la región en investigación y desarrollo de un área estratégica como la de los recursos genéticos.

Ésta es la segunda entrega de la Serie Avances de Investigación en Recursos Genéticos de los países del Cono Sur, incluyendo por una parte, Artículos Técnicos organizados en estructura formal, y por otra Comunicaciones e Informes de avances en diferentes temas. Interesa resaltar la presentación de investigación y experiencias en el desarrollo de especies promisorias, como posibles elementos diversificadores en los sistemas productivos de los países de la región. Se dan a conocer también, nuevos proyectos en marcha, donde la REGENSUR tiene como responsabilidad los módulos de recursos genéticos.

Los Coordinadores Nacionales de la REGENSUR nombraron un Equipo Editor encargado de la corrección y edición preliminar de la publicación, integrado por los Ing. Agr. Andrea Clausen, Federico Condón y Ana Berretta.

Ana Berretta
Referente Regional
REGENSUR

Artículos Técnicos

COLECTA Y EVALUACIÓN INICIAL DE POBLACIONES DE AGROPIRO ALARGADO NATURALIZADAS EN LA REGIÓN PAMPEANA ARGENTINA.

Alonso, S.I.¹ y Borrajo, C.I.²

1. RESUMEN

El agropiro alargado es una forrajera tolerante a diferentes situaciones de estrés, que se halla naturalizada en diferentes ambientes de la región pampeana de la Argentina. Ese germoplasma podría ser de utilidad en la obtención de cultivares, por lo que se colectaron poblaciones naturalizadas en la región pampeana y parte de ellas fue posteriormente sometida a evaluación inicial. Se colectaron 50 poblaciones, la mayoría de ellas se desarrollaban a orillas de los caminos, tanto en banquetas altas como, intermedias e inundables.

El cultivar El Vizcachero INTA y 21 poblaciones se cultivaron en un ensayo en el campo, con tres bloques y siete plantas aisladas por bloque, a fin de registrar varios caracteres cualitativos y cuantitativos. Se detectaron diferencias fenotípicas entre entradas ($p < 0,05$) para porte, color de follaje, tamaño foliar, altura de las plantas, número de macollos totales y reproductivos, sanidad y ciclo a floración. Las entradas no difirieron en índice de floración, ni en características de las espigas. La variabilidad encontrada posibilitaría el empleo de algunas poblaciones en planes de mejoramiento de esta forrajera.

Palabras claves: *Thinopyrum ponticum*, germoplasma, hábito de crecimiento, color del follaje, altura, macollaje, floración, espiguillas, tamaño foliar.

2. INTRODUCCIÓN

En la región pampeana de la Argentina, se encuentra una zona de aproximadamente 10 millones de hectáreas denominada Pampa Deprimida o Inundable, conformada por la Depresión de Laprida y la Depresión del Salado (Musto y Maddaloni, 2001). Abarca la zona centro oriental de la provincia de Buenos Aires, la que presenta topografía plana y suelos en su mayoría de tipo intrazonal, con problemas de halo-hidromorfismo, drenaje deficiente y lento escurrimiento, especialmente en aquellos ubicados en las zonas bajas e intermedias del relieve (Vervoorst, 1967; Lavado y Taboada, 1985; Musto y Maddaloni, 2001). Las características edáficas mencionadas, sumadas al alto contenido de sales superficiales, limitan las actividades productivas de esa zona principalmente a la cría de ganado vacuno. Los pastizales naturales constituyen el principal recurso forrajero en esa zona, pero ante la marcada estacionalidad y escasa productividad de los mismos, se recurre a la implantación de forrajeras exóticas adaptadas a ambientes con limitaciones para el crecimiento vegetal (Cauhépé, 1994; Fernández Grecco, 1999). Entre estas especies, *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkw. & Dewey (= *Elytrigia pontica* Podp.) forrajera comúnmente conocida como agropiro alargado, es recomendada como adecuada para su cultivo en suelos intermedios y alcalinos de la Pampa Deprimida (Cauhépé, 1994), ya que se destaca por su tolerancia a la salinidad y la alcalinidad, a la sequía y al anegamiento temporario, a las bajas temperaturas invernales y a las altas temperaturas estivales de la región y, porque produce forraje desde primavera a otoño (Johnson, 1991; Mazzanti *et al.*, 1992; Ferrari y Maddaloni, 2001).

El agropiro alargado es una forrajera perenne, de ciclo primaveral tardío, originaria de la región Mediterránea occidental, la Península Balcánica y Asia Menor, que fue introducida en la Argentina a mediados del siglo pasado y se ha naturalizado en diferentes ambientes de la provincia de Buenos Aires y de otras provincias argentinas (Covas, 1985; Mazzanti *et al.*, 1992). A pesar de la importancia de esta especie, en la Argentina no se ha realizado un esfuerzo importante en la obtención de nuevas variedades que mejoren algunos aspectos deficitarios de los cultivares existentes, relacionados con la velocidad de implantación, la producción temprana de forraje y la calidad de la materia seca en floración.

El desarrollo de una especie exótica en ambientes nuevos y diversos, como los de la región pampeana de la Argentina, puede generar poblaciones adaptadas a diferentes situaciones y que presenten características

¹ Unidad Integrada: Facultad de Ciencias Agrarias, Univ. Nac. Mar del Plata / Est. Exp. Agrop. Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. salonso@balcarce.inta.gov.ar

² Est. Exo. Agrop. Mercedes, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ciborrajo@yahoo.com

particulares, como ya fuera observado en *Lolium multiflorum* (Alonso 2004). El germoplasma forrajero adaptado a la situación problema resulta de especial interés y valor en el mejoramiento genético, pero previo a su utilización, debe atravesar sucesivas etapas de evaluación, desde caracterización y evaluación inicial en invernáculo o a campo como plantas aisladas, a ensayos comparativos de rendimiento y ensayos de pastoreo (Tyler *et al.*, 1987). En el Banco de Germoplasma BAL, de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA, en Balcarce (E.E.A.B.), se iniciaron actividades de colección y evaluación de especies forrajeras nativas y naturalizadas de la región pampeana, a fin de posibilitar su utilización en el desarrollo de cultivares. El presente trabajo tiene como objetivo presentar las actividades de colección de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado y la evaluación inicial de las mismas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colección

Se efectuaron viajes de colecta de germoplasma de agropiro en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina, algunos de tipo específico y otros poliespecíficos, en el marco de colectas de forrajeras templadas. Los viajes se realizaron a principios del otoño, en diferentes años, siguiendo tanto las rutas principales como las secundarias, fundamentalmente de la zona centro-oeste bonaerense.

En cada viaje, los sitios de colecta se establecieron cada 50km y en cada uno de ellos en los que se encontraba una población de agropiro, se cosechó una espiga de cada uno de 100 individuos seleccionados al azar (Hawkes, 1976). Además se obtuvo y herborizó un ejemplar de referencia de la población y se registraron las características del sitio y de la flora acompañante. Las semillas se mantuvieron en bolsas de papel poroso hasta su llegada al Banco de Germoplasma de la E.E.A.B., INTA y los ejemplares de herbario se incorporaron al Herbario BAL. Una vez trilladas las espigas, se determinó el poder germinativo de las semillas (ISTA, 1993), las que se conservaron como semilla original en una cámara de conservación a 4°C, en bolsas trilaminadas de cerrado hermético.

3.2. Evaluación de Poblaciones

En la localidad de Balcarce (37°45' Lat. S, 58°16' Long. O) se evaluaron 22 entradas de germoplasma; las primeras 21 poblaciones naturalizadas incluidas en el **Cuadro 1** y el cultivar de mayor difusión en la zona (El Vizcachero INTA), utilizado como testigo. A principios de otoño se sembraron 50 semillas de cada población, a razón de una semilla por maceta, para lo cual se emplearon macetas plásticas de 0,5l, conteniendo suelo del horizonte superficial de un Argiudol típico. Las plántulas emergidas se mantuvieron en una jaula antiáfidos hasta inicios de agosto, momento en que fueron trasplantadas en un ensayo en el campo, sobre un suelo de similares características al empleado en las macetas (pH=6,7; Materia orgánica =6%; Conductividad Eléctrica=0,87dS/m; Fósforo=15,6mg/kg; Nitrógeno 45mg/kg N-NO₃). El ensayo se estableció según un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones y 22 entradas de germoplasma (**Cuadro 1**); la unidad experimental correspondió a una hilera de siete plantas por entrada, aisladas entre sí y entre hileras por 70cm. Cada planta fue evaluada tanto en la etapa vegetativa como en la reproductiva, registrándose las siguientes variables:

1- Hábito de crecimiento o porte de las plantas previo a floración, con tres categorías: E=erecto, cuando el ángulo establecido por los macollos y la perpendicular a la superficie del suelo no superaba los 5°; S=semi-erecto, con un ángulo entre 5 y 15°; Aabierto, con un ángulo superior a 15°.

2- Color del follaje, a) cualitativamente por apreciación visual sobre todas las plantas, considerando tres categorías: V=verde; VG=verde glauco; G=muy glauco; b) cuantitativamente a través del Índice de verdor (IVe), mediante un lector Minolta SPAD 502^f, cuyas lecturas, expresadas en unidades SPAD (Soil and Plant Analisis Development), permiten obtener una estimación de la cantidad de clorofila extractable de las hojas (Dwyer; Tollenaar y Houwing, 1991) e indirectamente, del color de las mismas. Las lecturas se efectuaron sobre una hoja por planta, en 30 plantas de cada categoría de color previamente clasificada visualmente.

3- Tamaño foliar, a través del registro de la longitud total de la lámina (L, cm) y el ancho foliar a 1cm de la lígula (An, mm), en tres hojas por planta, en siete plantas por parcela y en tres momentos o etapas (en floración en el primer año (1^of) y en el segundo año durante el estado vegetativo (2^ov) y en floración (2^of)).

4- Altura máxima de las plantas en floración (Al, cm), desde el nivel del suelo al extremo de la inflorescencia más alta, durante dos años consecutivos.

5- Número de macollos totales por planta en cuatro fechas, la inicial (MT1), se efectuó al momento del trasplante y las posteriores cada 50 (± 5) días (MT2 a MT4); se consideró macollo al renuevo con al menos tres hojas visibles.

6- Número de macollos en estado reproductivo (MR), en la fecha correspondiente a MT4; se consideró MR al macollo con la espiga visible.

7- Floración, a) Número de plantas en flor por población al 1° de diciembre, con dos categorías (Tempranas=plantas en flor al 1° de diciembre y Tardías=plantas florecidas posteriormente); b) Velocidad de floración, establecido como $V = 1/\text{Índice de floración (Iflor)}$, donde $\text{Iflor} = \sum ((Pf_{f_i} - Pf_{f_{i-1}}) * d_i) / N^{\circ}TPf$ para: Pf plantas en flor; $N^{\circ}T$ =número total; f_i =iésima fecha de observación; d_i =días desde inicio de floración hasta la fecha f_i .

8- Caracteres de la espiga, a) Número de espiguillas por espiga (NE) y b) Longitud de la espiga (LE, cm), en marzo, sobre cinco espigas por planta y en cinco plantas por parcela.

9- Sanidad en floración, sobre el follaje de cada planta se registró la incidencia de roya (*Puccinia* spp), considerando como tal a la aparición de las lesiones características e indicativas del patógeno. Se consideraron tres categorías: 1-sana (ausencia de roya o presencia afectando menos del 25% del follaje); 2-afección media (roya apreciable en el 25 al 50% de las hojas); 3-afectada (roya en más del 50% del follaje).

Las variables cualitativas porte, color, sanidad y floración se analizaron a través de tablas de contingencia empleándose la prueba de homogeneidad de proporciones, X^2 (Conover, 1971) a fin de determinar si las poblaciones diferían entre sí ($\alpha=0,05$), en cuanto al número de plantas pertenecientes a la categoría más común que presentaba cada población. En las variables Ive, Iflor, MT1 a MT4, MR, NE y LE los datos por planta se promediaron a nivel de unidad experimental y se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) según un diseño en bloques completos aleatorizados (Steel y Torrie, 1980). Para las variables L, An y Al se efectuó un ANOVA con todos los datos, considerando un diseño en bloques completos con arreglo en parcelas divididas, donde la parcela principal correspondió a momentos de registro (etapas o años) y la subparcela a las entradas, con las plantas anidadas en entradas y las hojas anidadas en las plantas; al detectarse interacción momento x entradas significativa ($p < 0,05$), se procedió a ejecutar un ANOVA para cada etapa.

En todas las variables las comparaciones de medias de tratamientos se realizaron por el método de la mínima diferencia significativa (DMS), (Montgomery, 1991) y los análisis estadísticos se efectuaron mediante el paquete estadístico SAS (2001).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Colección

Se colectó semilla de 50 poblaciones naturalizadas en las provincias de Buenos Aires y La Pampa (LP) (**Cuadro 1**), que se desarrollaban en sitios correspondientes a 12 diferentes distritos agroclimáticos. El 10 % de las poblaciones fue obtenido de campos naturales y el resto se desarrollaba al borde de los caminos. En este último caso, la población se desarrollaba tanto en banquinas planas no inundables (42%), como en banquinas con concavidades leves o intermedias proclives a permanecer anegadas en algún período del año (24%) o con depresiones profundas, por lo que el anegamiento era frecuente y generalmente abarcaba períodos extensos en el año (24%). En las banquinas altas, las especies acompañantes de mayor abundancia resultaron similares entre sitios y en general predominaban las gramíneas perennes. En las banquinas intermedias e inundables la vegetación acompañante fue variable, dependiendo principalmente de la salinidad del suelo, e incluyó especies monocotiledóneas y dicotiledóneas en similar proporción.

De cada población se colectó semilla y se herborizó un ejemplar representativo de la misma; los ejemplares de herbario se depositaron en el Herbario BAL y las semillas en el Banco de Germoplasma de

la E.E.A.B. (INTA). La viabilidad de las semillas originales osciló entre 37 y 99%, aunque 39 de las 50 entradas presentaron un poder germinativo superior al 85% y sólo en seis casos el poder germinativo fue inferior al 80%.

Los viajes de colecta permitieron constatar que el agropiro alargado se halla naturalizado en diferentes ambientes de las provincias de Buenos Aires y La Pampa. Las diferentes situaciones climáticas y edáficas en que fue colectada la especie y la viabilidad de sus semillas son indicadores de su adaptación a los ambientes de la región pampeana argentina, lo cual ya fue reportado por varios autores (Covas, 1985; Mazzanti *et al.*, 1992).

Cuadro 1. Colecciones de agropiro alargado, ubicación, ambiente, distrito agroclimático de los sitios (DAC), poder germinativo de las semillas colectadas (PG) y poblaciones evaluadas (Pob. Eval).

Colección (§)	Localidad más próxima	Latitud-Longitud	Ambiente (#)	DAC (*)	PG (%)	Pob. Eval.
Alo + Cla 376	Vidal	37° 20'S - 57° 50'O	B. alta. Graminosa	88	95	1
Cla + Alo 406	Chascomús	35° 25'S - 58° 15'O	B.inund. salina	64	95	2
Cla + Alo 417	S.M. del Monte	35° 30'S - 59° 05'O	B. intermedia	64	90	3
Cla + Alo 422	Las Flores	36° 02'S - 59° 07'O	B. inundable, salina	64	88	4
Cla + Alo 440	Belgrano	35° 40'S - 58° 50'O	B. alta	64	85	5
Cla + Alo 441	Belgrano	36° 00'S - 58° 45'O	B intermedia	64	88	6
Cla + Alo 442	Belgrano	36° 20'S - 58° 45'O	B. inundable	64	91	7
Cla + Alo 443	Ayacucho	37° 15'S - 58° 40'O	B. inundable	94	90	8
un + Alo 338	Necochea	38° 30'S - 58° 45'O	B. intermedia	124	82	9
un + Alo 345	Necochea	38° 30'S - 58° 40'O	B. inundable, salina	124	49	10
Un + Alo 349	Energía	38° 20'S - 59° 10'O	B. intermedia	124	88	11
Nu + Alo 355	San Cayetano	38° 20'S - 59° 40'O	B. alta	98	85	12
Nu + Alo 359	G. Chavez	38° 02'S - 60° 05'O	B. intermedia	94	77	13
Nu + Alo 393	Balcarce	37° 55'S - 58° 10'O	B. alta	94	84	14
Alo 1361	Gral Lavalle	36° 30'S - 56° 55'O	B. inundable	97	93	15
Alo 1422	Castelli	35° 12'S - 58° 02'O	B. intermedia	88	99	16
Alo 1419	Magdalena	35° 10'S - 57° 25'O	B. alta, graminosa	88	92	17
Alo 1423	Gral. Guido	36° 30'S - 58° 03'O	B. inundable, salina	88	93	18
Alo 1424	Gral. Pirán	37° 20'S - 57° 45'O	C. natural intermedio	88	92	19
Alo 1426	Balcarce	37° 52'S - 58° 10'O	B. alta, graminosa	94	95	20
Cla + Alo 469	Guaminí	37° 15'S - 60° 25'O	B. alta	70	86	21
Cla + Alo 381	Gral. Pirán	37° 10'S - 58° 05'O	B. inundable, salina	88	80	-
Cla + Alo 383	Gral. Pirán	37° 10'S - 58° 05'O	B.natural, inundable	88	80	-
Cla + Alo 392	Maipú	36° 52'S - 57° 54'O	B. inundable	88	94	-
Cla + Alo 394	Dolores	36° 15'S - 57° 40'O	B. alta, graminosa	88	48	-
Cla + Alo 414	Gral Belgrano	35° 40'S - 58° 45'O	B. alta	64	82	-
Cla + Alo 420	Las Flores	36° 02'S - 59° 07'O	B. intermedia	64	88	-
Cla + Alo 1682	Gral. Cerri	38° 41'S - 60° 25'O	B. intermedia	99	47	-
Nu + Alo 366	Alzaga	37° 55'S - 60° 10'O	B. alta	94	37	-
Nu + Alo 369	Claraz	37° 45'S - 59° 45'O	B. inundable	98	79	-
Cib 9	Gral. Pirán	37° 43'S - 58° 06'O	B. intermedia.	88	93	-
Cib 42	Pila	36° 03'S - 58° 09'O	B. intermedia	88	98	-
Cib 44	Casalins	36° 14'S - 58° 25'O	B. inundable, salina	94	94	-
Cib 55	Ayacucho	37° 07'S - 58° 33'O	B. alta	94	99	-
Cib 57	Rauch	36° 47'S - 59° 06'O	B. alta, graminosa	88	94	-
Cib 64	Azul	36° 50'S - 59° 58'O	B. intermedia	94	92	-
Cib 68	Olavaria	36° 36'S - 60° 38'O	C. bajo.	94	94	-
Cib 74	Daireaux	36° 35'S - 61° 46'O	C. intermedio, salino	70	88	-
Cib 87	Cnel Pringles	37° 58'S - 61° 27'O	B. alta, graminosa	98	94	-

Cib 90	Tres Arroyos	38° 20'S - 60° 15'O	B. alta	98	91	-
Cib 99	Tres Arroyos	37° 45'S - 59° 42'O	C. alto	98	99	-
Ev + Cib60	Gral Acha-LP	37° 18'S - 64° 17'O	B. alta	72A	94	-
Ev + Cib61	Gral Acha-LP	37° 18'S - 64° 17'O	C. natural.	72A	95	-
Ev + Cib 67	J. Araúz (LP)	38° 03'S - 63° 24'O	B. alta	71	96	-
Ev + Cib70	Aparicio	38° 36'S - 60° 40'O	B. alta, graminosa	98	97	-
Ev + Cib75	Energía	38° 31'S - 59° 34'O	B. alta	124	99	-
Alo 1369	Gral. Conesa	36° 10'S - 57° 25'O	B. alta, graminosa	88	88	-
Alo 1421	Chascomús	35° 34'S - 58° 02'O	B. alta, graminosa	64	91	-
Alo 2595	Sta. Rosa-LP	36° 50'S - 64° 05'O	B. alta	47	90	-
Alo 2598	Chacharramendi-LP	37° 40'S - 64° 35'O	B. alta,	72A	94	-

(§): coleccionistas (Alo=Alonso, S.; Cla=Clausen, A.; Cib=Borrajo, C.; Ev=Evans, J.; Nu=Nuciari, M.)

(#) B=banquina, costado de los caminos; C=campo

(*) Regiones Agroecológicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (De Fina, 1993).

4.2. Hábito de crecimiento y color del follaje

Las plantas semierectas resultaron la categoría de hábito de crecimiento más común y las de porte abierto las menos frecuentes (**Cuadro 2**). Las entradas resultaron heterogéneas para porte y difirieron significativamente entre sí ($P<0,05$) en el porcentaje de plantas semierectas que presentaban. La categoría más frecuente de color de follaje por apreciación visual fue verde-glaucoso y la menos abundante la denominada muy glauco (**Cuadro 2**).

Las diferencias en la proporción de plantas con el follaje verde-glaucoso fue diferente entre entradas y si bien algunas de ellas resultaron homogéneas para color, la mayoría presentaron variaciones dentro de entrada. Las plantas de follaje muy glauco fueron las menos abundantes (1%) y la mayoría fue encontrada en entradas procedentes de sitios inundables y salinos (**Cuadros 1 y 2**).

Cuadro 2. Porcentaje de plantas de cada categoría de porte, color y tipo de floración de 22 entradas de germoplasma de agropiro alargado.

Entradas	Porte (#)			Color del follaje (#)			Floración (§)	
	E	S	A	MG	VG	V	Tem	Tar
1	29	67	5	5	85	10	47,6	52,4
2	10	90	0	0	100	0	42,9	57,1
3	10	81	10	0	95	5	9,5	90,5
4	15	85	0	5	85	10	47,6	52,4
5	0	85	15	0	100	0	55,0	45,0
6	29	71	0	0	90	10	28,6	71,4
7	10	75	15	0	95	5	30,0	70,0
8	26	68	5	16	79	5	42,9	57,1
9	5	95	0	0	100	0	33,3	66,7
10	32	68	0	0	84	16	75,0	25,0
11	24	67	10	0	95	5	47,6	52,4
12	25	75	0	0	75	25	38,1	61,9
13	10	86	5	0	100	0	47,6	52,4
14	0	95	5	0	81	19	52,4	47,6
15	19	81	0	0	95	5	23,8	76,2
16	30	70	0	0	100	0	75,0	25,0
17	33	62	5	0	81	19	55,0	45,0
18	14	81	5	5	95	0	52,4	47,6
19	0	90	10	0	100	0	38,1	61,9
20	5	85	10	0	100	0	60,0	40,0
21	29	71	0	0	100	0	66,7	33,3
Cv	14	86	0	0	100	0	14,3	85,7
Promedio	17	79	4	1	93	6	44,7	55,3

(#) Adaptado de Borrajo *et al.*, 1997; (§) Adaptado de Borrajo *et al.*, 1998). Porte (A=abierto; S=semierecto;

E=erecto); color (V=verde; VG=verde glauco; MG=muy glauco); tipo de floración (Tem=tempranas; Tar=tardías)

Las plantas de follaje muy glauco y verde-glaucoso presentaron un índice de verdor significativamente mayor al de las plantas de follaje verde ($P<0.0001$) alcanzando un promedio de 40,5, 39,9 y 35 unidades

SPAD, respectivamente. Las hojas verdes resultaron más claras que las de las otras dos categorías, las cuales no pudieron diferenciarse mediante este método cuantitativo de determinación de color.

El germoplasma de agropiro presentó variabilidad en el hábito de crecimiento durante la etapa vegetativa ya que se observaron individuos de tres categorías de porte, siendo los más abundantes los semierectos. Los resultados no coinciden totalmente con los antecedentes ya que las plantas de esta especie son descritas como de porte erecto (Teruel, 1978), categoría presentada sólo por el 17% de las plantas de esta experiencia y no se hace mención a otros tipos de hábito. Las diferencias podrían deberse a que otros autores incluyen a las plantas erectas y semierectas en la misma categoría, o a que las observaciones se efectuaron en diferente estadio. En el presente trabajo se consideró el porte durante la etapa vegetativa y no en la reproductiva, durante la cual la posición erecta de las cañas floríferas tiende a enmascarar la real posición de los macollos y sus hojas durante la etapa de crecimiento foliar.

El follaje de las plantas varió desde verde a muy glauco, resultando la categoría intermedia, verde-glauco, la presentada por la mayoría de las plantas. Lo anterior coincide con las descripciones que le asignan al agropiro un follaje de color verdoso a glauco (Parodi, 1964; Nicora, 1978), tonalidades que fueron presentadas por el 99% de los individuos. La categoría de follaje muy glauco no fue mencionada previamente en forma específica en agropiro, pero sí en especies que crecen en condiciones de estrés (Fahn, 1982) y este tipo de plantas fue encontrado mayoritariamente en las entradas adaptadas a estrés salino. La coloración glauca de las hojas es el resultado de la deposición de una capa cerosa de espesor variable sobre la cutícula, lo que proporciona resistencia a la pérdida de agua y al ataque de patógenos (Fahn, 1982; Valla, 1993), por lo cual el germoplasma con esas características resulta de gran interés en un programa de mejoramiento. El inconveniente es que su determinación mediante apreciación visual es subjetiva y el método del índice de verdor no posibilita diferenciar el follaje muy glauco del solamente verde-glauco y sólo diferenció a las plantas de follaje verde claro de las que tienen capa cerosa cuticular que las torna más azuladas. Además, el grosor de dicha capa es un carácter muy plástico, cuya manifestación depende en gran parte de las condiciones ambientales imperantes al momento de su determinación. En años secos y a principios de la etapa reproductiva es cuando el color muy glauco se torna más evidente, por lo que sería el momento más conveniente para su registro (Alonso, inédito).

4.3. Tamaño foliar

Las entradas no mantuvieron un comportamiento similar a través de las tres épocas de registro de longitud foliar de las plantas (**Figura 1a**), ya que la interacción entre épocas y entradas resultó significativa ($p < 0,05$). Los menores valores de longitud foliar se observaron en el primer registro (1^ºf), con un promedio entre entradas de 36,5cm, mientras que en los registros posteriores la longitud foliar fue mayor y varió entre 46,7cm para las hojas de la etapa 2^ºf y 47,2cm para la 2^ºv. Desde la primera etapa a la segunda, en todas las entradas la longitud foliar incrementó, pero con diferente magnitud o intensidad, mientras que entre la segunda y la tercera etapa los cambios en el comportamiento se evidenciaron tanto a través de variaciones en la intensidad de la respuesta, como en la dirección de la misma, ya que en algunos casos la longitud foliar en 2^ºf fue menor a la de 2^ºv (**Figura 1a**). En cada etapa se detectaron diferencias significativas en longitud foliar entre entradas ($p < 0,01$) y en todas ellas la entrada con hojas más largas fue siempre la población 20, mientras que el cultivar presentó hojas significativamente más cortas que aquella, en las dos etapas del segundo año. El grado de asociación (r^2) entre los registros de las diferentes etapas varió entre 0,44 y 0,75, correspondiendo el mayor valor a la asociación entre épocas del mismo año y el menor a la asociación entre 1^ºf y 2^ºv. Al considerar el promedio de longitud foliar de las tres etapas, se observó una variación entre entradas desde 42,9 a 50,3cm con una media general de 46,7cm; ésta fue superada en valores absolutos por 13 entradas (1, 2, 3, 6, 7, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19 y 20) todas correspondientes a germoplasma naturalizado (**Cuadro 3**).

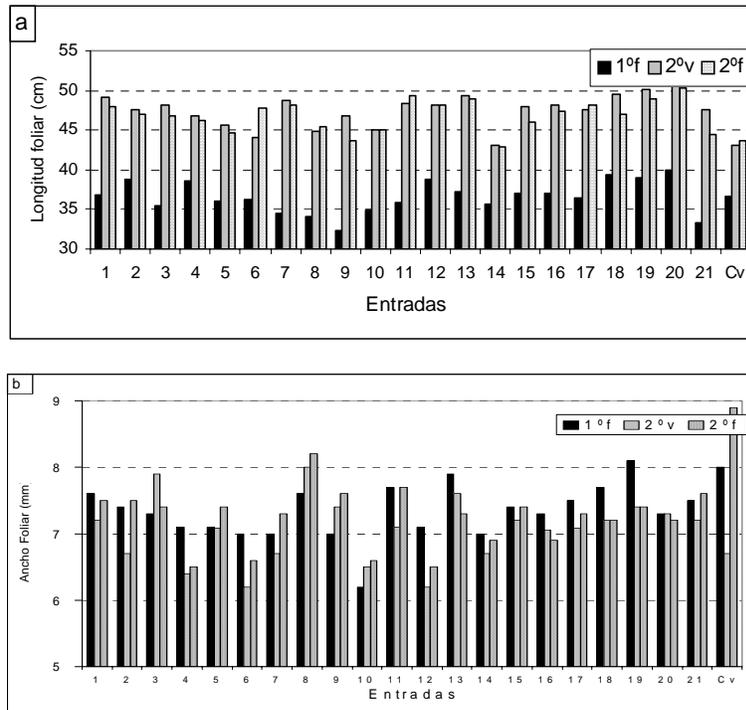


Figura 1: Longitud y ancho foliar promedio para 22 entradas de agropiro alargado, en plantas del primer año en floración (1ºf) y del segundo año en estadio vegetativo (2ºv) y en floración (2ºf).

Cuadro 3: Promedio de longitud foliar, ancho foliar y altura máxima de las tres etapas, y promedio de índice de floración (I. flor), longitud del raquis de la espiga (L. raquis), número de espiguillas por espiga (Espig.) e incidencia de roya (I. roya en el follaje mayor del 25%), en 22 entradas de agropiro alargado.

Entradas	Longitud (cm)	Ancho (mm)	Altura (cm)	I. flor (1/días)	L. raquis (cm) (#)	Espig. (#)	I. roya >25% (% plantas)
1	48,06	7,5	147,9	7,14	22,8	37,5	9,5
2	47,07	7,5	150,5	8,39	23,8	38,6	9,5
3	46,85	7,4	145,3	7,00	21,3	35,9	0
4	46,15	6,5	152,6	9,53	20,9	38,2	14,3
5	44,56	7,4	141,5	6,66	20,5	33,4	9,5
6	47,77	6,6	140,2	8,75	22,2	35,2	4,8
7	48,22	7,3	149,4	6,06	22,3	36,8	9,5
8	45,51	8,2	146,6	6,93	22,0	35,9	19,0
9	43,67	7,6	146,6	5,66	22,9	37,2	4,8
10	45,02	6,6	138,2	7,51	21,8	35,4	4,8
11	49,29	7,7	148,3	7,74	22,0	34,2	14,3
12	48,08	6,5	151,9	6,93	24,0	39,8	4,8
13	48,91	7,3	151,3	6,21	21,3	38,0	0
14	42,95	6,9	138,8	6,90	20,3	33,9	4,8
15	46,05	7,4	151,7	10,36	22,4	37,9	14,3
16	47,39	6,9	155,2	4,48	22,3	37,3	9,5
17	48,09	7,3	143,4	6,19	20,5	33,9	9,5
18	47,02	7,2	154,4	6,91	22,4	35,5	9,5
19	49,02	7,4	146,4	6,02	20,9	35,2	0
20	50,38	7,2	153,3	4,3	21,9	36,6	33,3
21	44,51	7,6	138,2	6,78	20,4	32,5	9,5
Cv	43,72	8,9	149,2	7,89	19,2	32,2	9,5
Promedio	46,7	7,3	147,3	7,02	21,7	36,0	9,3

(#)Adaptado de Borrajo *et al.*, 1998.

El ancho foliar tampoco mantuvo un comportamiento similar entre las entradas a través de las tres épocas de registro (**Figura 1b**). En algunas entradas el mayor registro para ancho foliar fue obtenido en 1^ºf mientras que en otras fue en 2^ºv o 2^ºf y la interacción etapas x entradas se debió tanto a cambios en magnitud como en dirección de la respuesta, los que involucraron a las tres etapas y se tornaron más evidentes con el comportamiento del cultivar. El ancho foliar promedio presentó escasa variación entre etapas (7 a 7,3mm), mientras que el promedio general de cada entrada varió entre 6,5 y 8,9mm (**Cuadro 3**). En las etapas 1^ºf y 2^ºv se observaron diferencias significativas entre entradas ($p < 0,05$), no así para 2^ºf, a pesar de que los registros variaron considerablemente entre entradas (**Figura 1b**). Es probable que debido al elevado error experimental, las diferencias entre entradas no hayan podido detectarse en esa etapa, lo cual se sustenta en el mayor coeficiente de variación detectado (39,5%), en relación al observado en las etapas anteriores (18 y 30%). En la etapa 1^ºf la población 19 y el cultivar presentaron mayor ancho foliar, aunque este último sólo difirió significativamente de 7 entradas, mientras que en la etapa 2^ºv, el mayor registro lo mostró la población 8, la que superó en ancho al cultivar y a otras 11 entradas (**Figura 1b**). El grado de asociación del ancho foliar entre etapas osciló entre 0,47 entre 1^ºf y 2^ºv y 0,62 entre 2^ºv y 2^ºf. En base al promedio general por entrada (**Cuadro 3**), las hojas de 14 de materiales superaron o igualaron en ancho foliar, en valores absolutos, al promedio general del ensayo (7,3mm) y de ellas el mayor promedio fue presentado por el cultivar. La asociación entre etapas siempre fue más alta al comparar registros de longitud que de ancho foliar; ello puede deberse a la menor precisión con que esta variable suele ser registrada (Coef. Var.=39%), lo que también fue observado en hojas de *Lolium multiflorum* (Alonso, 2004).

La longitud de las plantas del primer año de registro fue menor que la de las plantas del segundo año, independientemente del estadio analizado y, tanto para longitud como para ancho foliar, la correlación entre etapas fue siempre mayor al comparar las correspondientes al mismo año que entre años o estadios.

La temperatura media en los meses previos al registro de longitud y ancho foliar (julio a noviembre) fueron similares en ambos años, no así las precipitaciones que fueron menores en el primer año, manifestándose una acentuada sequía primaveral. Las diferencias entre etapas podrían deberse a las diferencias en el régimen pluviométrico, dado que los menores tamaños foliares se observaron en el año más seco. Además, para un mismo año, las diferencias se deberían al diferente estadio de la planta en que se efectuaron los registros. Queda así en evidencia la influencia del ambiente y la etapa de crecimiento de las plantas en la expresión de la longitud y el ancho foliar, lo que resulta de gran importancia y debe tenerse presente al efectuar comparaciones entre experiencias.

El germoplasma naturalizado presentó variabilidad tanto en ancho como en longitud foliar y algunas poblaciones presentaron mayor longitud foliar que el cultivar de mayor difusión. La longitud y el ancho foliar determinan el área de la lámina, variable altamente asociada con la producción de materia seca (Chapman y Lemaire, 1993), por lo que los materiales con mayores registros en estas variables serían los más promisorios para incorporar a un programa de mejoramiento. Sin embargo, al considerar la superficie laminar, estimada a través de sus componentes como $\text{Área foliar} = \frac{1}{2} \text{Longitud} \times \text{Ancho}$, el área promedio entre entradas varió entre 28,6 y 38,9cm²lámina⁻¹ y el mayor valor le correspondió al cultivar. Esto también fue observado en otras especies al comparar materiales silvestres y cultivares (Breese y Tyler, 1986; Alonso, 2004) y se debe a que el tamaño foliar es una de las características por las que tradicionalmente se selecciona a los materiales forrajeros.

4.4. Altura de las plantas

La altura máxima de las plantas presentó interacción significativa entre años y entradas ($p < 0,05$). Todas las entradas presentaron menor altura durante el primer año de registro (138,1cm) y la interacción detectada se debió a que en el segundo año las entradas incrementaron la altura máxima en diferente magnitud, siendo el promedio de ese año de 156,5cm. La mayor altura fue presentada por la entrada 16 y la menor por la población 10 y la 21 (**Cuadro 3**), mientras que la altura del cultivar superó a la media general. La altura promedio de las entradas y del cultivar se mantuvo dentro del amplio rango señalado por otros autores (Parodi, 1964; Nicora, 1978) quienes asignan a las plantas de agropiro una altura entre 70 y 180cm. Sin embargo, en las entradas analizadas se observó un rango de alturas más estrecho, si se considera la altura promedio de las entradas. El rango se amplía si se consideran los valores a nivel de planta, ya que en este trabajo se observaron individuos de altura comprendida entre los 101 y los 205cm,

lo que establece con mayor claridad la existencia de variabilidad fenotípica para altura a floración en las entradas de agropiro naturalizadas en la región pampeana de la Argentina.

4.5. Número de macollos

4.5.1. Macollos totales

El número de macollos totales difirió significativamente entre entradas ($P \leq 0,05$) en todas las fechas (**Figura 2**). Al trasplante, las entradas presentaron un promedio de 3,5 macollos por planta (MT1), valor que aumentó en las siguientes fechas, alcanzando promedios de 33,2 en MT2, 52,3 en MT3 y 87,2 macollos por planta en MT4. En todos los casos, la población 12 presentó el mayor número de macollos totales, aunque no difirió significativamente de 7 poblaciones en MT1, de 3 en MT2, de 5 en MT3 y de 15 en MT4 (**Figura 2**). Al considerar todas las fechas se observó que la población 15 no difirió significativamente de la población 12 en ninguna fecha ($P \geq 0,05$) y las poblaciones 6 y 8 sólo lo hicieron en una de las cuatro fechas. Por el contrario, las poblaciones 3, 4, 9, 13, 21 y el cultivar, siempre presentaron los menores registros en las cuatro fechas y siempre difirieron de las entradas 12, 15, 6 y 8.

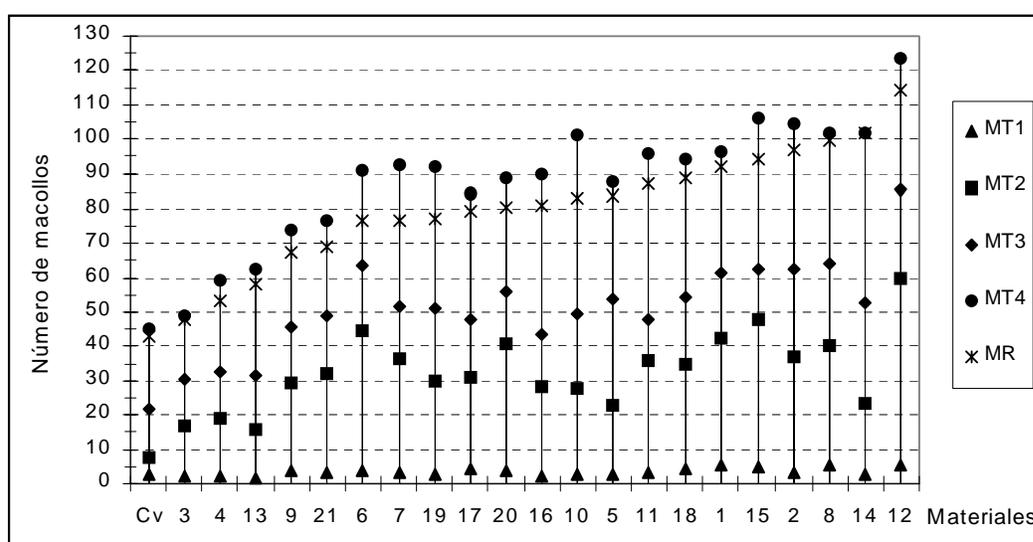


Figura 2: Número de macollos totales en cuatro fechas (MT1, MT2, MT3 y MT4) y de macollos reproductivos (MR) en un cultivar y 21 poblaciones naturalizadas de agropiro alargado.

Las entradas de agropiro presentaron variabilidad en el número de macollos a lo largo de los estadios de crecimiento vegetativo y de elongación del tallo. Las diferencias se evidenciaron desde la etapa juvenil y se acrecentaron hacia el final de la etapa vegetativa e inicios de elongación. Las entradas con mayor o menor número de macollos iniciales mantuvieron esta característica a lo largo del período vegetativo y parte del reproductivo, resultando un carácter interesante para realizar evaluaciones tempranas, dada la estrecha relación entre número de macollos y producción de forraje (Chapman y Lemaire, 1993). La mayoría de las entradas correspondientes a poblaciones naturalizadas presentaron mayor número de macollos que el cultivar, comportamiento considerado como una respuesta adaptativa frente a la selección natural que ocurre frecuentemente en poblaciones silvestres sometidas a pastoreo frecuente (Breese y Tyler, 1986). Un comportamiento inverso ha sido observado en materiales mejorados, donde la selección por tamaño foliar puede conducir a la obtención de plantas con bajo número de macollos (Nelson y Sleeper, 1983; Alonso, 2004). Por ese motivo es que todas estas variables deban ser consideradas conjuntamente al seleccionar germoplasma promisorio para obtener un cultivar de alta producción de forraje.

En la **Figura 3** se presenta la relación entre la estimación de área foliar de las entradas y el número de macollos en la cuarta fecha (MT4), en la que se observa que las entradas presentan variadas combinaciones de tamaño foliar y densidad de macollos por planta. Algunas poblaciones naturalizadas presentan hojas chicas combinadas con baja (entrada 4) o alta densidad de macollos (entradas 10 y 14) y

otras como la 2, la 8 y la 11 presentan hojas de mayor área y alta densidad de macollos. Por otro lado, el cultivar se presenta con una combinación particular de hojas grandes y pocos macollos, características frecuentes en materiales surgidos de un proceso de selección por tamaño foliar (Breese y Tyler, 1983; Alonso, 2004).

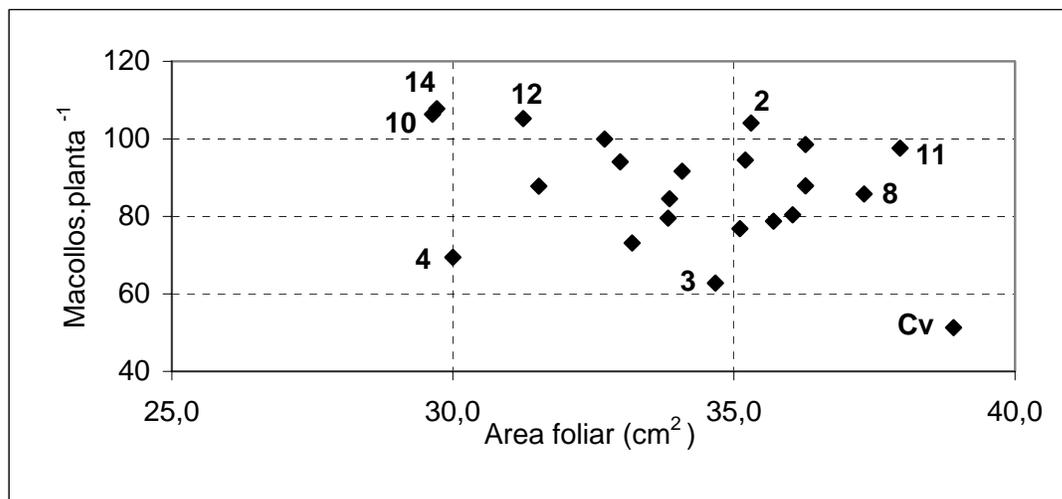


Figura 3. Relación entre número de macollos totales por planta a floración y área foliar en 22 entradas de germoplasma de agropiro alargado. Los números corresponden a las entradas de germoplasma evaluadas que se mencionan en el **Cuadro 1**.

4.5.2. Macollos Reproductivos

El número promedio de macollos reproductivos varió entre entradas (47,8 a 114 mac.planta⁻¹), siendo significativas las diferencias entre ellas ($p < 0,05$). Las entradas señaladas como las de mayor número total de macollos también fueron las que produjeron mayor número de varas floríferas (**Cuadro 3**). Asimismo, los materiales de menor número de macollos reproductivos fueron el cultivar y las entradas 3, 4 y 13. La relación entre los dos tipos de macollos (MR/MT4) fue de 0,91 macollos reproductivos por macollo existente en el cuarto recuento y dicha relación resultó similar entre entradas. Las entradas mostraron variación en el número de varas florales formadas, pero como todas ellas habrían efectuado el mismo esfuerzo reproductivo, en este caso el número de varas florales no sería indicativo de prolificidad sino del tamaño del individuo. El 91% de los macollos totales llegan a florecer, proporción que resulta elevada en relación a otros estudios que señalan una proporción de 34,7 a 60,3% para agropiro (Castaño, 1995). Sin embargo este autor estimó tal proporción sobre una pastura implantada en un ambiente con limitantes edáficas, donde las plantas se hallaban en condiciones de competencia, muy diferente al ambiente del presente estudio, realizado sobre un suelo de capacidad de uso agrícola, sin competencia y con alta disponibilidad lumínica, nutricional y espacial derivada de la disposición aislada de los individuos.

En plantas de agropiro, dada la relación entre macollos reproductivos y totales, la cantidad de éstos últimos podría estimarse a través de los reproductivos, los que son más sencillos de registrar especialmente a fines del estadio vegetativo. Además, las entradas con mayor número de macollos totales serían las más convenientes para su utilización en el mejoramiento de la producción de semilla.

4.6. Floración

Las plantas con floración posterior al 1° de diciembre (tardías) resultaron las de mayor porcentaje, aunque por muy estrecho margen (**Cuadro 2**). Para esta variable, todas las entradas resultaron heterogéneas y difirieron significativamente en la proporción de plantas tardías ($P < 0,05$). Dos poblaciones naturalizadas, la 10 y la 16 presentaron un 75% de plantas tempranas, mientras que el 85% de los individuos del cultivar y de la entrada 3, resultaron de floración tardía. El índice de floración de las entradas varió entre entradas (**Cuadro 3**), pero las diferencias no resultaron significativas entre ellas ($p = 0,9$). En valores absolutos, la población 15 fue la de mayor índice correspondiéndole entonces la menor velocidad de floración

($V=0,096d^{-1}$), en contraposición con la población 20 que fue a la que más tiempo le insumió que todos sus integrantes iniciaran la floración ($V=0,233d^{-1}$). De todos modos esas diferencias no fueron significativas, siendo la velocidad promedio de $0,142d^{-1}$ y probablemente se deba a la gran variación entre plantas dentro de entrada, ya que el coeficiente de variación resultó del 52%.

El agropiro es una forrajera de ciclo primaveral tardío, que en la provincia de Buenos Aires inicia la floración a fines de noviembre y se prolonga hasta enero (Mazzanti *et al.*, 1992; Ferrari y Maddaloni, 2001), lo que resultó coincidente con el patrón de floración observado. La floración no fue uniforme dentro de entradas y éstas tampoco fueron similares entre sí en la proporción de plantas de cada categoría de floración, lo que pone de manifiesto la variabilidad existente para este carácter entre y dentro de entradas. De todos modos, algunos materiales se presentaron como más tempranos (poblaciones 10 y 16), y otros más tardíos, como la población 3 y el cultivar, material que se comporta como tardío en el sudeste bonaerense (Mazzanti *et al.*, 1992). La selección de material promisorio de naturaleza precoz o de floración tardía debería efectuarse a nivel de individuo y tendría mayores probabilidades dentro de las poblaciones naturalizadas 10 y 16 para precocidad a floración y en la entrada 3 para ciclo tardío.

4.7. Caracteres de la espiga

El tamaño promedio del raquis fue de 36cm y el número medio de espiguillas por espiga fue de 21,7 (**Cuadro 3**). El número de espiguillas no difirió entre entradas ($p>0,05$) y tampoco se observaron diferencias significativas en la longitud del raquis.

Las entradas de agropiro naturalizadas no presentaron variabilidad para estos caracteres y tampoco se diferenciaron del cultivar más difundido. Los cambios genéticos asociados a la colonización de nuevos ambientes no afectan a todos los caracteres por igual (Jones y Wilkins, 1971) y generalmente los caracteres vegetativos suelen resultar más influenciados por el ambiente que los reproductivos. Además, los cambios en caracteres reproductivos suelen ocurrir en respuesta a variantes macroclimáticas, (Whyte *et al.*, 1959), que ejercen su acción durante un período prolongado tal que involucre recambio poblacional. Las poblaciones naturalizadas de agropiro analizadas en esta experiencia no cumplen con esos requisitos ya que las 21 poblaciones proceden de la provincia de Buenos Aires, por lo que han estado sometidas a condiciones macroclimáticas similares y por un período no muy prolongado, ya que la especie fue introducida al país a mitad del siglo pasado.

4.8. Sanidad

Las plantas con síntomas de roya afectando más del 25% de sus hojas varió entre entradas (**Cuadro 3**), siendo la categoría más común la de plantas con ausencia de roya o con hasta el 25% de las hojas afectadas. Las entradas difirieron en dicha proporción ($p<0,05$) ya que algunas poblaciones presentaron todas sus plantas sin síntomas y otras con un 33% de los individuos con alguna evidencia de roya en el follaje. Entre las plantas afectadas, la mayoría mostró presencia de roya en el 25 al 50% de las hojas, siendo muy escasos los individuos con mayor proporción de follaje afectado. El número de plantas afectadas en todo el ensayo resultó baja, lo que podría deberse por una parte a una baja susceptibilidad de la especie a roya del follaje, como a falta de inóculo en el ambiente. A pesar de que se observó variabilidad para el carácter presencia de roya en el follaje y de que algunas poblaciones presentaron mayor número de plantas afectadas, la susceptibilidad a dicho patógeno requiere pruebas más complejas que aseguren la presencia de inóculo en cantidad y con una distribución adecuada.

5. CONCLUSIONES

El agropiro alargado, a pesar de su corta permanencia en la Argentina, se naturalizó en la región pampeana donde se desarrollaron poblaciones en diferentes distritos agroclimáticos y microambientes diversos desde el punto de vista de las características edáficas. Estas poblaciones presentaron características diferenciales, ya que entre ellas se observó variabilidad fenotípica para hábito de crecimiento, color del follaje, tamaño foliar, altura, número de macollos y tipo de floración. La variabilidad detectada en esta etapa de evaluación es alentadora y posibilita el pasaje de los materiales más promisorios a las siguientes etapas de evaluación, a fin de determinar la potencialidad forrajera de los mismos en ensayos más complejos y situaciones similares a su forma de uso y manejo en la región pampeana.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, S.I. 2004. Evaluation of Italian ryegrass populations naturalized in the flooding pampa of Argentina. I-Morphological and physiological characters at initial stage. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 51(7):747-758
- Borrajo, C.I.; Alonso, S.I. y Monterubbianesi, G. 1997. Caracterización de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado. I Porte, color, y altura. *Rev. Arg. Prod. Animal* 17: 395-403.
- Borrajo, C.I.; Alonso, S.I.; Mazzanti, A y Monterubbianesi, G. 1998. Caracterización de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado. I Macollaje y caracteres reproductivos. *Rev. Arg. Prod. Animal* 18:183-192.
- Bresse, E.L. and Tyler, B.F. 1986. Patterns of variation and the underlying genetic and cytological architecture in grasses with particular reference to *Lolium*. *In: Intraspecific classification of wild and cultivated plants*. Ed. Styles, B.T. Clarendon Press, Oxford U.K. pp.53-69.
- Castaño, J. 1995. Producción de semilla de gramíneas forrajeras en el sudeste bonaerense. EEA Balcarce, INTA-CERBAS. Material didáctico n°10, pp.65-73
- Cauhépé, M.A. 1994. Ecología y producción animal en la Pampa Inundable, Argentina. *In: Puignau, J.P. (Ed.). Utilización y Manejo de pastizales. Diálogo/IICA-PROCISUR; Nro 40. Montevideo, IICA-PROCISUR, p.5-30.*
- Chapman, D.F. and Lemaire, G. 1993. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. *Proceedings of the XVII International Grassland Congress: 95-104.*
- Conover, W.J. 1971. *Practical nonparametric statistics*. Ed. Wiley International. pp. 149-166.
- Covas, G. 1985. El género *Elytrigia* (= *Agropyron* s. lat.) en La Pampa. *Apuntes para la Flora de La Pampa*. INTA Anguil. pp. 398-404.
- De Fina, A.L. 1992. Aptitud agroclimática de la República Argentina. Ed. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. 402 p.
- Dwyer, L.M.; Tollenar, M. and Houwing, L. 1991. A nondestructive method to monitor leaf greenness in corn. *Canadian Journal of Plant Science* 71:505-509.
- Fahn, A. 1982. *Plant Anatomy*. Ed. Third. pp. 181-191.
- Ferrari, L. y Maddaloni, J. 2001. 5. Agropiro alargado. *In: Maddaloni, J. y Ferrari, L. (ed.). Forrajeras y Pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina*. INTA- Univ. Nac. Lomas de Zamora, Fac. Cs. Agr. pp. 125-134.
- Fernández Grecco, R. 1999. Principios de manejo de campo natural. *Materiales Didácticos N°9 CERBAS, EEA Balcarce*. 110 p.
- Hawkes, J.G. 1976. *Germplasm collection. Manual for field collectors*. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome.
- Johnson, R.C. 1991. Salinity resistance, water relations and salt content of crested and tall wheatgrass accessions. *Crop. Sci.* 31:730-734.
- Jones, D.A. and Wilkins, D.A. 1971. *Variation and adaptation in plant species*. Heinemann Educ. Books Ltd London. 184 p.

- Lavado, R.S. y Taboada, M.A. 1985. Influencia del pastoreo sobre algunas propiedades químicas de un Natracuol de la Pampa Deprimida. *Ciencia del Suelo* 3:102-108.
- Mazzanti, A.; Castaño, J.; Sevilla, G.H. y Orbea, J.R. 1992. Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la provincia de Buenos Aires. Manual de descripción. CERBAS.INTA. pp. 32-33.
- Montgomery, D.C. 1991. Experimentos con un solo factor. *In*: Diseño y análisis de experimentos. Grupo Ed. Iberoamérica. pp.45-84
- Musto, J.C. y Maddaloni, J. 2001. Características y descripción de las principales áreas del Ecosistema Templado Húmedo. *In*: Maddaloni, J. y Ferrari, L. (ed.). Forrajeras y Pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. INTA- Univ. Nac. Lomas de Zamora, Fac. Cs. Agr. pp. 5-27.
- Nelson, C.I. and Sleppey, D.A. 1983. Using leaf area expansion rate to improve yield of tall fescue. *In*: Proc. XIV International Grassland Congress Lexington, K.Y. pp. 413-416.
- Nicora, E.G. 1978. Gramíneas. Parte III. *In*: Correa, M.(Ed.). Flora Patagónica. Col. Científica del INTA, Buenos Aires. pp 453-461.
- Parodi, L.R. 1964. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Ed. ACME S.A.C.I. Buenos Aires. pp. 149-151.
- SAS Institute. 2001. SAS/STAT software:release 8.02. SAS Institute Inc. USA.
- STA. 1993. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. Seed Sci. and Technol. 21, Supplement, Rules.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principles and Procedures of Statistics, McGraw. Hill Book Co., New York. 622 p.
- Teruel, C.M. 1978. Efectos de fertilización nitrogenada, irrigación, intensidad y frecuencia de corte sobre la producción de materia seca, contenido de proteína y persistencia de agropiro alargado. Tesis Ing. Agr. Castelar. Escuela para graduados en Cs. Agr. 67 p.
- Tyler, B.F.; Chorlton K.H. and Thomas, I.D. 1987. Preliminary screening of forage grasses. *In*: Collection, characterization and utilization of genetic resources of temperate forage grass and clover. IBPGR, Rome, pp. 13-24.
- Valla, J.J. 1993. Botánica. Morfología de las plantas superiores. Ed. Hemisferio Sur, S.A. pp 99-108.
- Vervoorst, F.W. 1967. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado. *In*: INTA. La vegetación de la República Argentina. Serie Fitogeográfica N° 7. Argentina. 262 p.
- Whyte, R.O.; Moir T.R.G. y Cooper J.P. 1959. Las Gramíneas en la agricultura. FAO: Estudios Agropecuarios N° 42, 465 p.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CLONES DE DOS SUBESPECIES DE *Paspalum dilatatum* DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA.

Alonso, S.I.¹ Clausen, A.M.¹ y Garita, F.G.¹

1. RESUMEN

La caracterización de 29 individuos pertenecientes a 10 clones de *Paspalum dilatatum*, cuatro de ellos pertenecientes a la subespecie *dilatatum* y seis a la subespecie *flavescens*, se realizó a través de un análisis de componentes principales (ACP) utilizando 31 atributos morfológicos. El primer componente permitió separar los individuos a nivel subespecífico e indicó que atributos morfológicos tales como fragilidad de la raquilla, grado de pubescencia de las glumas y color de las vainas, contribuyen a diferenciar las subespecies en el estadio de madurez. El ACP por subespecie posibilitó establecer las similitudes morfológicas entre clones.

2. INTRODUCCIÓN

Paspalum dilatatum Poir. es una gramínea americana que se distribuye en el sur del Brasil, Uruguay y Argentina, siendo ocasional en la zona oriental del Paraguay (Burkart, 1969; Cabrera, 1970; Zuloaga y Morrone, 2001). En Argentina es denominada vulgarmente “pasto miel” o “pasto meloso” y crece espontáneamente en suelos fértiles de parques, campos, bordes de banquetas y vías férreas en la mayoría de las provincias del norte y centro del país (Alonso e Ispizúa, 1996; Zuloaga y Morrone, 2001).

En la provincia de Buenos Aires *Paspalum dilatatum* es común en parques y jardines, en la costa platense y en la pseudoestepa climática. En los pastizales de la Depresión del Río Salado es una de las especies nativas dominantes en las comunidades A y B y en lugares perturbados (Vervoort, 1967; Burkart, León y Movia, 1990). El biotipo de mayor distribución es descrito como un híbrido natural, apomíctico obligado, pentaploide con 50 cromosomas y anteras púrpuras, muy relacionado con un biotipo sexual de 40 cromosomas y anteras amarillas (Rosengurt, Arrillaga e Izaguirre, 1970; Burson, 1983). El pentaploide corresponde a la forma típica mencionada para la flora uruguaya (subsp. *dilatatum*) y el tetraploide a la subespecie *flavescens* (Rosengurt, Arrillaga e Izaguirre, 1968). Ambas subespecies también son mencionadas en la flora de la Argentina (Zuloaga y Morrone, 2001), creciendo en forma aislada o simpátrica en la provincia de Buenos Aires (Alonso e Ispizúa, 1996).

El pasto miel es considerado una forrajera clave por su producción primavero-estivo-otoñal y por la calidad del forraje (Burkart, 1969; Nicora, 1978; Deregibus y Cauhépé, 1983) lo que lo convierte en una especie nativa de alto valor actual, cuyo germoplasma debe ser preservado y evaluado. A fin de evitar la conservación de semillas correspondientes a mezclas de entidades taxonómicas, la determinación precisa de la identidad del germoplasma debe realizarse durante la colecta. Además, en el caso de pasto miel, dicha identidad es necesaria para establecer la técnica de muestreo apropiada para cada subespecie, ya que éstas difieren según se trate de semilla de origen sexual o apomíctico (Brown y Marshall, 1995). Sin embargo, la identificación de las subespecies de pasto miel en el campo sólo es posible durante la floración, a través del color de las anteras (Zuloaga y Morrone, 2001), época poco apropiada para obtener semilla madura y en condiciones de ser conservada. La detección de otros caracteres vegetativos o reproductivos que permitan el reconocimiento de las subespecies al momento de la colecta, permitiría aplicar la técnica de colecta apropiada a cada una de ellas, evitaría la mezcla de poblaciones cuando las subespecies crecen simpátricamente.

Este trabajo tiene como objetivo la caracterización morfológica de clones de las dos subespecies de *Paspalum dilatatum* que crecen en la provincia de Buenos Aires, a fin de a) identificar caracteres que, como complemento del color de las anteras, contribuyan a la diferenciación de subespecies y b) establecer las relaciones genéticas entre clones en base a caracteres morfológicos.

¹ Unidad Integrada: Facultad de Ciencias Agrarias, Univ. Nac. Mar del Plata / Est. Exp. Agrop. Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. salonso@balcarce.inta.gov.ar, aclausen@balcarce.inta.gov.ar

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon cuatro clones de *Paspalum dilatatum* subespecie *dilatatum* y seis clones de la subespecie *flavescens*, coleccionados en la Provincia de Buenos Aires (**Tabla 1**). La colección original se efectuó en plena floración, cuando el color de las anteras podía visualizarse, pero igualmente el estatus subespecífico se corroboró a través del número cromosómico somático, efectuado mediante squash de raicillas según Echarte, Clausen y Sala (1992). En otoño las plantas madres se clonaron y se obtuvieron de 3 a 5 individuos consistentes en un trozo de rizoma con cuatro macollos desarrollados, los que se mantuvieron en macetas conteniendo suelo franco en una jaula antiáfidos. A partir de la encañazón (fin de primavera) y hasta la madurez, se registraron 31 caracteres morfológicos (**Tabla 2**), sobre macollos vegetativos (MV) o reproductivos (MR) en los 29 individuos supervivientes (**Tabla 1**). Para los caracteres cuantitativos, se consideró el valor promedio de por lo menos tres observaciones por órgano y por planta.

Se confeccionó una matriz básica general con el total de los datos (31 caracteres por 29 individuos), la que fue estandarizada y se utilizó para realizar un análisis multivariado de ordenación (Análisis de componentes principales=ACP), según la técnica "R" (Crisci y López Armengol, 1983). Para ello se elaboró una matriz de similitud mediante el coeficiente de momento-producto de Pearson y se consideraron los tres primeros componentes principales (CPI, CPII y CPIII). El mismo procedimiento se aplicó a la matriz de la subespecie *dilatatum* (MBDiI; tamaño 30x12) y de la subespecie *flavescens* (MBFlav; tamaño 30x17); en estas matrices no se incluyó el carácter fragilidad de la raquilla por su invariabilidad dentro de subespecie.

Tabla 1: Números de entrada de los clones de *Paspalum dilatatum* analizados (N° CLON) y del coleccionista (Col), número de plantas (N°PI), procedencia y ambiente del sitio de colecta.

N° CLON y Col*	N° PI	PARTIDO	LOCALIDAD	SITIO	AMBIENTE
SUBESPECIE FLAVESCENS					
1:ALO 1520	2	Gral. Pueyrredón	Mar del Plata.	Vías del ferrocarril sobre calle Jara.	Vereda gramínea, con pisoteo frecuente, a 50 m de ALO 1521.
2:ALO 1521	4	Gral. Pueyrredón	Mar del Plata.	Vías del ferrocarril sobre calle Jara.	Suelo sin disturbios, lejos de las vías, a 50 m de ALO 1520 y de ALO 1522.
3:ALO 1522	3	Gral. Pueyrredón	Mar del Plata.	Vías del ferrocarril sobre calle Jara.	Suelo disturbado, al lado de las vías en uso, a 100 m de ALO 1520.
4:ALO 1523	5	Balcarce	Ext. Exp. Agrop. INTA, Balcarce.	Edificio Casino	Césped del parque.
5:ALO 1524	1	Balcarce	Ext. Exp. Agrop. INTA, Balcarce.	Laboratorio de Suelos	Césped del parque, simpátrica con ALO 1530.
6:ALO 1528	2	Balcarce	Ext. Exp. Agrop. INTA, Balcarce.	Invernáculos	Césped del parque.
N° CLON y Col*	N° PI	PARTIDO	LOCALIDAD	SITIO	AMBIENTE
SUBESPECIE DILATATUM					
7:CLA 438	2	Gral. Belgrano	Ruta 41, a 17 km de Gral. Belgrano.	Estancia Magnolia La	Banquina gramínea cerca de la ruta.
8:ALO 1525	3	Balcarce	Ext. Exp. Agrop. INTA, Balcarce.	Laboratorio de Suelos	Césped bajo los árboles.
9:ALO 1530	3	Balcarce	Ext. Exp. Agrop. INTA, Balcarce.	Laboratorio de Suelos	Césped del parque, a 50 m de ALO 1525 y simpátrica con ALO 1524.
10:ALO 1535	4	Balcarce	Ext. Exp. Agrop. INTA, Balcarce.	Edificio Maquinarias	Borde del camino, a 300 m de ALO 1525 y ALO 1530.

* Col= colección: ALO= Alonso, S.I.; CLA= Clausen, A.M.

Tabla 2: Caracteres registrados en individuos de *Paspalum dilatatum* sobre macollos en estadio reproductivo o sobre macollos vegetativos (MV).

Nº	CARÁCTER	Nº	CARÁCTER
1	Longitud última hoja desplegada (cm).	17	Distancia entre las espiguillas (mm).
2	Ancho última hoja desplegada (mm).	18	Longitud del cariopse (mm).
3	Longitud de los pelos de la vaina (mm).	19	Ancho del cariopse (mm).
4	Longitud de la lígula (mm).	20	Relación longitud/ancho cariopse.
5	Longitud de los pelos de la zona ligular (mm).	21	Número de cariopses por racimo.
6	Nº de hojas/Macollo. MV	22	Longitud del pedicelo (mm).
7	Longitud del pseudotallo (cm). MV	23	Área de las glumas (longitud x ancho, mm).
8	Ancho del pseudotallo (cm). MV	24	Longitud de las anteras (mm).
9	Relación longitud/ancho pseudotallo. MV	25	Longitud de los estigmas (mm).
10	Número de nudos por caña.	26	Fecha de inicio de floración (1=1/12; 2=6/12; 3=14/12; 4=17/12; 5=23/12; 6=30/12; 7=floración posterior al 30/12).
11	Longitud de la caña (cm).	27	Color de las vainas (1=toda verde; 2=sólo la base púrpura; 3=sólo el borde púrpura; 4=base y borde púrpuras).
12	Relación longitud caña/ longitud hoja.	28	Pubescencia de las vainas (1=poco densa; 2=densa; 3=muy densa).
13	Número de racimos por inflorescencia	29	Pubescencia del pedicelo (1=nula; 2=muy rala; 3=poco densa; 4=densa; 5=muy densa).
14	Distancia promedio entre los pares de racimos 1º y 2º, 2º y 3º y 3º y 4º (mm).	30	Pubescencia de la gluma (1=nula; 2=muy rala; 3=poco densa; 4=densa; 5=muy densa).
15	Longitud de los racimos: 1º (inferior) y 3º (mm).	31	Fragilidad de la raquilla * (1; 2 o 3).
16	Longitud de pelos en la zona de inserción de los racimos (mm).		

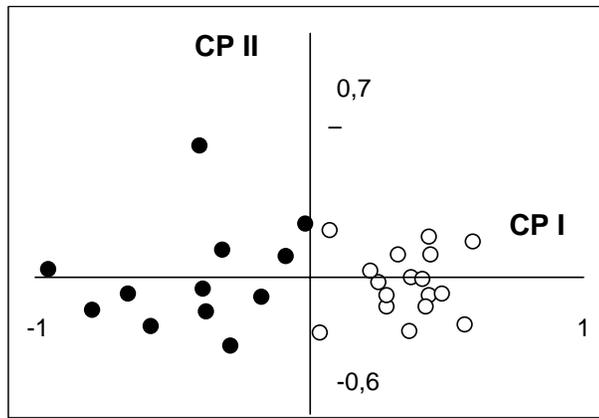
* Fragilidad: resistencia de las espiguillas a desprenderse en la madurez, al ser sometidas a un movimiento de arrastre efectuado con los dedos, desde la base al extremo del racimo. Categorías: (1 persistente=se desprenden menos del 30% de las espiguillas; 2 semi-persistente=se desprenden entre el 30 y el 60%; 3 frágil=más del 60% se desprenden simultáneamente).

4. RESULTADOS

4.1. Diferenciación de Subespecies

El número cromosómico de los clones con anteras púrpuras fue de $2n=50$, mientras que el de los que presentaron anteras amarillas o amarillas con extremo púrpura, fue de $2n=40$ cromosomas. De esta forma se corroboró la identificación a nivel subespecífico realizada durante la colecta, al coincidir el color de las anteras con el nivel de plodia mencionado para las subespecies *dilatatum* (pentaploide) y *flavescens* (tetraploide), (Rosengurt et al., 1968).

En el ACP con el total de individuos, los tres primeros componentes principales (CP) explicaron el 40% de la variabilidad existente entre ellos mientras que para explicar el 100% de la variación, se requirieron 23 CP. A pesar de que el CPI sólo explicó un 20,5% de la variación presente, resultó suficiente para separar los individuos a nivel de subespecie. Los individuos de la subsp. *flavescens* quedaron ubicados sobre la escala positiva del CPI, en los cuadrantes de la derecha y los de la otra subespecie, sobre los cuadrantes de la izquierda (**Figura 1**). Los individuos de la subespecie *flavescens* presentaron raquilla frágil, glumas densamente pubescentes, vainas con tonalidades purpúreas, cañas y pedicelos más largos y pseudotallos más anchos que la subespecie *dilatatum* (**Tabla 3**). El segundo componente (CPII) indicó que dentro de cada subespecie, los clones presentaban diferencias entre sí, las que se visualizan en los ACP de cada subespecie.



● Subsp. *dilatatum* ○ Subsp. *flavescens*

Figura 1. Ordenamiento bidimensional de 29 individuos de *Paspalum dilatatum* de las subespecies *dilatatum* y *flavescens* en base a los dos primeros componentes principales (CPI y CP II).

Tabla 3. Caracteres de mayor contribución en cada componente principal (CP) y la correlación entre ellos (+o-), para los análisis de componentes principales (ACP) entre las subespecies *dilatatum* (Sspdil) y *flavescens* (Sspflav) y por subespecie.

ACP entre subespecies			
Caracteres 1° Componente (CP I)	Subsp. <i>dilatatum</i>		Subsp. <i>flavescens</i> .
	Promedio y Desvío Estándar		Promedio y Desvío Estándar
(+)Fragilidad de la raquilla	1 ± 0		2 ± 0
(+)Pubescencia de glumas	1,8 ± 0,7		3,06 ± 0,8
(+)Longitud de la caña	40,4 ± 8,7cm		51,1 ± 5,95 cm
(+)Longitud del pedicelo	1,37 ± 0,3 mm		1,95 ± 0,4 mm
(+)Ancho del pseudotallo	0,46 ± 0,08 cm		0,65 ± 0,12 cm
(+)Color de la vaina	1,92 ± 1,0		3,06 ± 0,85
CONTRIBUCIÓN: 23 %			
ACP por subespecie			
ACP Subespecie <i>dilatatum</i>		ACP Subespecie <i>flavescens</i>	
CP I Caracteres	CP II Caracteres	CP I Caracteres	CP III Caracteres
(+)Distancia e/espiguillas	(+)Long. Pelos zona ligular	(+)Pubescencia vainas	(-)Longitud de la caña
(+)Longitud del racimo	(-)N° racimos	(-)N° racimos	(+)N° hojas/Macollo
(+)Distancia e/racimos	(-)área de la gluma	(+)Long. de los racimos	(-)Rel. Long caña/hoja
(+)Ancho pseudotallo	(+)Longitud del pseudotallo	(+)Longitud del pedicelo	(-)Ancho del cariopse
(+)Ancho del pseudotallo	(+)Longitud de las anteras	(+)Area de la gluma	(-)Longitud del cariopse
(+)N° hojas/Macollo	--	(+)Longitud pelos vaina	--
CONTRIBUCIÓN: 21,4 %		19,4 %	15,4 %
			12,5%

4.1.1. Subespecie *dilatatum*

Al analizar mediante el ACP la variabilidad entre los individuos de esta subespecie, se observó que los dos primeros componentes explicaron un 55,2% de la variabilidad y permitieron separar los cuatro clones (Figura 2). A pesar de la variación presentada por uno de los individuos pertenecientes al clon 10, éste se diferenció del clon 9 a través del CPI, ya que este último presentó menor distancia entre racimos y entre espiguillas, menor longitud de racimos y número de espiguillas, menor ancho del pseudotallo y menor número de hojas por macollo (Tabla 3). Los clones 7 y 8, posicionados en el cuadrante superior derecho se separaron entre sí y del clon 10 por el CPII (Figura 2). El clon 7 presentó mayores longitudes del pseudotallo, de los pelos de la zona ligular y de las anteras, pero menor área de las glumas que el clon 10, mientras que el clon 8 presentó características intermedias.

En la subespecie *dilatatum* la diferenciación entre los clones fue posible a través del CPI y CPII tanto entre clones de diferentes localidades como de sitios próximos. Entre los clones de Balcarce, el clon 10 se caracterizó por presentar inflorescencias con racimos más cortos y próximos que el resto, en los que el mayor tamaño de las espiguillas determinó que las mismas estuviesen muy próximas entre sí. Los otros dos clones de Balcarce también difirieron, indicando que si bien procedían de sitios separados por escasos 50m (Tabla 1), no se trataba del mismo clon. La diferenciación entre ellos se estableció a través de los caracteres del CPII. Este CP también diferenció al clon 7 originario de General Belgrano, el que presentó mayores dimensiones en sus estructuras vegetativas y espiguillas de menor tamaño que los clones de Balcarce. La variación entre individuos de cada clon se evidenció en todos ellos, pero con mayor magnitud en el clon 10 (Figura 2).

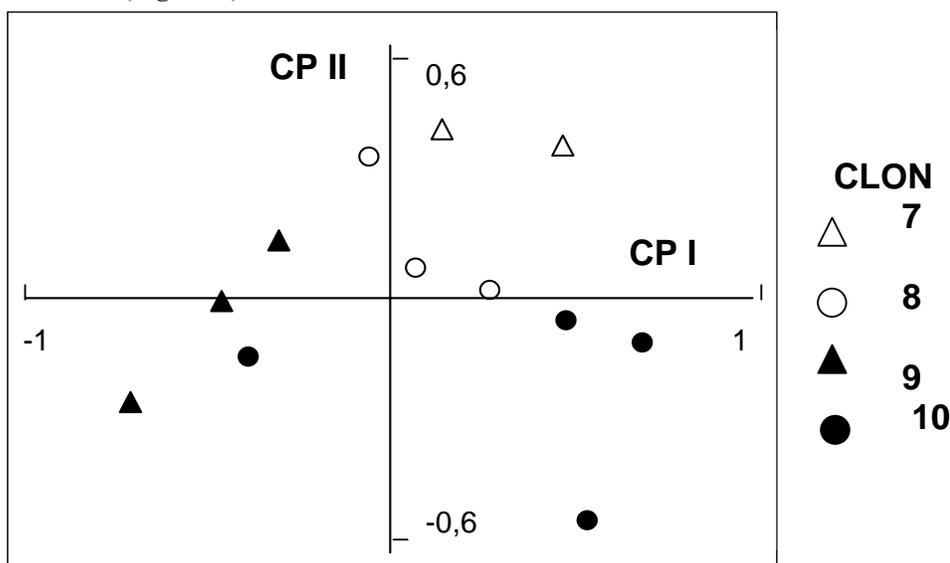


Figura 2. Ordenamiento bidimensional en *Paspalum dilatatum*: a) cuatro clones de la subespecie *dilatatum* en base al 1º y 2º componente principal (CPI y CPII)

4.1.2. Subespecie *flavescens*

La representación de las relaciones entre los individuos de la subsp. *flavescens*, obtenida al considerar los componentes principales I y II (datos no presentados) o I y III (Figura 3) del ACP, no permitió una clara diferenciación entre clones, debido a la superposición entre individuos de diferente clon.

La ordenación de los clones en general concordó con el origen de los mismos, ya que los individuos de los clones 1, 2 y 3 procedentes de Mar del Plata quedaron ubicados principalmente en los cuadrantes de la derecha y los individuos de Balcarce (clones 4, 5 y 6) se ubicaron cercanos a la zona media o hacia la izquierda de CPI. Estos últimos presentaron menor longitud de los racimos y los pedicelos, menor longitud de los pelos ubicados en la vaina y en la inserción de los racimos, menor tamaño de las glumas y mayor número de racimos que los clones 1, 2 y 3 (Tabla 3). Entre éstos se observó alta variación entre individuos de un mismo clon, de tal modo que se superpusieron entre sí, como se observa en los integrantes del clon 1 y 2.

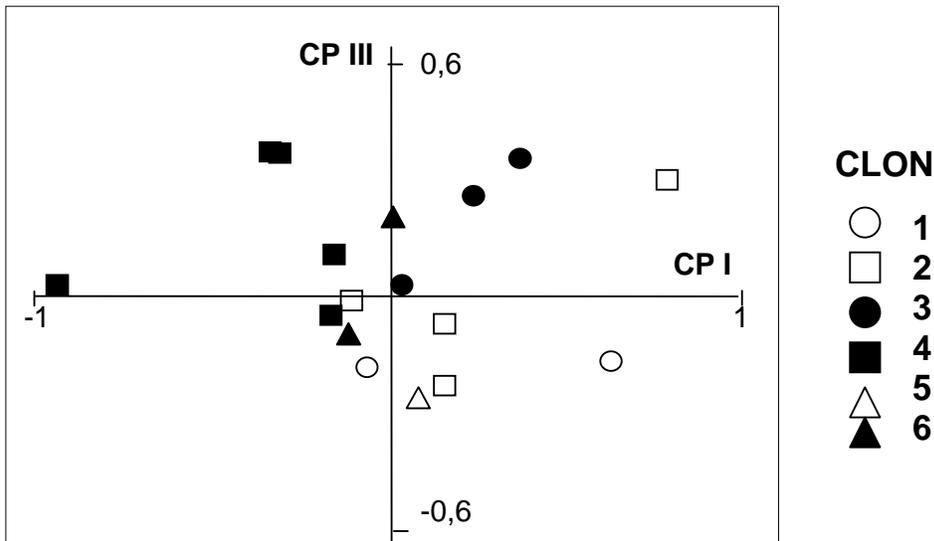


Figura 3: Ordenamiento bidimensional en *Paspalum dilatatum*: b) seis clones de la subespecie *flavescens* en base al 1º y 3º componente principal (CPI y CPIII).

5. DISCUSIÓN

Entre los atributos que diferencian a las subespecies de *P. dilatatum*, el número cromosómico y el color de las anteras ya fueron señalados por Rosengurtt *et al.* (1968), sin embargo los mismos no resultan de utilidad en el campo, cuando las semillas ya están maduras y las anteras ya se desprendieron. En este trabajo se observó que varios caracteres adicionales podrían complementar la diferenciación de las subespecies. Las plantas de *P. dilatatum* subespecie *flavescens* en general presentan mayor altura que la subespecie típica como resultado del mayor tamaño del pseudotallo y de las cañas. Además, presentan coloración purpúrea acentuada en las vainas, raquilla frágil, mayor grado de pubescencia en general y en las glumas en particular y mayor longitud del pedicelo.

De todos los caracteres que facilitarían la identificación a nivel subespecífico al momento de coleccionar germoplasma, la fragilidad de la raquilla y la pubescencia de las glumas serían los de mayor utilidad por su fácil visualización, practicidad y consistencia entre los individuos de cada subespecie y, en segundo término, la coloración púrpura de las vainas. En la subespecie *flavescens*, la articulación de la raquilla es muy débil a la madurez, lo que determina que todas o casi todas las espiguillas se desprendan simultáneamente ante un ligero movimiento de arrastre desde la base del racimo. Lo anterior probablemente se deba a que la madurez de las espiguillas es homogénea y por ende la desarticulación de las espiguillas es simultánea en toda la inflorescencia. En cambio, la madurez sería gradual en la subespecie *dilatatum*, ya que gran parte de las espiguillas permanecen unidas al racimo al ejercer dicho movimiento de arrastre y su dispersión es más escalonada. El que parte de los cariopses no se desprendan también podría deberse a la inviabilidad de las semillas, lo que es muy frecuente en la subespecie *dilatatum* (Alonso, Garita y Clausen, 1995).

En relación a la pubescencia de las glumas, las plantas de la subespecie *flavescens* presentan glumas densamente pubescentes, con pelos largos que se entremezclan, lo que determina que las espiguillas queden aglutinadas al comprimirlas ligeramente y no separadas a medianamente separadas como en la subespecie *dilatatum*, cuyas glumas tienen pubescencia corta y menos densa. La utilidad de la fragilidad de la raquilla y la pubescencia de las espiguillas para diferenciar subespecies de *Paspalum dilatatum* fue comprobada en posteriores colectas por Alonso y Clausen (2003).

La coloración púrpura de las vainas es un carácter que presenta variación dentro de subespecie, sin embargo los individuos de la subespecie *flavescens* suelen presentar esa coloración en la base de la vaina, en el borde o en toda la vaina, mientras que los individuos de la otra subespecie presentan vainas verdes y en pocos casos la base o el borde es de color púrpura.

La caracterización de los clones a través del ACP resultó más efectiva en la subespecie *dilatatum* que en la *flavescens*. En la subespecie *dilatatum* los individuos son apomícticos, por lo que el flujo polínico está restringido y las diferencias entre clones se mantienen en el tiempo y en el espacio, posibilitando su efectiva diferenciación. Ello explicaría porqué los clones de esta subespecie pudieron ser caracterizados a través de los dos primeros componentes, aún aquellos que en la naturaleza se hallaban separados por pocos metros (clones 8 y 9).

Los integrantes de la subespecie *flavescens* forman semilla sexual y son autógamos (Pereira y Romano, 2005), por lo que se esperaría un alto grado de similitud dentro de poblaciones o entre individuos cercanos. Sin embargo, en poblaciones autógamas silvestres pueden coexistir un número variable de genotipos (Brown y Marshall, 1995) y encontrarse variabilidad dentro de población, como fuera observado en *Paspalum dilatatum* por Pereira y Romano (2003). Por otra parte, el flujo polínico entre individuos cercanos no debiera descartarse completamente, ya que en esta subespecie, el polen de las anteras excertas es viable en alto porcentaje (Garita, 1994). Ello podría determinar cierto grado de entrecruzamiento entre individuos de la misma población o de poblaciones cercanas, disminuyendo la diferenciación fenotípica entre plantas simpátricas. La mayor afinidad detectada entre clones de Mar del Plata con respecto a los de Balcarce y la superposición observada entre los integrantes de las poblaciones 1, 2 y 3 (**Figura 3**) induce a señalar que las plantas madres que les dieron origen, aunque separadas espacialmente por al menos 50m, integrarían la misma población y posiblemente entre ellas fuera posible el flujo génico. Este se dificulta y diluye a distancias mayores a los 100m y la acción del microambiente comienza a operar acrecentando las diferencias y determinando una variación genética de tipo discontinuo o en mosaico, originada en respuesta a diferencias ambientales muy localizadas (Breese y Tyler, 1986). En el caso de los clones de Balcarce el ambiente de origen es similar, pero no lo es la distancia entre sitios de colección y ello habría permitido cierto aislamiento y la generación de diferencias, especialmente en el clon 4 que provenía de un sitio de colección separado por 300m del clon 5 y a 400m del 6 (**Tabla 1**).

A pesar de que algunos materiales genéticos proceden de sitios cercanos, los diez clones presentaron diferencias entre sí en los valores medios absolutos de los atributos registrados (datos no presentados), por lo que deberían ser considerados como materiales genéticos diferentes y no como duplicados.

El análisis por subespecie permitió conocer las relaciones entre clones y detectar las características morfológicas que los diferencian. Sin embargo, el comportamiento de los individuos del mismo clon no siempre resultó homogéneo como se esperaría por su idéntica constitución genética. Los clones 4 y 2 de la subsp. *flavescens* y el clon 10 de la subsp. *dilatatum* fueron los que presentaron mayor dispersión entre sus individuos y, en los tres casos, originada básicamente por un solo individuo. Las causas determinantes de variación en individuos de constitución genética semejante son de tipo ambiental y entre ellas se incluyen tanto los efectos determinados por la variabilidad microambiental, como los errores en la medición de los caracteres (Mariotti, 1986). Entre las causas responsables de la variación entre clones observada en este trabajo, el efecto materno podría minimizarse o descartarse ya que las plantas madres de los diferentes clones permanecieron en condiciones de cultivo uniformes durante dos años y los individuos hijos tuvieron el mismo manejo desde la clonación. Además, el tamaño de las plantas al momento de la clonación fue similar en cuanto a la longitud del rizoma y al número de macollos desarrollados. Sin embargo, pequeñas diferencias en el número de nudos de los rizomas debidas al clima y época en que se formaron (Vignolio, Lattera y Fernández, 1994), así como en la evolución y la supervivencia de los macollos originales, podrían haber determinado diferencias en el tamaño entre plantas del mismo clon al momento de efectuarse el registro de datos y de esta forma generar las diferencias observadas.

El efecto del ambiente sobre la expresión de los caracteres se pone de manifiesto especialmente en los atributos de tipo cuantitativo relacionados con los órganos vegetativos, por lo que el número de observaciones realizadas en este trabajo para establecer los promedios por planta, pudieron haber resultado insuficientes y constituirse en otra causa de la variación entre individuos. Lo anterior alerta sobre la necesidad de mantener el material de estudio en condiciones uniformes de cultivo y manejo y de reducir el error experimental, considerado un impedimento para determinar diferencias genéticas cuando se emplean técnicas numéricas (Thorpe, 1976). En el caso de realizarse futuros trabajos de esta naturaleza en *P. dilatatum*, se deberá considerar especialmente incrementar el número de órganos a registrar por individuo y el tamaño de las plantas en estudio, las que dentro de cada clon deberán ser uniformes especialmente al momento de iniciarse los registros.

En este trabajo el análisis de ordenación permitió la separación de individuos por subespecie, permitió analizar la variación entre clones y visualizar la similitud fenotípica entre ellos, así como la ordenación de las entidades de diferente origen geográfico o ambiental. A pesar de que el número de clones empleados en el presente trabajo fue bajo y no representa toda el área de distribución de la especie, los resultados obtenidos permiten complementar las diferencias morfológicas a nivel subespecífico mencionadas por Rosengurtt *et al.* (1968), con otros atributos que facilitarán la identificación de ambas entidades y que permitirán evitar la mezcla de germoplasma durante la colecta.

6. AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que aportaron los siguientes subsidios para la realización del trabajo: ANPCyT (Picto/02 08-11335); Universidad Nacional de Mar del Plata (AGR 156) e INTA (PN 530005).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, S. y Clausen, A. 2003. Colecta y distribución de las subespecies de *Paspalum dilatatum* Poir. En la provincia de Buenos Aires, Argentina. Actas de IV SIRGEALC, Mar del Plata. p 65.
- Alonso, S.I.; Garita, F.A. y Clausen, A.M. 1995. Capacidad germinativa en clones de dos subespecies de Pasto miel. Rev. Arg. Prod. Animal 15 (1):94-96.
- Alonso, S.I. e Ispizúa, N.V. 1996. Catálogo del material del Herbario BAL. Poaceas (Gramíneas). Unidad Integrada Balcarce: E.E.A. Balcarce, INTA y Fac. Cs. Agrarias, UNMdP. 66 p.
- Bresse, E.L. and Tyler, B.F. 1986. Patterns of variation and the underlying genetic and cytological architecture in grasses with particular reference to *Lolium*. *In*: Styles, B.T. (ed.). Intraspecific classification of wild and cultivated plants. Clarendon Press., Oxford U.K. pp. 53-69.
- Brown, A.H.D. and Marshall, D.R. 1995. A basic sampling strategy: theory and practice. *In*: Guarino, L. Ramanatha Rao, V. Y Reid, R. (eds.). Technical guidelines. IPGRI CAB International. pp 75-91.
- Burkart, A. 1969. Flora ilustrada de Entre Ríos, Tomo VI, parte II. Gramíneas. Colección Científica del INTA. Buenos Aires.
- Burkart, S.E.; León, R.J.C. y Movia, C.P. 1990. Inventario fitosociológico del pastizal de la Depresión del Salado (Prov. Bs. As.) en un área representativa de sus principales ambientes. *Darwiniana* 30 (1-4): 27-69.
- Burson, B. 1983. Phylogenetic investigation of *Paspalum dilatatum* and related species. Proc. XIV International Grassland Congress, Lexington, Kentucky, USA, pp. 170-173.
- Cabrera, A.L. 1970. Flora de la provincia de Buenos Aires, Tomo IV, parte II. Gramíneas. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Crisci, J.V. y López Armengol, M.F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía N°36. Serie de Biología. Secr. Gral. OEA, Washington DC.
- Deregibus, V.A. y Cauhepe, M.A. 1983. Pastizales naturales de la Depresión del Salado: utilización basada en conceptos ecológicos. *RIA* 18: 47-78.
- Echarte, A.M.; Clausen, A.M. y Sala, C.A. 1992. Números cromosómicos y variabilidad morfológica de *Paspalum distichum* (Poaceae) de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Darwiniana* 31:185- 197.
- Garita, F.G. 1994. Caracterización de clones de Pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir.) del Banco de Germoplasma de Balcarce. Fac. Cs. Agrarias, UNMdP. Tesis de graduación.
- Mariotti, J.A. 1986. Fundamentos de genética biométrica. Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal. Monografía N° 32. Serie de Biología, Secr. Gral. OEA, Washington DC.

- Nicora, E. 1978. Flora Patagónica. Parte III, Gramíneas. Col. Cient. INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Pereira, J. y Romano, A. 2005. Análisis de diversidad genética en *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* de Uruguay a partir de marcadores moleculares. Resúmenes del V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Montevideo, Uruguay. pp 76.
- Rosengurtt, B., Arrillaga, B.R. e Izaguirre P. 1968. Especies nuevas y notas taxonómicas de Gramíneas en Uruguay y Paraguay. Bol. Fac. Agron. Montevideo 103: 1-41, f. 1-11.
- Rosengurtt, B.; Arrillaga, B.R. e Izaguirre P. 1970. Gramíneas Uruguayas. Col. Cs. 5, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Thorpe, R.S. 1976. Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. *Biol. Rew.* 51: 407-452.
- Vervoorst, F.B. 1967. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado. La vegetación de la República Argentina 7, INTA, Serie Fitogeográfica N° 7, Bs. As., Argentina.
- Vignolio, O.R.; Lattera, P. y Fernández, O.N. 1994. Características estructurales de los rizomas de *Paspalum dilatatum*. Su relación con el crecimiento aéreo y con las variaciones estacionales del clima. *Ecología Austral* 4:117-122.
- Zuloaga F.O. y Morrone O. 2001. Poaceae. 21.*Paspalum*. *In*: Flora Fanerogámica Argentina. Fascículo 71, PROFLORA. CONICET. 54 p.

FURTHER MEIOTIC STUDIES IN BRAZILIAN AND PARAGUAYAN GERMPLASM ACCESSIONS OF *Paspalum* L. (GRAMINEAE)

Pozzobon, M.T.¹, Valls, J.F.M.^{1,2}, Peñaloza, A.P.S.¹, Santos, S.¹

1. ABSTRACT

Apomixis is frequent in the genus *Paspalum*. Possibilities of manipulation of apomixis for genetic breeding depend on a good understanding of the whole biological process involved. Considering that meiotic normality or disturbances would reflect the reproductive systems of each accession, the objective of this investigation has been to study the meiotic chromosome behavior of thirty accessions of some Brazilian species and two accessions of Paraguayan species of *Paspalum* available as germplasm. The chromosome number detected for the majority of the accessions analysed is $2n=4x=40$. Three accessions of *P. alatum* ($2n=4x=24$), two of *P. conspersum* ($2n=6x=60$) and one of *P. paniculatum* ($2n=2x=20$) were exceptions. Most of the accessions were characterized by essentially irregular meiosis at the tetraploid level. This research confirms the high frequency of polyploidy among the *Paspalum* species considered. The results show a variable number of multivalent chromosome associations, corroborating the idea that both autopolyploidy and allopolyploidy may be involved in the origin of the Brazilian and Paraguayan tetraploid accessions of *Paspalum* investigated.

Key words: *Chromosome number, chromosome pairing, forage grasses, ploidy level.*

2. INTRODUCTION

Apomixis is frequent in the genus *Paspalum*. In many of its species, it is the main mode of reproduction. Possibilities of manipulation of apomixis for genetic breeding depend on a good understanding of the whole biological process involved. This has been a problem, and as a result *Paspalum* germplasm with a forage potential has been under utilized in breeding programs (Valls, 1992). In general, cultivar releases have been only based on the agronomic screening and selection of the most productive germplasm lines, usually apomictic, followed by seed increase for commercial use. An interesting exception including crosses is provided by the continuous breeding of Pensacola bahiagrass, *P. notatum* Flüggé (Burton, 1990; Gates *et al.*, 2004).

Most apomictic entities of the genus *Paspalum* are part of agamic complexes, in which diploids are self-sterile and generally show regular bivalent chromosome associations at meiosis, while the related polyploids tend to show irregular chromosome pairing and segregation, as well as aposporous and pseudogamous apomixis. Not all polyploids are apomictic. Some are autogamous sexual allopolyploids, with regular meiotic pairing (Quarín, 1992). Autogamous sexual diploids exist in a small proportion; self-sterile diploids are usually much less frequent in nature than their polyploid counterparts (Pozzobon & Valls, 1997; Quarín *et al.*, 1996). Most of the *Paspalum* entities are either autogamous or apomictic, resulting in genotypic stability, because of the lack of segregation (Quarín & Norrmann, 1987).

Considering that meiotic normality or disturbances would reflect the reproductive systems of each accession, the objective of this investigation has been to study the meiotic chromosome behavior of some Brazilian and Paraguayan species of *Paspalum* available as germplasm. Such investigation could provide indirect evidence of the probable occurrence of apomixis in most accessions.

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB, Av. W5 Norte (final), CEP: 70770-900, Brasília, DF, Brazil. CP 02372.

² CNPq fellowship marisa@cenargen.embrapa.br

3. MATERIAL and METHODS

Plant material was obtained primarily from germplasm explorations in Brazil. Two accessions have been collected in Paraguay. All the accessions analyzed are part of the *Paspalum* germplasm collection at EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF, Brazil. Original voucher specimens are deposited in the CENARGEN Herbarium (CEN), Brasília, Brazil. **Table 1** lists the species and accessions studied and their collection sites.

For meiotic analysis, young inflorescences were fixed in 3:1 solution of absolute ethanol: glacial acetic acid for 24h, and stored in 70% ethanol at 5°C until required. Slides were prepared by squashing the anthers in 2% propionic carmine. To analyze chromosome pairing, the highest available number of well-spread cells at diakinesis and metaphase were examined. Besides, to follow all the meiotic process, all available and well-spread cells in other meiotic phases were examined. Meiotic chromosome preparations were observed with light transmission microscopy and the results were recorded by photomicrographs.

Table 1. *Paspalum* species and accessions investigated.

Species	Accession Code (BRA-)	Collector number ¹	Site of origin ^{2,3}
<i>P. alnum</i> Chase	017159	V 12326	BRA, RS, Dom Pedrito
	017558	V 12396	BRA, RS, Uruguaiiana
	017566	V 12397	BRA, RS, Uruguaiiana
<i>P. atratum</i> Swallen	018996	Ry s/nº	BRA, MS, Campo Grande
<i>P. conspersum</i> Schrader	008354	V 9407	BRA, MT, S. Ant. do Leverger
	012467	V 11726	BRA, MS, Paranaíba
<i>P. guenoarum</i> Arech.	004880	V 8020	BRA, SC, São Joaquim
	003824	V 8563	BRA, MS, Bela Vista
<i>P. maculosum</i> Trinius	011240	V 10714	BRA, RS, Cruz Alta
<i>P. paniculatum</i> L.	002658	V 5092	BRA, GO, Itumbiara
<i>P. plicatulum</i> Michaux	009211	EEA 148	BRA, RS, Eldorado do Sul
	009229	EEA 149	BRA, RS, Eldorado do Sul
	008893	V 4331	BRA, RS, São Sepé
	003450	V 7441	BRA, SC, Lages
<i>P. regnellii</i> Mez	012947	V 11900	BRA, MS, Aral Moreira
<i>P. (Plicatula group) sp.</i>	022501	As 293	BRA, MG, Patrocínio
	008699	D 163	BRA, SC, Lages
	010235	Sv 536	BRA, MG, Montes Claros
	009083	V 4741	BRA, RS, São Sepé
	009105*	V 4793	BRA, RS, Guaíba
	010642	V 7333-A	BRA, RS, Itaqui
	009547	V 9414	BRA, MT, S. Ant. do Leverger
	009601	V 9474	BRA, MS, Aquidauana
	009628	V 9884	BRA, MS, Anastácio
	009661	V 9908	BRA, MS, Aquidauana
	009687	V 9922	PRY, Bella Vista
	009695	V 9927	PRY, Bella Vista
	010596	V 10503	BRA, MT, N. S ^{ra} do Livramento
-	V 10504	BRA, MT, N. S ^{ra} do Livramento	
012980	V 11912	BRA, MS, Amambai	
<i>P. virgatum</i> L.	012734	V 11830	BRA, MS, Caarapó
	012785	V 11844	BRA, MS, Navirai

¹Collectors and institutions: As: Scariot, A.O.; D: Dall'Agnol, M.; EEA: gronomic Experiment Station, Guaíba, RS, Brazil; Ry: Rayman, P.; Sv: Silva, G.P.; V: Valls, J.F.M. and collaborators

²Brazilian States: GO: Goiás; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina

³Countries: BRA: Brazil; PRY: Paraguay

* Cited as *P. compressifolium* by Adamowski *et al.* (2005).

4. RESULTS and DISCUSSION

The results of the cytogenetic analysis, with cytological configurations at diakinesis and metaphase I in PMCs are summarized in **Table 2 (Anexo1)**. The chromosome number detected for the majority of the accessions analyzed is $2n=40$. Most of the accessions were characterized by essentially irregular meiosis at this ploidy level. Except for the three *P. almum* Chase accessions ($2n=24$), all diploid, tetraploid or hexaploid species and accessions showed a basic number $x=10$.

Paspalum almum is peculiar in the genus, due to its $2n=4x=24$ chromosomes, confirmed in populations from Texas, Argentina and Brazil (Burton, 1942; Fernandes *et al.*, 1974; Burson, 1975; Quarín, 1974; Pozzobon & Valls, 1987; Honfi *et al.* 1990). Based on this distinct somatic number, a new basic number has been proposed for *Paspalum*. Burton (1942) suggested $x=6$ or 12, while Fernandes *et al.* (1974) proposed $x=6$, possibly deriving from $x=5$. The finding of $2n=12$ in *P. hexastachyum* (Quarín, 1974), which should be considered conspecific with *P. almum* (Valls, 2000; Zuloaga *et al.*, 2003), eliminates the possibility of $x=12$. The reproduction of tetraploid *P. almum* by aposporic apomixis and its characterization as an autotetraploid species, showing sometimes 5 IV, supports the hypothesis of a base number of six (Burson, 1975) possibly derived from $x=5$ (Quarín & Hanna, 1980b). In this analysis, *P. almum* has shown varying numbers of univalents, bivalents, trivalents and quadrivalents during diakinesis and metaphase I (**Figure 1A and B**). As many as three quadrivalents were observed. Bridges and laggards were observed in telophase I. Meiosis II was irregular, with presence of asynchronic divisions, laggards and micronuclei.

Paspalum conspersum Schrader has been characterized as an hexaploid, with regular meiotic behavior (Quarín & Hanna, 1980a; Pozzobon & Valls, 1987; Pagliarini *et al.*, 2001), sexual reproduction and allopolyploid origin (Quarín & Hanna, 1980a). Our new results confirm these data ($2n=60$) for two additional accessions. Meiosis was quite regular, with the chromosomes pairing primarily as 30 II (**Figure 1C**). Anaphase and telophase I were considered regular. Several accessions from Brazil have been wrongly cited as sexual tetraploids of *P. conspersum* (Fernandes *et al.*, 1974; Burson and Bennett, 1976; Burson, 1978). However these accessions were misidentified specimens of *P. regnellii* Mez, identified on the basis of voucher specimens available.

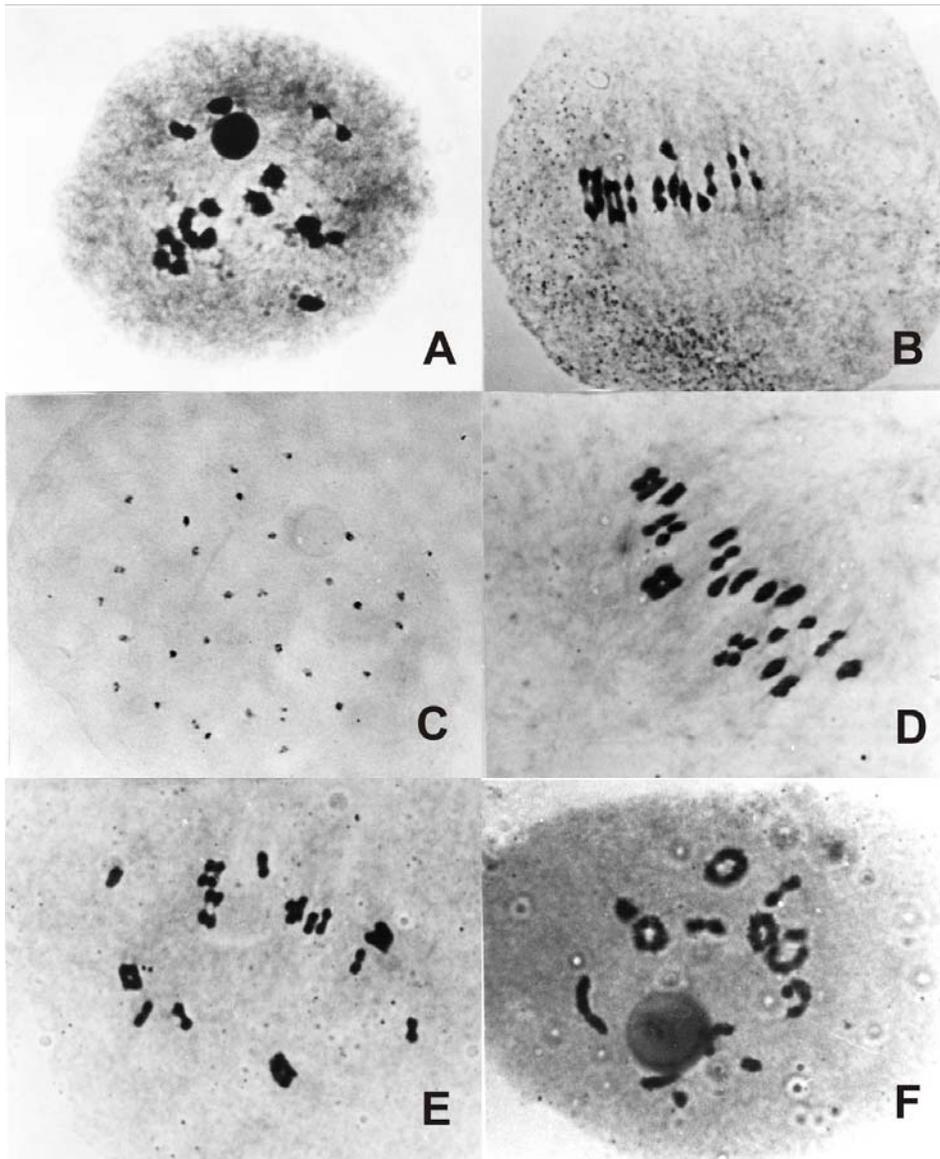


Figure 1. *Paspalum alnum*: A) Late diakinesis with 8II + 2IV; B) Metaphase I with 8II + 2IV (III with early desynapsis). C) *P. conspersum*, diakinesis showing 30II. D) *P. plicatulum*, metaphase I with 14II + 3IV. E) *P.* (Plicatula group) sp., metaphase with 8II + 6IV. F) *P. guenoarum*, diakinesis showing 2I + 7II + 6IV.

All accessions of *Paspalum* in the Plicatula group, including those of *P. atratum* Swallen, *P. guenoarum* Arech., *P. plicatulum* Michaux and others with their taxonomic circumscription not yet defined, presented $2n=40$ chromosomes. Although irregular, their meiosis showed mainly bivalents and quadrivalents in diakinesis and metaphase I (**Figure 2C**). Unbalanced chromosome segregation at anaphase I (**Figure 2B**) and micronuclei were present in telophase I cells, and we observed similar irregularities at anaphase and telophase II (**Figure 2G**). Bridges and laggards also were observed, as well as asynchronous divisions. Irregular meiotic behavior prevails in this group, as well as in other apomictic tetraploids of *Paspalum*.

Meiotic chromosome behavior in *P. atratum* showed a broader range of associations than those reported by Quarín *et al.* (1997) for a different accession of the species. The same authors reported this species to be apomictic, with aposporous embryo sac formation followed by parthenogenesis, and with an exceptionally good seed set for an apomictic *Paspalum*. The accession studied here does produce seed and shows a more irregular meiosis, which seems to indicate a similar apomictic reproduction.

Paspalum plicatulum is cited as tetraploid and apomictic (Bashaw *et al.*, 1970; Pritchard, 1970; Burson & Bennett, 1971b) and usually behaves as a segmental allotetraploid. The occurrence of rare diploids has

been recorded for the species (Brown, 1950; Reeder, 1967; Davidse & Pohl, 1972; 1978; Fernandes *et al.*, 1974; Honfi *et al.*, 1990; Pozzobon *et al.*, 2000). Sexuality at the diploid level has been confirmed by Espinoza & Quarín (1997). *Paspalum guenoarum* is an apomitic tetraploid (Pritchard, 1970), considered to be of segmental allotetraploid origin (Burson & Bennet, 1971a). Additional Brazilian accessions of *P. plicatulum* and *P. guenoarum* were previously analyzed by Fernandes *et al.* (1974) and Pozzobon & Valls (1987). Their meiotic behavior is similar to that of accessions cited in this paper. The presence of associations involving five or more chromosomes besides quadrivalents (**Figures 1D to F and 2A**) suggests that autopolyploidy may have been important in the origin of these species.

Additional Brazilian accessions of the last three species above were analyzed by Takayama *et al.* (1998), all showing the tetraploid level. The meiotic behavior of four of the accessions counted by Takayama *et al.* (1998) (EEA 148, V 4331, V 9884) is analyzed here.

Most of the accessions still without a species name in the Plicatula group exhibited very limited trivalent pairing. A higher average frequency of univalents in relation to trivalents is acceptable in polyploids of an even level, because the univalents can originate from early desynapsis or failure in the formation of quadrivalent (III+I) and bivalents (I+I). The higher number of bivalents as compared to quadrivalents and univalents, and lastly to trivalents or other associations, is constant (**Figure 3F**).

Some accessions (V 4793, V 9414, V 9908 and V 9922), showed a high frequency of univalents (**Figures 2E and F**), emphasizing a lack of pairing that could be due to partial asynapsis. The presence of multiple nucleoli is common in the accessions analyzed (**Figure 2D**). The presence of multiple nucleoli in diakinesis of several *Paspalum* species has been recorded by Sacchet (1973) and in *P. plicatulum* by Nath *et al.* (1970).

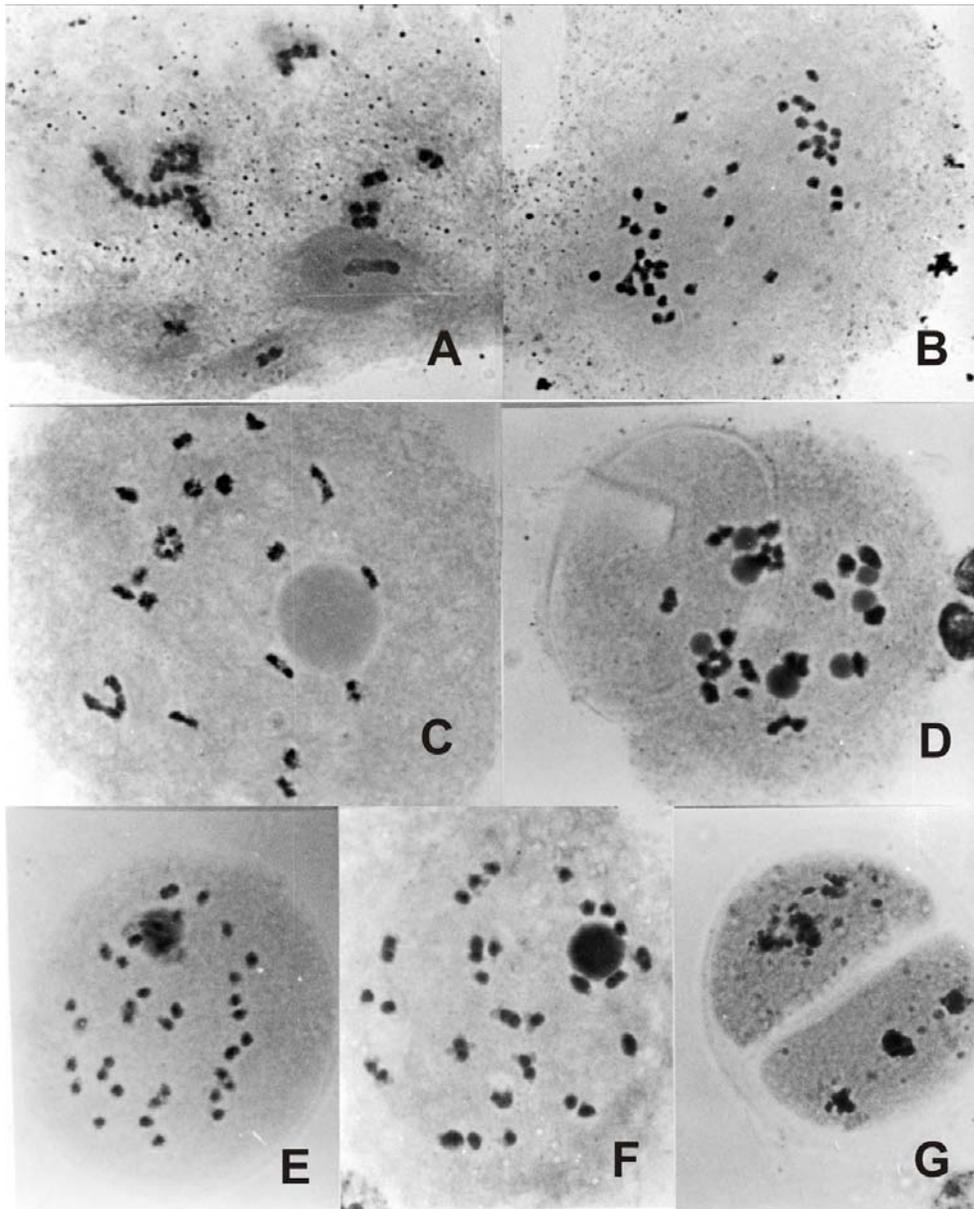


Figure 2. *Paspalum guenoarum*: A) diakinesis showing 5II + 4IV + 1VI + 1VIII; B) Unbalanced segregation at anaphase I with 15 chromosomes at one pole (top), 20 at the other (bottom), and five laggards. *Paspalum* (Plicatula group) sp: C) V 7333-A, diakinesis with 16II + 2IV; D) V 10503, diakinesis with 1I + 12II + 1III + 3IV and multiple nucleoli; E) V 9908, diakinesis with 28I + 6II; F) V 9908, diakinesis with 16I + 12II; G) V 9908, telophase II showing unbalanced chromosome segregation.

Paspalum paniculatum L. had $2n=2x=20$ chromosomes predominantly pairing as bivalents (**Figure 3E**). Univalents were present at metaphase I and laggards were occasionally observed in telophase I. Diploidy is already cited for Brazilian and Argentinean accessions of this species (Fernandes *et al.*, 1974; Honfi *et al.*, 1990). However, Honfi *et al.* (1990) also found one tetraploid accession of the species, among Argentinean materials.

Paspalum regnellii showed $2n=40$ chromosomes, which were characterized by normal pairing, with a predominance of cells with bivalents at diakinesis and metaphase I. The chromosome number is in agreement with previous evaluations carried out by Norrmann (1981) and Honfi *et al.* (1990). According to Norrmann (1981), this species reproduces sexually and is of allotetraploid origin.

Norrmann *et al.* (1989) and Pozzobon *et al.* (2000) reported $2n=40$ for brazilian accession of *P. maculosum* Trinius. The accession here studied is also tetraploid and averaged a smaller number of

quadrivalents, which may be an artifact of the small number of cells analyzed (**Figures 3A to D**). This species has been known as a diploid with a regular behavior in meiosis (Fernandes *et al.*, 1974), characterized as sexual and self-incompatible (Norrman *et al.*, 1989). The tetraploids were characterized as facultative apomictics (Norrman *et al.*, 1989). The similarity of morphological characteristics of diploids and tetraploids and the presence of multivalent associations suggest that tetraploid in this species originates from autopolyploidy (Norrman *et al.*, 1989).

The meiotic behavior of the two accessions of *P. virgatum* L. has been quite similar to that reported by Burson & Quarín (1982) for materials from Brasil and Colombia. The species is considered as sexual and meiotically stable and our data confirm the occasional occurrence of rare univalents and quadrivalents.

According to Quarín (1992), a substantial number of *Paspalum* species are characterized by apomictic autotetraploid races and sexually reproducing self-sterile diploid counterparts. Diploids may have an outstanding incidence in the genetic variability and evolution of apomictic tetraploid *Paspalum* species, by maintaining the contact of apomictic tetraploids with sexuality in mixed populations (Espinoza & Quarín, 1997; Daurélio *et al.*, 2004).

In most of the literature on the origin of tetraploids, definitions are based on the number and frequency of quadrivalents and other associations, besides morphological similarities. This would indicate the level of genome homology, either partially homologous, indicating segmental allopolyploidy, or homologous, suggesting autopolyploidy. Extensive evidence obtained in *Paspalum* supports the hypothesis that both autopolyploidy and segmental allopolyploidy may have been involved in the origin of apomictic tetraploids (Quarín, 1992; Quarín *et al.*, 2001). Evidence of autopolyploidy has been reported for some apomictic species (Quarín *et al.*, 1984; Pupilli *et al.*, 1997; Quarín *et al.*, 1998). In the present work, the results show a variable number of multivalent chromosome associations, corroborating the idea that both autopolyploidy and allopolyploidy may be involved in the origin of the Brazilian and Paraguayan tetraploid accessions of *Paspalum* investigated.

The data presented in this paper confirm the high frequency of polyploidy among the *Paspalum* species considered. This fact supports the importance of polyploidy in the evolution of tropical South American grasses and also may reflect a superior adaptability associated to the tetraploid level. The results also demonstrate that in a tetraploid species it is possible to find accessions with different degrees of meiotic irregularities. This is important to identify the best accessions for using as male progenitors in breeding programs and in the selection of promising apomictic accessions. Detailed meiotic studies should be extended to the largest possible number of accessions and species of *Paspalum* and related genera.

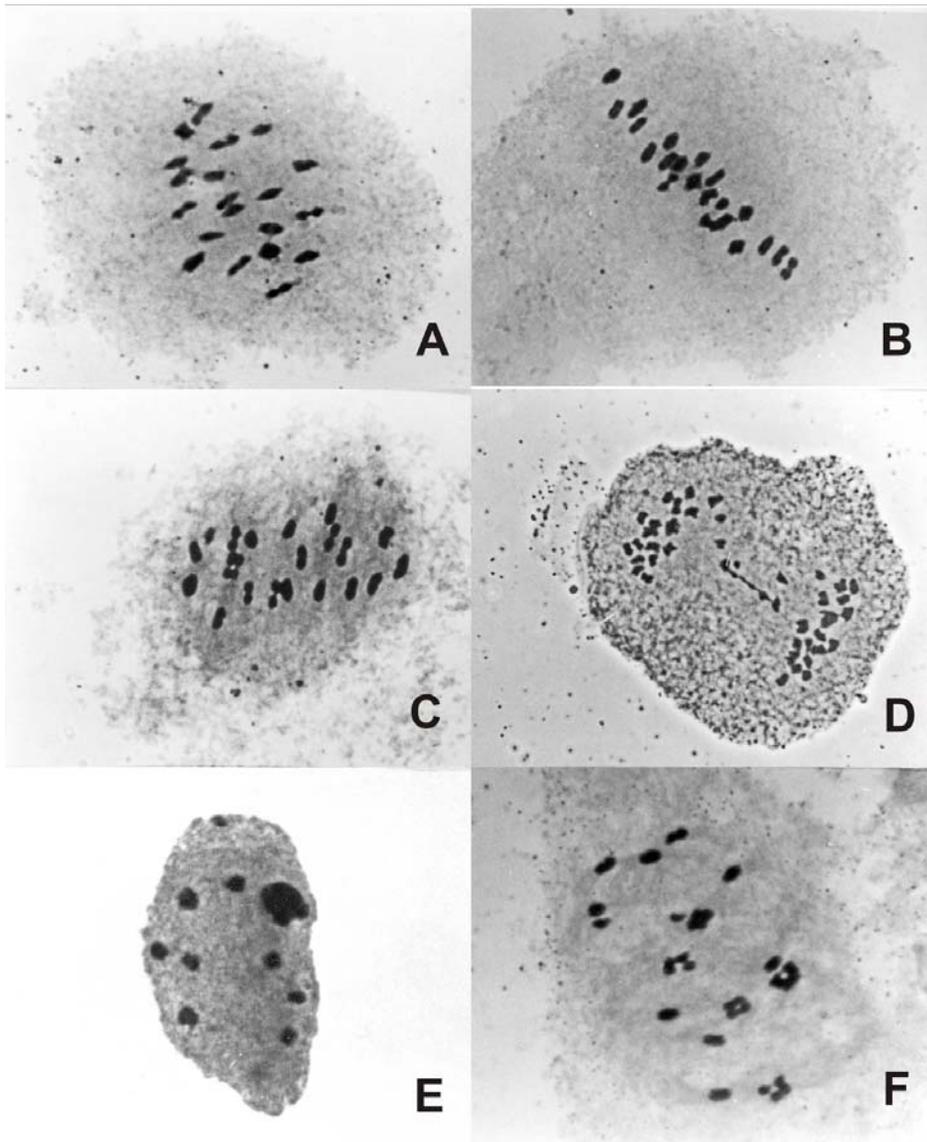


Figure 3. *Paspalum maculosum*: A) Metaphase I showing 20II, B) Metaphase I with 1I + 18II + 1III, C) Metaphase I with 16II + 2IV, D) Late anaphase I with bridge and chromosome fragments. E) *P. paniculatum*, diakinesis in with 10II. F) *Paspalum* (Plicatula group) sp. V 10504, metaphase I in with 2I + 9II + 5IV.

5. REFERENCES

Adamowski, E.V.; Pagliarini, M.S.; Bonato, A.B.M.; Batista, L.A.R. and Valls, J.F.M. 2005. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. *Genetics and Molecular Biology* 28: 773-780.

Bashaw, E.C.; Hovin, A.W. and Holt, E.C. 1970. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. *In*: Proceedings of the 11th International Grassland Congress. (Ed. M.T.J. Norman) pp. 245 - 248. (University of Queensland Press: Brisbane).

Brown, W.V. 1950. A cytological study of some Texas Gramineae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 77: 63-76.

Burson, B.L. 1975. Cytology of some apomictic *Paspalum* species. *Crop Science* 15: 229-232.

- Burson, B.L. 1978. Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. Canadian Journal of Genetics and Cytology 20: 365-372.
- Burson, B.L. and Bennett, H.W. 1971a. Chromosome numbers, microsporogenesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum* species. Crop Science 11: 292-294.
- Burson, B.L. and Bennett, H.W. 1971b. Meiotic and reproductive behaviour of some introduced *Paspalum* species. Journal of the Mississippi Academy of Sciences 17: 5-8.
- Burson, B.L. and Bennett, H.W. 1976. Cytogenetics of *Paspalum conspersum* and its genomic relationship with yellow-anthered *P. dilatatum* and *P. malacophyllum*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 18: 701-708.
- Burson, B.L. and Quarín, C.L. 1982. Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 24: 219-226.
- Burton, G.W. 1942. A cytological study of some species in tribe Paniceae. American Journal of Botany 29: 355-359.
- Burton, G.W. 1990. Grasses: New and improved. In: Janick, J. & Simon, J. E. (eds.). Advances in the New Crops. Portland: Timber Press, 1990. (p. 174-177)
- Daurelio, L.D.; Spinoza, F.; Quarín, C.L. and Pessino, S.C. 2004. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. Plant Systematic and Evolution 244: 189-199.
- Davidse, G. and Pohl, R.W. 1972. Chromosome numbers and notes on some Central American grasses. Canadian Journal of Botany 50: 273-283.
- Davidse, G. and Pohl, R.W. 1978. Chromosome numbers of tropical American grasses (Gramineae): 5. Annals of the Missouri Botanical Garden 65: 637-649.
- Espinoza, F. and Quarín, C.L. 1997. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. Australian Journal of Botany 45: 871-877.
- Fernandes, M.I.B.M.; Barreto, I.L.; Salzano, F.M. and Sacchet, A.M.O.F. 1974. Cytological and evolutionary relationships in Brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). Caryologia 27: 455-465.
- Gates, R.N.; Pedreira, C.G.S. and Quarín, C. 2004. Bahiagrass. *In*: Moser, L.E., Sollenberger, L.E., Burson, B. (Org.). Warm-Season (C4) Forage Grasses (Agronomy Monograph N°45. 1° ed. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. p.651-680.
- Honfi, A.I.; Quarín, C.L. y Valls, J.F.M. 1990. Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. Darwiniana 30: 87-94.
- Nath, J.; Swaminathan, M.S. and Mehra, K.L. 1970. Cytological studies in the tribe Paniceae, Gramineae. Cytologia 35:111-131.
- Norrmann, G.A. 1981. Citología y método de reproducción en dos especies de *Paspalum* (Gramineae). Bonplandia 17:149-158.
- Norrmann, G.A.; Quarín, C.L. and Burson, B.L. 1989. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. Journal of Heredity 80: 24-28.

- Pagliarini, M.S.; Carraro, L.R.; Freitas, P.M.; Adamowsky, E.V.; Batista, L.A.R. and Valls, J.F.M., 2001. Cytogenetic characterization of brazilian *Paspalum* accessions. *Hereditas* 135: 27-34.
- Pozzobon, M.T. and Valls, J.F.M. 1987. Caracterização citogenética em acessos de germoplasma de espécies brasileiras de *Paspalum* (Gramineae). *In*: Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de *Paspalum*, 1987, Nova Odessa. Anais., Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, pp 73-79.
- Pozzobon, M.T. and Valls, J.F.M. 1997. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 29-34.
- Pozzobon, M.T.; Valls, J.F.M. e Santos, S. 2000. Contagens cromossômicas em espécies brasileiras de *Paspalum* L. (Gramineae). *Acta Botanica Brasilica* 14: 151-162.
- Pritchard, A.J. 1970. Meiosis and embryo sac development in *Urochloa mosambicensis* and three *Paspalum* species. *Australian Journal of Agricultural Research* 21: 649-652.
- Pupilli, F.; Cáceres, M.E.; Quarín, C.L. and Arcioni, S. 1997. Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40: 822-828.
- Quarín, C.L. 1974. Relaciones citotaxonómicas entre *Paspalum alnum* Chase y *P. hexastachyum* Parodi (Gramineae). *Bonplandia* 3: 115-127.
- Quarín, C.L. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Quarín, C.L.; Burson, B.L. and Burton, G.W. 1984. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Botanical Gazette* 145: 420-426.
- Quarín, C.L. and Hanna, W.W. 1980a. Chromosome behavior, embryo sac development, and fertility of *Paspalum modestum*, *P. boscianum*, and *P. conspersum*. *The Journal of Heredity* 71: 419-422.
- Quarín, C.L. and Hanna, W.W. 1980b. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* 20: 69-75.
- Quarín, C.L. and Norrmann, G.A. 1987. Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. *In*: Forero, E.; Sarmiento, F. y La Rotta, C. (eds). Congreso Latinoamericano de Botánica, 4, 1987. Anales, Bogotá, Colombia, 3: 25-34.
- Quarín, C.L.; Pozzobon, M.T. and Valls, J.F.M. 1996. Cytology and reproductive behaviour of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica* 90: 345-349.
- Quarín, C.L.; Valls, J.F.M. and Urbani, M.H. 1997. Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grasslands* 31: 114-116.
- Quarín, C.L.; Norrmann, G.A. and Espinoza, F. 1998. Evidence for autopoloidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Hereditas* 129: 119-124.
- Quarín, C.L.; Spinoza, F.; Martinez, E.J.; Pessino, S.C. and Bovo, O.A. 2001. A rise of ploidy level induces the expresión of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* 13: 243-249.
- Reeder, J.R. 1967. Notes on Mexican grasses VI. Miscellaneous chromosome numbers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 94: 1-17.
- Sacchet, A.M.O.F. 1973. Citogenética e evolução de gramíneas naturais do Rio Grande do Sul: Grupos Plicatula e Quadrifaria-gênero *Paspalum*. M.Sc. Thesis. Curso de Pós-Graduação em Genética, UFRGS, Porto Alegre, 55p.

Takayama, S.Y.; Freitas, P.M.; Pagliarini, M.S. and Batista, L.A.R. 1998. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum* (Plicatula group) from different regions in Brazil. *Euphytica* 99: 89-94.

Valls, J.F.M. 1992. Origem do germoplasma de *Paspalum* disponível no Brasil para a área tropical. *In*: Pizarro, E.A. (ed.). Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales-RIEPT. 1ª. Reunión Sabanas. Brasília: EMBRAPA/CPAC-CIAT. pp. 69-80.

Valls, J.F.M. 2000. Impacto do conhecimento citogenético na taxonomia de *Paspalum* e *Axonopus* (Gramineae). *In*: Cavalcanti, T.B., Walter, B.M.T. (eds.) Tópicos Atuais em Botânica. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil. pp. 57-60.

Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Davidse, G.; Filgueiras, T.S.; Peterson, P.M.; Soreng, R.J. and Judziewicz, E. 2003. Catalogue of new world grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthonioideae. *Contributions from the United States National Herbarium* 46: 1-662.

ANEXO 1

Table 2. Meiotic chromosome associations in Brazilian and Paraguayan germplasm accessions of *Paspalum*.

Species/Accession	2n	N° PMCs	Average/ PMC (Range in parenthesis)				Other associations		
			I	II	III	IV			
P. alnum									
V 12326	24	22	1.1 (0-4)	9.4 (5-12)		1.0 (0-3)			
V 12396	24	19	0.3 (0-2)	9.4 (6-12)	0.1 (0-1)	1.1 (0-3)			
V 12397	24	28	0.1 (0-2)	10.2 (6-12)	0.9 (0-3)				
<i>P. atratum</i>									
Ry s/n°	40	58	1.1 (0-10)	17.5 (12-20)	0.1 (0-1)	0.9 (0-4)			
<i>P. conspersum</i>									
V 9407	60	35		30.0 (30)					
V 11726	60	83		30.0 (30)					
<i>P. guenoarum</i>									
V 8020	40	71	0.8 (0-5)	14.3 (7-20)	0.2 (0-2)	2.5 (0-6)			
V 8563	40	53	0.9 (0-4)	11.4 (4-19)	0.3 (0-2)	3.6 (1-8)	0.04V (0-1)	0.1VI (0-1)	0.02VIII (0-1)
<i>P. maculosum</i>									
V 10714*	40	46	0.7 (0-4)	18.7 (14-20)	0.1 (0-2)	0.4 (0-3)			
<i>P. plicatulum</i>									
EEA 148	40	20	1.0 (0-3)	16.2 (11-20)	0.2 (0-2)	1.5 (0-4)			
EEA 149	40	22	0.7 (0-2)	14.9 (9-20)		2.4 (0-5)			
V 4331	40	19	0.4 (0-2)	19.4 (17-20)		0.2 (0-1)			
V 7441	40	40	0.2 (0-2)	15.5 (9-20)	0.1 (0-1)	2.1 (0-5)			
<i>P. paniculatum</i>									
V 5092*	20	14	0.2 (0-2)	9.9 (9-10)					
<i>P. regnellii</i>									
V 11900	40	59		20.0 (20)					
<i>P. virgatum</i>									
V 11830	40	16	0.8 (0-4)	18.5 (13-20)	0.2 (0-2)	0.4 (0-1)			
V 11844	40	21		19.8 (18-20)		0.05 (0-1)			
<i>P. (Plicatula group) sp.</i>									
As 293	40	20	0.2 (0-2)	19.3 (18-20)	0.1 (0-1)	0.2 (0-1)			
D 163	40	22	0.5 (0-3)	13.0 (8-18)	0.2 (0-2)	3.2 (1-6)			

Species/Accession	2n	N° PMCs	Average/ PMC (Range in parenthesis)				Other associations
			I	II	III	IV	
Sv 536*	40	52	0.6 (0-4)	15.0 (8-20)	0.2 (0 - 2)	2.2 (0-5)	
V 4741	40	18	0.4 (0-2)	15.2 (10-19)	0.1 (0-1)	2.2 (0-5)	
V 4793	40	46	0.3 (0-2)	13.7 (6-18)	0.1 (0-1)	3.0 (1-10)	
V 7333-A	40	36	0.4 (0-4)	17.8 (14-20)	0.1 (0-1)	0.9 (0-3)	
V 9414	40	21	4.6 (0-10)	14.7 (11-19)	0.1 (0-1)	1.5 (0-3)	
V 9474	40	14	0.3 (0-2)	15.0 (10-18)		2.4 (1-5)	
V 9884	40	54	0.3 (0-2)	11.7 (4-18)	0.1 (0-2)	4.0 (1-8)	
V 9908	40	53	5.2 (0-28)	17.0 (6-20)	0.1 (0-1)	0.1 (0-1)	
V 9922	40	20	4.3 (2-10)	12.7 (9-17)	0.3 (0-2)	2.3 (1-4)	
V 9927	40	24	0.2 (0-2)	12.1 (6-17)	0.04 (0-1)	3.9 (1-7)	
V 10503	40	42	0.3 (0-2)	14.4 (6-20)	0.1 (0-1)	2.6 (0-7)	0.02 VI (0-1)
V 10504	40	38	0.9 (0-6)	14.2 (9-18)	0.1 (0-1)	2.6 (1-5)	
V 11912	40	19	1.4 (0-4)	16.6 (13-19)	0.1 (0-1)	1.3 (0-3)	

N° PMCs=Number of Pollen Mother Cells.

*Chromosome counts by Pozzobon *et al.* (2000)

INCIDENCIA DE ENDÓFITOS TIPO *Neotyphodium* EN FORRAJERAS NATIVAS Y NATURALIZADAS E IMPACTO AGRONÓMICO EN *Lolium multiflorum* Lam. EN LA ARGENTINA.

Colabelli, M.N.¹; Clausen, A.M.²; De Battista, J.³; Costa, M.³; Torres, M.S.¹; Re, A.³; González Wetzel, V.⁴; Peretti, A.¹; Pinget, D.⁵ y Medvescigh, J.⁶

1. RESUMEN

Los hongos endófitos del género *Neotyphodium* Glenn, Bacon y Hanlin forman asociaciones mutualísticas con numerosas gramíneas. Se han comprobado efectos benéficos del endófito en el desarrollo del hospedante aumentando su adaptación al ambiente y resistencia al ataque de insectos del suelo y nematodos, pero en las plantas infectadas se sintetizan sustancias tóxicas para los animales en pastoreo que afectan en forma negativa su sanidad y rendimiento. El hongo se desarrolla intercelularmente en los tejidos del hospedante y su dispersión se produce únicamente a través de las semillas. La Argentina cuenta con amplias áreas de pastizales conformados por gramíneas nativas y naturalizadas las que son consideradas como una fuente importante de variabilidad genética para su utilización en programas de mejoramiento genético de forrajeras. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia y cuantificar la incidencia de *Neotyphodium* spp. en colecciones de germoplasma de gramíneas nativas y naturalizadas de interés forrajero así como conocer el impacto agronómico de la infección endófitica en poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum*. El diagnóstico del endófito se realizó por coloración directa de semillas que se analizaron bajo microscopio óptico. Se detectó la presencia de micelio del endófito *Neotyphodium* con una baja incidencia en las entradas de los géneros *Bromus*, *Thinopyrum* y con una alta incidencia en el género *Lolium*. La incidencia en poblaciones de *L. multiflorum* recolectados en ambientes ganaderos fue del 100%. Ampliar la información sobre la distribución e incidencia de endófitos ayudará a los fitomejoradores en la toma de decisiones sobre el uso de los materiales para fines específicos tales como resistencia a factores bióticos y abióticos.

2. INTRODUCCIÓN

Las asociaciones entre diferentes especies de gramíneas (*Poaceae*) y los hongos endófitos de la familia *Clavicipitaceae* tribu *Balansiae* se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza, como consecuencia de la coevolución entre ambos taxa. Estas asociaciones han sido clasificadas en grupos según la forma de infección del hongo (Bacon y De Battista, 1991) y la expresión de la sintomatología externa de las plantas (White, 1988). Uno de estos grupos, el denominado Tipo 3 (White, 1988) se caracteriza porque el hongo sólo se transmite en forma asexual a través de la semilla (transmisión vertical), carece de ciclo sexual y la planta infectada no presenta síntomas externos. El género representativo del grupo es *Neotyphodium* Glenn, Bacon y Hanlin (= *Acremonium* Link Sección *Albo-lanosa* Morgan-Jones y W. Gams) (Scharndl, 1996).

La presencia de endófitos en gramíneas forrajeras se conoce desde mediados del siglo XX (Neill, 1941) pero la importancia agronómica de la asociación endófito-pasto fue reconocida sólo cuando se relacionó la presencia de *Neotyphodium* en *Festuca arundinacea* Schreb. y en *Lolium perenne* L. con enfermedades del ganado de gran importancia económica, como la festucosis ó pie de festuca y el tembleque ó “ryegrass staggers”, respectivamente (Bacon *et al.*, 1977; Fletcher y Harvey, 1981).

La asociación endófito-pasto es del tipo simbiótico-mutualista; las plantas colonizadas con estos endófitos se benefician por un aumento de su crecimiento, biomasa, tolerancia a heladas y sequías (Clay, 1988; Arachevaleta *et al.*, 1989) y resistencia a nematodos (West *et al.*, 1987), insectos (Latch *et al.*, 1985) así como a vertebrados herbívoros (Cheplick y Clay, 1988); también se han registrado efectos positivos en la competencia intra e interespecífica en plantas colonizadas con *Neotyphodium* (Marks *et al.*, 1991; Malinowski y Belesky, 2000).

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata mncolabelli@balcarce.inta.gov.ar

² INTA, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce aclausen@balcarce.inta.gov.ar

³ INTA, Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay pasconcep@correo.inta.gov.ar

⁴ Tesista, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral.

⁵ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Concepción del Uruguay.

⁶ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos.

Los endófitos se benefician en la asociación por tener asegurada su nutrición, dispersión y supervivencia (Siegel *et al.*, 1987).

Aunque la producción de alcaloides (Bacon *et al.*, 1986) registrada en la asociación beneficia a los hospedantes, estos alcaloides resultan tóxicos para los animales en pastoreo causando importantes pérdidas económicas (Hoveland, 1993; De Battista *et al.*, 1997).

La incidencia regional a nivel Sudamericano de estas asociaciones y su importancia económica ha sido revisada recientemente por De Battista (2005), quien señala la frecuente infección de *Neotyphodium* en lotes de semillas y en pasturas de *F. arundinacea*, *L. perenne* y *L. multiflorum*.

En la Argentina, la presencia de *Neotyphodium coenophialum* en pasturas implantadas de festuca alta causa importantes pérdidas en la producción ganadera (De Battista *et al.*, 1995). Han sido fijados valores máximos de infección para las semillas comercializadas. En el año 2001, un estudio reveló que sólo el 68% de los lotes de semillas de *F. arundinacea* presentes en el mercado argentino tenía un nivel de infección con *N. coenophialum* por debajo de las tolerancias admitidas (<5%), suficientemente bajo como para ser usado con seguridad en la implantación de pasturas (De Battista *et al.*, 2001). El diagnóstico de *N. lolii* en lotes de semillas de *L. perenne* comercializadas en el sudeste de la provincia de Buenos Aires reveló la presencia del endófito en el 100% del material analizado, variando el nivel de infección de 1 a 67% (Torres *et al.*, 1996). Fernández-Madrid (1995) estudió el nivel de infección de *N. lolii* en pasturas de *L. perenne* puras y consociadas implantadas en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. El 53% de las muestras presentó un nivel bajo de infección (<10%) registrándose infección alta (51a90%) en el 12% de las mismas. Estos resultados indican que la asociación *N.lolii-L. perenne* se encuentra ampliamente distribuida en la región pampeana. Odriozola *et al.*, (1993) registraron por primera vez en la Argentina (sudeste bonaerense), un caso de intoxicación de ganado que consumía pasturas puras de raigrás perenne colonizado con *N. lolii*.

Información sobre la incidencia, distribución y efectos de endófitos en distintas especies anuales de raigrás es escasa en la literatura mundial. Latch *et al.* (1987, 1988) estudiaron la incidencia de endófitos en especies anuales de raigrás en poblaciones naturales y comerciales de Europa y Nueva Zelanda. Endófitos tipo *Neotyphodium* fueron detectados en las siguientes especies: *Lolium multiflorum* Lam., *L. persicum* Boiss y Hohen, *L. remotum* Schrank, *L. rigidum* Gaudin, *L. subulatum* Visiani y *L. temulentum* L. En el caso de *L. multiflorum* se observó infección endofítica en el 50% de las poblaciones nativas, pero no en cultivares comerciales de Europa (Latch *et al.*, 1987). Por el contrario la mayoría de los cultivares de Nueva Zelanda presentaron altos niveles de infección (Latch *et al.*, 1988). Nelson y Ward (1990) detectaron la presencia de endófito en 7 de 15 cultivares comerciales de *L. multiflorum* utilizados en Texas, USA, con niveles de infección entre 13 y 94%.

Wilson *et al.* (1991b) examinaron colecciones de especies anuales de *Lolium* en el Banco de Germoplasma de la WRPIS (Western Regional Plant Introduction Station, WA, USA), detectando presencia de endófitos en *L. multiflorum*, *L. persicum*, *L. rigidum* y *L. temulentum*.

Moon *et al.* (2000) aislaron y denominaron al endófito de raigrás anual como *Neotyphodium occultans*, debido a que desarrolla muy pocas hifas en el tejido vegetativo, pudiendo observarse fácilmente sus hifas alrededor de las células aleuroníferas de la semilla.

En cuanto a gramíneas nativas y naturalizadas en nuestro país, un relevamiento de la incidencia de endófitos ha registrado su presencia en más de 30 especies (Bertoni *et al.*, 1993; Lugo *et al.*, 1998; Cabral *et al.*, 2000; Colabelli *et al.*, 2001, 2004; Iannone *et al.*, 2005), destacándose entre ellos los géneros *Festuca*, *Poa*, *Bromus*, *Lolium*, *Melica*, *Briza* y *Phleum commutatum*. Cabral *et al.* (1999) aislaron una nueva especie de *Neotyphodium* (*N. tembladeraae*) en tres especies nativas: *Festuca argentina*, *F. hieronymi* y *Poa huecu*. Vila Aiub *et al.*, (2001), detectaron el endófito también en *Hordeum comosum* de la Estepa Patagónica argentina. En la Provincia de Entre Ríos se recolectaron 83 poblaciones naturalizadas de *L. multiflorum* de los distintos departamentos y se estudió la incidencia de la infección endofítica en las mismas; los resultados mostraron una altísima frecuencia y nivel de infección. Todas las poblaciones presentaron individuos infectados y sólo el 3,6% de ellas tuvieron niveles de infección inferiores al 50%, mientras que el 89,1% alcanzaron niveles superiores al 90% (Maidana *et al.*, 1999).

Las gramíneas nativas y naturalizadas son una fuente importante de variabilidad genética para su utilización en programas de mejoramiento genético de forrajeras. En la región pampeana, se ha detectado variabilidad para caracteres agronómicos, genéticos, morfológicos y moleculares en especies nativas e introducidas de apreciado

valor forrajero tales como: *Bromus auleticus* (Traverso y Pahlen, 1982), *Paspalum distichum* (Echarte *et al.*, 1992), *Thinopyrum ponticum* (Borrajo, 1996), *L. multiflorum* (Alonso, 2004) y *Bromus catharticus* (Rosso, 2001). Por lo tanto, considerando que estos endófitos se transmiten exclusivamente por semilla, disponer de información sobre su presencia en colecciones de germoplasma forrajero constituye un aporte en la búsqueda de nuevas combinaciones endófito-pasto y de su distribución e incidencia, a la vez que añade un atributo que caracteriza a los recursos genéticos. Esto permitirá a los fitomejoradores tomar decisiones acerca del uso de los materiales para fines específicos tales como resistencia a estrés ambiental y control biológico de plagas y podría constituir una fuente de germoplasma microbial (Clement *et al.*, 1994).

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia e incidencia de hongos endófitos del género *Neotyphodium* en colecciones de germoplasma de especies forrajeras nativas y naturalizadas y en poblaciones naturalizadas de *L. multiflorum* provenientes de ambientes ganaderos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de 155 poblaciones de 30 especies de gramíneas conservadas en Bancos de Germoplasma del INTA fueron analizadas (la mayoría pertenecientes al Banco de Forrajeras de la Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce, provincia de Buenos Aires). Los materiales estudiados fueron coleccionados en pastizales de ocho provincias argentinas, encontrándose entre los 22°17' S y 41°19' S y 57°18' O y 71°33' O y desde el nivel del mar hasta los 3724m. En la **Tabla 1** se detallan los géneros estudiados y los datos de colección para cada especie. Del total de entradas analizadas, el 83% procedieron de la provincia de Buenos Aires, 8% de Río Negro, 3% de La Pampa, 2% de Córdoba y 1% de las provincias de Mendoza, Jujuy, San Luis y Chubut. Se analizó un número variable de entradas (**Tabla 1**) y de semillas de cada especie según la disponibilidad de material en los Bancos. Por cada entrada, se procesaron generalmente 40 semillas (excepto en 11 entradas cuyo número no superó las 20 semillas). El diagnóstico del endófito se realizó según la metodología de Saha *et al.* (1988). Las semillas fueron pretratadas con Na(OH) al 5% por 24 horas a temperatura ambiente y luego enjuagadas con agua común. Las semillas fueron analizadas bajo microscopio óptico (400x), para ello, cada semilla fue procesada sobre un portaobjeto separando las glumelas y teñida con rosa de bengala (ó azul de anilina) durante 2-3 minutos. En las semillas infectadas, las hifas teñidas se observan entre las células con aleurona del endosperma. Con la misma metodología se analizaron semillas de poblaciones naturalizadas de raigrás anual recolectadas en ambientes ganaderos de las provincias argentinas de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Córdoba y en la República Oriental del Uruguay (**Tabla 2**).

Tabla 1. Especies, número de entradas, condición y origen geográfico para cada especie estudiada, conservadas en Bancos de Germoplasma del INTA.

Especies y Entradas (§)	Nº de Entradas Analizadas	Condición de la Especie	Provincia de origen
<i>Alopecurus magellanicus</i> Alo 2343.	1	Nativa	Río Negro
<i>Avena barbata</i> Alo: 1828, 1833, 1831, 1852, 1853, 1919, 1918, 1917; AIG 1788; AIC: 1981,2022, 2025, 2111; CIA: 980, 982.	15	Naturalizada	Buenos Aires La Pampa Río Negro San Luis Mendoza Córdoba
<i>Bromus auleticus</i> CIA: 1041, 1059	2	Nativa	Buenos Aires
<i>Bromus brevis</i> CIA:996, 1012, 1014, 1016, 1020, 1022, 1028, 1029, 1031, 1033, 1034, 1063.	12	Nativa	Buenos Aires Río Negro La Pampa
<i>Bromus catharticus</i> CIA: 1036, 1002, 1086, 1011, 1095; CI 1013, 1040, 1035, 1036, 995; CIB: 27, 36; CCS: 1246, 1265; CI 1623; CICO: 1699, 1700.	17	Nativa	Buenos Aires Jujuy
<i>Bromus hordaceus</i> Cla 1049	1	Naturalizada	Buenos Aires

<i>Bromus lithobius</i> Alo 2359	1	Nativa	Río Negro
<i>Bromus racemosus</i> Alo 2438	1	Naturalizada	Chubut
<i>Briza rufa</i> Alo 1554 B	1	Nativa	Buenos Aires
<i>Briza subaristata</i> Alo 1553 B, CIA: 983, 1062; Oka: 7953, 7961.	5	Nativa	Buenos Aires Córdoba
<i>Dactylis glomerata</i> Cla: 338, 330, 319; Nu 219.	4	Naturalizada	Buenos Aires
<i>Danthonia cirrata</i> Alo 2462	1	Nativa	Buenos Aires
<i>Deschampsia caespitosa</i> var. <i>caespitosa</i> Alo 2341.	1	Nativa	Río Negro
<i>Elymus gayanus</i> Alo 2352.	1	Nativa	Río Negro
<i>Elytrigia scabrifolia</i> Cla: 398, 404; Alo: 1355, 1377, 1557.	5	Nativa	Buenos Aires
<i>Elytrigia scabriglumis</i> Cl: 368, 451, 464, 472, 477; CIC 896.	6	Nativa	Buenos Aires
<i>Festuca</i> sp. Alo s/n	1	Nativa	Río Negro
<i>Festuca pampeana</i> CIA 1056.	1	Nativa	Buenos Aires
<i>Festuca ventanicola</i> CIA 1058.	1	Nativa	Buenos Aires
<i>Hordeum chilense</i> Alo 2340.	1	Nativa	Río Negro
<i>Lolium multiflorum</i> AICN 1313; CIA 263; Nu: 185, 197, 199, 218, 230, 304; Cla 208, 247, 262, 263, 289; Lm1, Lm2; CIAE 216; Alo 1285, 2480; CI 1559.	19	Naturalizada	Buenos Aires
<i>Paspalum dilatatum</i> ssp. <i>Dilatatum</i> CIA: 1641, 2483; CI 1722.	3	Nativa	Buenos Aires
<i>Paspalum dilatatum</i> ssp. <i>Flavescens</i> CIA: 1626, 1634, 1687, 1689, 1691, 2484; CI 1721.	7	Nativa	Buenos Aires
<i>Paspalum notatum</i> CIA: 1627, 1636, 1656	3	Nativa	Buenos Aires
<i>Paspalum urvillei</i> CIA: 1635, 1653.	2	Nativa	Buenos Aires
<i>Phalaris aquatica</i> Nu: 210, 220; CIB: 54, 89; Bal 10897; Cla 347.	6	Naturalizada	Buenos Aires
<i>Poa iridifolia</i> CIA: 1090, 1042.	2	Nativa	Buenos Aires
<i>Poa pratensis</i> Alo 2360.	1	Naturalizada	Río Negro
<i>Sorghastrum pellitum</i> Alo 2460.	1	Nativa	Buenos Aires
<i>Thinopyrum ponticum</i> Evans: 60, 61, 67, 70, 75, 76, 103, 104, 105; CIB: 9, 42, 44, 55, 57, 64, 68, 74 c, 87, 90, 99; Alo: 1361, 1426; Cla 420; Nu: 338, 345 a, b y c; CIA: 1640, 1661, 1669, 1672, 1674, 1682.	33	Naturalizada	Buenos Aires La Pampa

Nota: (§) Coleccionista y Número de colección (Alo: Alonso; AIG: Alonso, Ispizúa, Guma; AIC: Alonso, Clausen ; CIA: Clausen, Alonso; Cl: Clausen; CIB: Celina Borrajo; CCS: Clausen, Carranza, Stábile; Cla: Clausen; Oka: Okada; CICO: Clausen, Colabelli; CIC: Clausen, Castaño; AICN: Alonso, Clausen, Nuciari; Nu: Nuciari; Lm1 y Lm2: EEA-INTA Pergamino; CIAE: Clausen, Alonso, Echarte; Bal: Banco Balcarce; Evans: Evans).

Tabla 2. Origen geográfico e incidencia de infección endofítica en poblaciones naturalizadas de raigrás anual originarios de ambientes ganaderos de la Argentina (●) y de la República Oriental del Uruguay (○).

Origen	Provincia o País	Porcentaje de infección
Ruta 6 San Vicente	Buenos Aires (●)	94,4
Pergamino	Buenos Aires (●)	78,1
Gral. Nelly	Buenos Aires (●)	89,9
Rutas 11 y 36, Pipinas	Buenos Aires (●)	87,9
Ruta 11, entre Pipinas y Verónica	Buenos Aires (●)	88,9
Mercedes	Buenos Aires (●)	89,8
Distrito Molino	Entre Ríos (●)	87,9
Oro Verde, Paraná	Entre Ríos (●)	93,1
Arroyo de la China	Entre Ríos (●)	88,5
Arroyo Pergamino, Pergamino	Buenos Aires (●)	43,3
Ruta acceso a Las Flores	Buenos Aires (●)	90,9
PI* 162455	Uruguay (○)	29,4
PI 162678	Uruguay (○)	26,7
PI 197975	Buenos Aires (●)	23,3
PI 339701	Corrientes (●)	58,3
C. del Uruguay	Entre Ríos (●)	56,7
Marcos Juárez	Córdoba (●)	93,3

*Material recibido de EE.UU.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron hifas de *Neotyphodium* en las entradas de los Bancos de Germoplasma del INTA correspondientes a los géneros *Bromus catharticus* (cebadilla criolla), *Lolium multiflorum* (raigrás anual) y *Thinopyrum ponticum*, (agropiro alargado) (Tabla 3). En todos los casos, se observó el micelio intercelular característico.

Los porcentajes de infección (Tabla 3) fueron de 8% para la población de agropiro alargado y de 15% para la población de cebadilla criolla, siendo superiores en raigrás anual (50% a 100%). Solamente una entrada de raigrás anual fue libre de endófito (población AICN1313). Sobre 19 poblaciones de raigrás anual conservadas en los Bancos de Germoplasma, el 95% presentó individuos infectados, con una frecuencia media de infección de 82% (Tabla 3). En cambio, para cebadilla criolla y agropiro alargado, la frecuencia de poblaciones infectadas fue muy baja: 6% (1 en 17 analizadas) y 3% respectivamente.

Todas las poblaciones colonizadas con el endófito provenían de colectas realizadas en la provincia de Buenos Aires. En las especies de las restantes entradas analizadas, no se encontraron hifas del endófito.

Tabla 3. Incidencia de endófitos tipo *Neotyphodium* en poblaciones provenientes de la provincia de Buenos Aires, Argentina, conservadas en Bancos de Germoplasma del INTA.

Entradas	Localidad más próxima	Porcentaje de infección
<i>Bromus catharticus</i> CIB 36	Dolores	15
<i>Lolium multiflorum</i>		
Alo 1285	General Belgrano	95
Alo 2480	Balcarce	69
Cla208	Benito Juárez	100
Cla247	Tapalqué	80
Cla262	Ruta 63, Las Flores	100
Cla263	Las Flores	50
Cla 289	Ruta 50 y 30, Rauch	100
CIA 263	Rauch	76
CIAE 216	Benito Juárez	58
CI 1559	Coronel Dorrego	100
Nu 185	Lobos	85
Nu197	Río Salado	80
Nu199	Las Flores	100
Nu218	Arroyo Cortaderas, Azul	100
Nu230	Coronel Vidal	50
Nu 304	Madariaga	94
Lm1	Azul	83
Lm2	Delta	50
<i>Thinopyrum nticum</i>		8
Evans 105		

Los resultados del presente trabajo confirman la presencia de *Neotyphodium* en distintas especies forrajeras, la que fue registrada anteriormente por diferentes autores: en poblaciones del género *Bromus* (White, 1987; Nelson *et al.*, 1993b), en poblaciones de *B. auleticus* y *B. setifolius* (Cabral *et al.*, 1999, 2000), en *B. catharticus* y *B. hordaceus* (Piontelli y Toro, 1992), en *B. brachyanthera* (Iannone *et al.*, 2005); en poblaciones del género *Agropyron* (Nelson *et al.*, 1993; Nan, 2000), y en *Lolium multiflorum* (Latch *et al.*, 1987; Piontelli y Toro, 1989, 1992; Maidana *et al.*, 1999; De Battista, 2002).

En este trabajo, exceptuando la población de *B. catharticus*, no fue registrada la presencia del endófito fúngico en las poblaciones analizadas de las especies *B. auleticus*, *B. brevis*, *B. hordaceus*, *B. lithobius* y *B. racemosus*. En *Festuca pampeana* y *F. ventanícola* no fue registrada la presencia de *Neotyphodium*, coincidiendo estos resultados con los encontrados por Bertoni *et al.* (1993).

Tampoco fue detectado el micelio del hongo en *Briza subaristata*, concordando con los resultados encontrados por Lugo *et al.* (1998). Sin embargo, recientemente, Iannone *et al.* (2005) registraron la presencia de *Neotyphodium* en *Briza* af. *subaristata*. Para poblaciones de *Briza rufa*, no hay registros al respecto.

En los géneros *Avena*, *Danthonia*, *Paspalum*, *Phalaris* y en *Poa iridifolia* no existen antecedentes de la presencia de estos endófitos, tal como se ha registrado en este trabajo.

En *Poa pratensis*, se conocen datos de muy bajo porcentaje de infección, (0,5%, Nan, 2000) ó no infección (Sun y Breen, 1993), lo que coincide con los resultados de este trabajo. En seis especies del género *Poa* (*P. bergii*, *P. bonariensis*, *P. lanigera*, *P. lanuginosa*, *P. af. ligularis*, *P. resinulosa*) se han registrado y caracterizado recientemente, endófitos del género *Neotyphodium* (Iannone *et al.*, 2005).

Si bien se ha consignado la presencia de *Neotyphodium* en los géneros *Elymus*, *Elytrigia* y en *Deschampsia caespitosa* (Nan, 2000), así como también en *Alopecurus* (Zabalgogazcoa *et al.*, 2000), en las poblaciones argentinas analizadas de estos géneros, no fue observado el micelio del hongo endófito coincidiendo con Rolston *et al.* (2002) quienes tampoco lo registraron para el género *Elymus*.

Al igual que lo registrado por Wilson *et al.* (1991a) para germoplasma estadounidense de *Hordeum chilense* no se encontró infección del hongo en la población de la misma especie procedente de la provincia de Río Negro. Tampoco se registró la presencia del endófito en *Dactylis glomerata*, lo que coincide con lo registrado por Nelson *et al.* (1993b) a pesar de existir antecedentes al respecto (Piontelli y Toro, 1989; Guillaumin *et al.*, 2000).

Las entradas que resultaron positivas para la presencia del endófito provienen de la provincia de Buenos Aires. En Argentina, se ha observado una correspondencia entre la distribución de los endófitos y las características agroclimáticas del lugar, con un incremento del número de pastos infectados de norte a sur y de este a oeste (Cabral *et al.*, 2000). Esta información coincide con el bajo número de entradas infectadas con el hongo endófito registrado en este relevamiento ya que representa sólo un 13%.

La incidencia en poblaciones de *L. multiflorum* recolectadas en ambientes ganaderos fue del 100%, no habiéndose detectado ninguna población libre de este tipo de endófitos (**Tabla 2**).

4.1. Impacto agronómico de la infección endofítica en *Lolium multiflorum* Lam.

No ha habido a la fecha informes que indiquen efectos tóxicos o disminución de la productividad en bovinos que pastorean raigrás anual (Nelson y Ward, 1990). Esto podría estar relacionado a las variaciones inter e intraespecíficas observadas en la capacidad de producción de ergoalcaloides y lolitremos en distintas asociaciones *Neotyphodium*/gramínea. Así, TePaske *et al.* (1993) evaluaron el contenido de lolinas y ergoalcaloides en diversas asociaciones detectando sólo la presencia de lolinas en las especies anuales del género *Lolium*. Los datos disponibles sugieren la ausencia de ergoalcaloides en las distintas especies anuales de raigrás infectadas, por lo que no se deberían esperar efectos tóxicos relacionados con estos alcaloides. La presencia de lolinas podría asociarse con repelencia a insectos fitófagos.

La alta incidencia de *N. occultans* en poblaciones naturalizadas lleva a suponer que la infección endofítica confiere al raigrás anual alguna ventaja adaptativa, al menos en su ambiente natural. Efectos positivos sobre la adaptación de las plantas al medio se han demostrado en las asociaciones *N. coenophialum*-*Festuca arundinacea* y *N. lolii*-*Lolium perenne* (Malinowski y Belesky, 2000).

Existe escasa información sobre el impacto de la infección con *N. occultans* sobre el comportamiento de genotipos o poblaciones de raigrás anual. Nelson *et al.* (1995) detectaron mayores rendimientos de forraje en líneas infectadas que libres. En Concepción del Uruguay (Entre Ríos, Argentina), trabajando con una población naturalizada, se observó un efecto similar, donde la población infectada produjo entre un 7-10% más forraje que la libre, acumulando esa diferencia en los dos primeros cortes (De Battista, datos inéditos).

La presencia del endófito en raigrás anual incrementó su capacidad y velocidad de germinación en condiciones sin estrés hídrico o con estrés moderado. A su vez, modificó el crecimiento inicial produciendo plántulas con menos macollos pero más pesados y con hojas más largas (Medvescigh *et al.*, 2004a y b). También este autor (datos inéditos) detectó importantes incrementos en la producción de semilla de raigrás anual infectado respecto de la misma población libre de endófito.

Latch *et al.* (1988) y Prestidge (1991) han postulado que existe una ventaja adaptativa para las poblaciones de raigrás anual que se encuentran infectadas con *N. occultans*, lo que ha resultado en que la mayoría de los ecotipos neocelandeses se hallen infectados. Parecería ser que la ventaja adaptativa ocurre principalmente durante la resiembra natural. Por otro lado, se ha comprobado que *N. occultans* confiere a la plántula de raigrás resistencia a *Listronotus bonaerensis* (Dymock *et al.*, 1989), pero no a la planta adulta (Piggot *et al.*, 1988; Prestidge, 1991).

Nelson *et al.* (1993a) informaron sobre una significativa reducción del daño por *Schizaphis graminum* cuando el raigrás anual se encuentra infectado. Omacini *et al.* (2001) observaron una mayor densidad del áfido *Rhopalosiphum padi* en raigrás anual libre que en el infectado (228,8 vs 38,0/m²), pero no respecto al *Metopolophium festucae*. Es interesante destacar que este efecto fue observado 6 meses después de la siembra, indicando actividad sobre insectos en plantas adultas.

Otro aspecto estudiado de la asociación *N. occultans/L. multiflorum* es la evolución de la pérdida de viabilidad del hongo a medida que aumenta la edad de la semilla. Es conocido que la viabilidad de los endófitos de festuca y raigrás perenne disminuye con el tiempo llegando a ser cero luego de 14-16 meses de almacenamiento en condiciones ambientales normales (Williams *et al.*, 1984; Maddaloni *et al.*, 1989). Medvescigh *et al.* (2004c) estudiaron la pérdida de viabilidad de una población altamente infectada de raigrás anual y observaron que a diferencia de lo que ocurre en raigrás perenne y festuca, el endófito del raigrás anual mantiene durante mayor tiempo altos niveles de hongo viable en la semilla. Esta característica del endófito de raigrás anual podría asociarse al ciclo de vida del huésped, ya que por su ciclo anual depende de la conservación de la viabilidad del hongo para perpetuar la asociación en resiembras naturales.

Teniendo en cuenta los múltiples efectos que los endófitos tipo *Neotyphodium* ejercen sobre las gramíneas y en particular sobre el raigrás anual se enfatiza la importancia de la conservación conjunta de ambos simbiontes en los programas de conservación de germoplasma.

5. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de micelio de endófitos del género *Neotyphodium* en el 13% de las entradas analizadas de distintos Bancos de Germoplasma. Dicha presencia se constató en cebadilla criolla, raigrás anual y agropiro alargado, sobre entradas coleccionadas en la provincia de Buenos Aires.

La incidencia del endófito en las poblaciones de cebadilla criolla (*B. catharticus*) y en las de agropiro alargado (*T. ponticum*) fue baja (6% y 3%, respectivamente), en cambio, muy alta en raigrás anual (*Lolium multiflorum*), tanto en poblaciones conservadas en los Bancos (95%), como en poblaciones de ambientes ganaderos (100%).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, S.I. 2004. Evaluation of italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations naturalized in the flooding pampa of Argentina: I—Morphological and physiological characters at the juvenile stage. Genetic Resources and Crop Evolution, Netherlands, 51: 747-758.

Arachevaleta, M.; Bacon, C.W.; Hoveland, C.S. and Radcliffe, D.E. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. Agronomy Journal, Madison, v.81, n.1, p.83-90.

Bacon, C.W. and de Battista, J. 1991. Endophytic fungi of grasses. *In*: Arora, D.K.; Rai, B.; Mukerji, K.G. & Knudsen, G.R. (eds). Handbook of Applied Mycology. V.1: Soil and Plants. New York: Marcel Dekker. p.231-257.

Bacon, C.W.; Lyons, P.C.; Porter, J.K and Robbins, J.D. 1986. Ergot toxicities from endophyte infected grasses: a review. Agronomy Journal, Madison, v.78, n.1, p.106-116.

Bacon, C.W.; Porter, J.K.; Robbins, J.D. and Luttrell, E.S. 1977. *Epichlöe typhina* from toxic tall fescue grasses. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.34, n.5, p.576-581.

- Bertnoni, M.D.; Cabral, D.; Romero, N. y Dubcovsky, J. 1993. Endófitos fúngicos en especies Sudamericanas de *Festuca* (*Poaceae*). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires, v.29, n.1-2, p.25-34.
- Borrajo, C.L. 1996. Estudio de la variabilidad en poblaciones de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) naturalizado en los pastizales pampeanos: caracterización del porte, color, altura y número de macollos. Balcarce: Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias. 71p. (Tesis Graduación).
- Cabral, D.; Cafaro, M.J.; Saidman, B.; Lugo, M.; Reddy, P.V. and White, J.F.Jr. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia*, Lawrence, v.91, n.2, p.315-325.
- Cabral, D.; Novas, M.V. and White, J. 2000. *Neotyphodium* endophytes: incidence, diversity and hosts in South America. *In*: INTERNATIONAL NEOTYPHODIUM/GRASS INTERACTIONS SYMPOSIUM, 4, Soest, 27/29 set. 2000. Proceedings. Soest: University of Paderbon. p. 34.
- Cheplick, G.P. and Clay, K. 1988. Acquired chemical defenses of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos*, Copenhagen, v.52, n.3, p.309-318.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, Brooklyn, v.69, n.1, p.10-16.
- Clement, S.L.; Kaiser, W.J. and Eichenseer, H. 1994. *Acremonium* endophytes in germplasms of major grasses and their utilization for insect resistance. *In*: Bacon, C.W. and White, J.F.Jr. (eds.). *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. Florida: CRC Press, Boca Raton. p.185-199.
- Colabelli, M.N.; Torres, M.S.; Peretti, A. y Clausen, A.M. 2001. Relevamiento de endófitos en semillas de especies nativas y naturalizadas de los géneros *Avena*, *Bromas*, *Festuca* y *Poa* en la Argentina. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12, Curitiba, 16/20 set. 2001. Informativo ABRATES, Londrina, v.11, n.2, p. 314. (Resumos, 530).
- Colabelli, M.N.; Torres, M.S.; Clausen, A.M y Peretti, A. 2004. Incidencia de hongos endófitos en colecciones de gramíneas forrajeras nativas y naturalizadas en la Argentina. Informativo ABRATES, Pelotas, v.14, N°.1,2,3. p.80-87.
- De Battista, J. 2002. El endófito de raigrás anual. *In*: REUNION ANUAL SOBRE FORRAJERAS. EL PASTO: EL RECURSO MAS BARATO, Pergamino, 8 nov. 2002. CD Rom. Pergamino: INTA EEA Pergamino. s.p.
- De Battista, J. 2005. *Neotyphodium* research and application in South America. *In*: *Neotyphodium* in Cool Season Grasses. C. Roberts, C. West and D. Spiers (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. p. 63-69.
- De Battista, J.; Peretti, A.; Carletti, S.; Ramirez, A.; Costa, M. y Schultz, I. 1995. Evolución de la incidencia de la infección de *Acremonium coenophialum* en la oferta de semilla de festuca alta en Argentina. Período 1987-1994. *Revista Argentina de Producción Animal*, Balcarce, v.15, n.1, p.300-302.
- De Battista, J.; Altier, N.; Galdames, D.R. and Dall'Agno, M. 1997. Significance of endophyte toxicosis and current practices in dealing with the problem in South America. *In*: Bacon, C.W. and Hill, N.S. (eds.). *Neotyphodium/Grass Interactions*. New York: Plenum Press. p.383-388.
- De Battista, J.; Peretti, A.; Sala, M.; Schultz, I.; Costa, M.; Francomano, V.; Salvat, A.; Medvescigh, J. and Bazzigalupi, O. 2001. Evolution of the incidence of *Neotyphodium coenophialum* infection on tall fescue seed market in Argentina. Period 1995- 2000. *In*: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS, 26, Angers, 18/20 jun. 2001. Seed Symposium. Angers: ISTA. p.16.

Dymock, J.J.; Latch, G.C.M. and Tapper, B.A. 1989. Novel combinations of endophytes in ryegrasses and fescues and their effects on Argentine stem weevil (*Listronotus bonarensis*) feeding. Proceed. Of the 5th Australasian Conference on Grassland Invertebrate Ecology. p. 28-34.

Echarte, A.M.; Clausen, A.M. y Sala, C.A. 1992. Números cromosómicos y variabilidad morfológica de *Paspalum distichum* (*Poaceae*) en la provincia de Buenos Aires (Argentina). Darwiniana, San Isidro, v.31, n.1-4, p.185-197.

Fernandez-Madrid, J.C. 1995. Diagnóstico de *Acremonium lolii* en pasturas de *Lolium perenne* L. implantadas en algunos partidos del sudeste bonaerense. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía. 61 p. (Tesis Graduación).

Fletcher, L.R. and Harvey, I.C. 1981. An association of *Lolium* endophyte whit ryegrass staggers. New Zealand Veterinary Journal, Wellington, v.29, n.10, p.185-186.

Guillaumin, J.J.; Frain, M.; Pichon, N. and Ravel, C. 2000. Presence of fungal endophytes in wild grass species in the Auvergne, central France. *In*: INTERNATIONAL NEOTYPHODIUM / GRASS INTERACTIONS SYMPOSIUM, 4, Soest, 27/29 set. 2000. roceedings. Soest: University of Paderbon, p.22.

Hoveland, C.S. 1993. Importance and economic significance of *Acremonium* endophytes to performance of animals and grass plant. Agricultural Ecosystem Environmental, Amsterdam, v.44, n.1, p.3-12.

Iannone, L., Giusani, L. y Cabral, D. 2005. Caracterización de nuevos endófitos en gramíneas nativas. *In*: JORNADAS ARGENTINAS DE BOTANICA, 40, Rosario, 6/10 nov. 2005. Actas. Rosario: Sociedad Argentina de Botánica. p. 160.

Latch, G.C.M.; Christensen, M.J. and Gaynor, D.L. 1985. Aphid detection of endophyte infection in tall fescue. New Zealand Journal of Agronomy Research, Wellington, v.28, n.1, p.129-132.

Latch, G.C.M; Porter, L.R. and Tyler, B.G. 1987. Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species. Annals of Applied Biology, Cambridge, v.111, n.1, p.59-64.

Latch, G.C.M.; Christensen, M.C. and Hickey, M.J. 1988. Endophytes of annual and Hybrid ryegrasses. N.Z.J. Agric. Res. 31:57-63.

Lugo, M.A.; Anton, A.M. y Cabral, D. 1998. Presencia y distribución de micofilas en gramíneas de Argentina. Anales Jardín Botánico, Madrid, v.56, n.1, p.15-22.

Maddaloni, J.; Sala, M. y Carletti, S. 1989. Viabilidad del hongo endófito (*Acremonium coenophialum* Morgan-Jones & Gams) en semilla de festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.). Buenos Aires: INTA EEA Pergamino. 12 p. (Informe Técnico, 224).

Maidana, A.; Medvescigh, J.; Gonzalez, H.; Sabattini, R.; De Battista, J. y Costa, M. 1999. Identificación, determinación de la incidencia y viabilidad del hongo endofítico en *Lolium multiflorum* Lam (raigrás) en pastizales naturales modificados de Entre Ríos. *In*: JORNADAS FITOSANITARIAS ARGENTINAS, 10, Jujuy, 7/9 abr. 1999. Actas. Jujuy: Facultad de Ciencias Agrarias/ Universidad Nacional de Jujuy. p.82.

Malinowski, D.P. and Belesky, D.P. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Science, Madison, v.40, n.4, p.923-940.

Marks, S.; Clay, K. and Cheplick, G.P. 1991. Effects of fungal endophytes on interspecific and intraspecific competition in the grasses *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. Journal of Applied Ecology, Oxford, v.28, n.2, p.207-214.

Medvescigh, J.; De Battista, J. P.; Del Longo, A. and Costa, M. 2004 a. Effect of *Neotyphodium occultans* infection and substrate water potential on annual ryegrass seed germination. Proceedings. Session III Ecology and Agronomy. 5th *Neotyphodium* Symposium. 23-26 May. Fayetteville, Arkansas, EE.UU. p. 315 b.

Medvescigh, J.; De Battista, J. P.; Del Longo, A. and Costa, M. 2004 b. Effect of endophyte infection and water stress on annual ryegrass seedling growth. Proceedings. Session III Ecology and Agronomy. 5th *Neotyphodium* Symposium. 23-26 May. Fayetteville, Arkansas, EE.UU. p. 315 a.

Medvescigh, J.; Maidana, R.; De Battista, J.P. and Costa, M. 2004 c. Annual ryegrass endophyte viability evolution under storage conditions. A note. Proceedings. Session V Technology Transfer and Quality Assurance. 5th *Neotyphodium* Symposium. 23-26 May. Fayetteville, Arkansas, EE.UU. p. 514.

Moon, C.D.; Scott, D.B.; Schardl, C.L. and Christensen, M.J. 2000. The Evolutionary origins of *Epichloe* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia*, Bronx, 92:1103-1118.

Nan, Z.B. 2000. *Neotyphodium* in native grasses in China and observations on endophyte/host interactions. *In*: INTERNATIONAL *NEOTYPHODIUM*/GRASS INTERACTIONS SYMPOSIUM, 4, Soest, 27/29 set. 2000. Proceedings. Soest: University of Paderbon. p.10.

Neill, J.C. 1941. The endophytes of *Lolium* and *Festuca*. *New Zealand Journal of Science and Technology*, Wellington, v.23 A, p.185-193.

Nelson, L.R. and Ward, S.L. 1990. Presence of fungal endophyte in annual ryegrass. *Proceed. Int. Symp. On Acremonium/Grass Interactions*. Quisenberry, S.S. y Joost, R.E. (eds.). Baton Rouge, LA. Louisiana Agric. Ept. Sta. p. 41-43.

Nelson, L.R.; Harrington, M. and Marshall, D. 1993 a. Effectiveness of *Acremonium lolii* in annual ryegrass in controlling greenbug *Schizaphis graminum Rondani* injury. *Proceed. of XVII Int. Grassland Congress*. New Zealand. p. 931-932.

Nelson, L.R.; Marshall, D. and Tunali, B. 1993 b. Exploration for fungal endophyte in *Lolium* and other grass species of central Turkey. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *ACREMONIUM*-GRASS INTERACTIONS, 2, Palmerston North, febr.1993. Proceedings. Palmerston North: Ag Research, Grasslands Research Centre. Hume, D.E.; Latch, G.C.; Easton, H.S. (eds.). p.11-13.

Nelson, L.R.; Evers, G.W.; Crowder, J. and Ward, S.L. 1995. Effect of endophyte on seed weight, germination, tillering, biomass, heading date and forage yield on annual ryegrass. *Third Int. Herbage Seed Conference*. (Halle, Germany). *Book of Abstracts*. p.134.

Odriozola, E.; Lopez, T.; Campero, C. and Gimenez-Placeres, C. 1993. Ryegrass staggers in heifers: a new mycotoxicosis in Argentina. *Veterinary and Human Toxicology*, Manhattan, v.35, n.2, p.144-146.

Omacini, M.; Chaneton, E.J.; Ghersa, C.M. and Müller, C.B. 2001. Symbiotic Endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature*, London, 409: 78-81.

Piggot, G.J.; Morgan, H.M. and Bakker, R.J. 1988. Endophytes in Northland ecotypes of hybrid ryegrass. *Proceed.*

41st. Weed and Pest Control Conference 41:129-131.

Piontelli, E. y Toro, M. 1989. Asociación de endófitos fúngicos-pastos forrajeros en suelos chilenos. Estudio preliminar. I. Boletín Micológico, Valparaíso, v.4, n.2, p.101-107.

Piontelli, E. y Toro, M. 1992. 1993. Endófitos fúngicos en comunidades de pastos naturales: distribución en algunas especies de *Lolium*, *Festuca*, *Bromus* y *Stipa*. In: CONGRESO NACIONAL DE FITOPATOLOGIA, 3, Valparaíso, 14/16 set. 1992. Simiente, Santiago de Chile, v.63, n.2, p.112. (artículo 27).

Prestidge, R.A. 1991. Susceptibility of Italian ryegrasses (*Lolium multiflorum* Lam.) to Argentine stem weevil (*Listronotus bonaerensis* (Kuschel)) feeding and oviposition. N.Z.J. Agric. Res. 34:119-125.

Rolston, M.P.; Stewart, A.V.; Latch, G.C.M. and Hume, D.E. 2002. Endophytes in New Zealand grass seeds: occurrence and implications for conservation of grass species. New Zealand Journal of Botany, Wellington, v.40, p.365-372.

Rosso, B.S. 2001. Colecta y caracterización de cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.) en la región central de Argentina. In: PROCISUR. Los recursos fitogenéticos del género *Bromus* en el cono Sur. Montevideo: IICA. p.99-102. (Serie Diálogo, LVI).

Saha, C.D.; Jackson, M.A. and Johnson-Cicalese, J.M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. Phytopathology, St. Paul, v.78, n.2, p.237-239.

Schardl, C.L. 1996. *Epichloe* species: fungal symbionts of grasses. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.34, p.109-130.

Siegel, M.R.; Latch, G.C.M. and Johnson, M.C. 1987. Fungal endophytes of grasses. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.25, p.293-315.

Sun, S. and Breen, J.P. 1993. Inhibition of *Acremonium* endophyte by Kentucky bluegrass. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *ACREMONIUM*-GRASS INTERACTIONS, 2, Palmerston North, febr. 1993. Proceedings. Palmerston North: Ag Research, Grasslands Research Centre. Hume, D.E.; Latch, G.C.; Easton, H.S. (eds.). p.19-22.

Tepaske, M.R.; Powell, R.G. and Clement, S.L. 1993. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. Agricultural and Food Chemistry 41: 2299-2303.

Torres, M.S.; Peretti, A.; Colabelli, M.N. y Alonso, S. 1996. Presencia del hongo endófito *Acremonium lolii* en semillas de *Lolium perenne* L. In: JORNADAS ARGENTINAS DE BOTANICA, 25, Mendoza, 17/22 oct. 1996. Actas. Mendoza: Sociedad Argentina de Botánica. p.103.

Traverso, J. y Pahlen, A. 1982. Variabilidad en *Bromus auleticus* (Trin. Ex Ness). Buenos Aires: INTA EEA Pergamino. 12p. (Publicación Técnica, 41).

Vila Aiub, M.M.; Demartin, E.B.; Maseda, P.; Gundel, P.E. y Ghersa, C.M. 2001. Exploración de la presencia de hongos endofíticos en pastos de la Estepa Patagónica. In: REUNIÓN BINACIONAL DE ECOLOGÍA, 1, Bariloche, 23/26 abr. 2001. Actas. Bariloche:Universidad Nacional del Comahue. p.239.

White, J.F.Jr. 1987. The widespread distribution of endophytes in *Poaceae*. Plant Disease, S^t.Paul, v.71, n.4, p.340-342.

White, J.F.Jr. 1988. Endophyte-hot associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. Mycologia, Bronx, v.80, n.3, p.442-446.

Wilson, A.D.; Clement, S.L. and Kaiser, W.J. 1991 a. Endophytic fungi in a *Hordeum* germoplasm collection. Plant Genetic Resources Newsletter, Rome, v.87, p.1-4.

Wilson, A.D.; Clement, S.L. and Kaiser, W.J. 1991 b. Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germplasm by direct staining and aphid assays. Plant Disease, St. Paul, 75: 169-173.

Williams, M.J.; Backman, P.A.; Clark, E.M. and White, J.F. 1984. Seed treatments for control of the tall fescue endophyte *Acremonium coenophialum*. Plant Disease, St. Paul, v.68, n.1, p.49-52.

West, C.P.; Izekor, E.; Oosterhuis, D.M. and Robbins, R.T. 1987. Endophytic fungus effects on tall fescue tolerance of drought and nematodes. Arkansas. Farm Research, Fayetteville, v.36, n.6, p.3

Zabalgogazcoa, I.; Vasques de Aldana, B.R.; Garcia Criado, B. and Garcia Ciudad, A. 2000. Fungal endophytes in natural grasslands of western Spain. *In*: INTERNATIONAL *NEOTYPHODIUM*/GRASS INTERACTIONS SYMPOSIUM, 4, Soest, 27/29 set. 2000. Proceedings. Soest: University of Paderbon. p.126.

APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES AL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL GÉNERO *Bromus*

Pagano, E.M.¹; Rosso, B.²; Rimieri, P.²; Rios, R.D.¹

1. RESUMEN

El género *Bromus* incluye varias especies utilizadas como forrajeras en regiones de clima templado. Algunas de estas especies son difíciles de identificar y se han mencionado en las publicaciones bajo diferentes denominaciones. Los caracteres morfofisiológicos y agronómicos que son utilizados para la caracterización de germoplasma no proporcionan, en algunos casos, una adecuada estimación de la variabilidad genética. Para profundizar el conocimiento de esta temática se aplicaron técnicas de marcadores moleculares en poblaciones naturales y cultivadas de *Bromus catharticus*, *Bromus stamineus*, *Bromus brevis*, *Bromus auleticus* y *Bromus inermis*. Los marcadores RAPDs han resultado útiles tanto para la identificación de especies como para la caracterización de la variabilidad intraespecífica.

Palabras claves: *Bromus*, germoplasma, variabilidad genética, marcadores moleculares

2. INTRODUCCIÓN

En Argentina crecen unas 30 especies del género *Bromus*, 13 de las cuales son exóticas mientras que las restantes son nativas (Gutiérrez y Pensiero, 1998). Estas especies se caracterizan por una amplia distribución geográfica y una buena capacidad de adaptación a diversas condiciones edafoclimáticas. Dentro de este género, la especie que ha sido más estudiada es la cebadilla criolla (*B. catharticus* Vahl.), originaria de la región Pampeana húmeda de la República Argentina, con un área de difusión que se extiende a Uruguay, sur de Brasil y centro norte de Chile. Esta es una especie hexaploide de reproducción sexual, preferentemente autógama, con la característica de producir flores casmógamas o cleistógamas de acuerdo a la época del año (Ragonese y Marcó, 1941; Ragonese y Marcó, 1943). Al respecto, los trabajos de Cladera y Pahlen (1984) y Morant (1990) han mostrado una baja tasa de alogamia. García y Arturi (1992) sugirieron que el vigor de las semillas provenientes de casmogamia daría una ventaja adaptativa de los individuos heterocigotas.

Las clasificaciones de las especies del género *Bromus* están basadas en caracteres morfológicos (Mathei, 1986; Stewart, 1996; Gutiérrez y Pensiero, 1998; Planchuelo y Peterson, 2000). También el análisis de la variabilidad fenotípica a través de estudios de poblaciones, cultivares y líneas de *B. catharticus* Vahl realizados en programas de mejoramiento de nuestro país, se han concentrado básicamente en características morfo-agronómicas (Pérez López, 1975; Pahlen 1986; Pistorale y Wolff 1996; Rosso, 2001) incluyendo algunos trabajos la determinación de parámetros genéticos (Arturi *et al.*, 1983; Szpiniak *et al.*, 1995; Gioco, 2002; Aulicino y Arturi, 2002; Wolff *et al.*, 2006). Además, los caracteres morfofisiológicos y agronómicos son utilizados para la caracterización de germoplasma y descripción de cultivares para su inscripción.

Sin embargo, en algunos casos, éstos no proporcionan una cuantificación adecuada de la variabilidad genética, la que puede ser sobreestimada debido a la plasticidad fenotípica (Novoplansky, 2003) que presenta esta forrajera. Los marcadores moleculares pueden extender y complementar la caracterización basada en descripciones morfológicas y bioquímicas proveyendo de información más segura y detallada que la clásica fenotípica (Karp *et al.*, 1997). Su uso permite estudiar de forma directa la variación del ADN que no es influida por el ambiente. La aplicación de esta metodología ha tenido impacto en la caracterización de la diversidad de los recursos genéticos vegetales y fue utilizada en varios aspectos como identificación de duplicaciones, desarrollo de estrategias de muestreo y validación de técnicas de multiplicación (Karp, 2002).

Aplicando marcadores moleculares se pueden reconocer directamente las diferencias genéticas entre individuos, obteniéndose un perfil molecular característico para cada variedad e independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas (Szczepaniak *et al.*, 2002).

¹Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF), CICVyA, INTA Castelar

²EAA INTA Pergamino, Argentina. rrios@cnia.inta.gov.ar

Además de permitir obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada, pueden proveer información sobre frecuencias alélicas, nivel de heterocigosis de una población en forma más eficiente que usando estrategias convencionales de caracterización morfológica (Forster *et al.*, 2001).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) es una técnica que permite obtener polimorfismos de fragmentos amplificados a través del uso de *primers* cortos y de secuencia arbitraria para amplificar regiones del genoma usando PCR bajo condiciones de baja especificidad. Así, los sitios de amplificación de los *primers* se distribuyen al azar a lo largo del genoma. La técnica es simple y ha sido ampliamente utilizada para la evaluación de estudios sobre diversidad genética, investigaciones de hibridación, eventos de introgresión e investigación de estructuras y procesos poblacionales (Harris, 1999). Sin embargo, para su correcta aplicación deben tomarse diferentes precauciones, como el control estricto de las condiciones de trabajo y se recomienda (dada la naturaleza anónima de las bandas y la dificultad de establecer homologías) circunscribir su utilización a nivel específico o infraespecífico y al momento de establecer comparaciones, utilizar únicamente cálculos de distancia genética en los cuales no intervengan análisis parsimoniosos (Xena de Enrech, 2000).

Hay muy pocos antecedentes de la aplicación de marcadores moleculares al estudio de variabilidad genética nuclear en las especies nativas del género *Bromus*. Además de los estudios moleculares que aquí se presentan conducidos en forma colaborativa entre el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF) del CICVyA, INTA Castelar y la EEA INTA Pergamino, se puede citar a Massa *et al.* (2001) que encontraron correlaciones significativas entre patrones de AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) y distribución geográfica de especies de la sección *Ceratochloa* de la Patagonia argentina.

El objetivo general de este trabajo es la aplicación de marcadores moleculares al estudio de la variabilidad genética en el género *Bromus*, con los objetivos específicos de estudiar la diversidad genética en diferentes tipos de poblaciones cultivadas y naturales, generar información que permita ampliar la base genética utilizada en el cultivo de este género y mejorar la conservación de estos recursos genéticos nativos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se inició con la puesta a punto de las técnicas de RAPD y AFLP en cebadilla criolla. Con estas metodologías se estudió la variabilidad genética de cultivares comerciales argentinos y franceses y posteriormente, se analizaron con RAPD poblaciones de distintos *Bromus* conservadas en el Banco de Germoplasma de la EEA INTA Pergamino.

3.1 Material genético estudiado

La aplicación de marcadores moleculares en cebadilla criolla se inició en la década del '90 sobre una muestra de los cultivares disponibles en el mercado nacional y de líneas experimentales avanzadas del programa de mejoramiento genético del INTA. Sobre las líneas experimentales los mejoradores realizaron una selección de fenotipos contrastantes en ancho de lámina, porte, ciclo y macollaje, los cuales también fueron analizados molecularmente.

Los estudios continuaron con el análisis de 20 poblaciones de *B. catharticus*, colectadas en localidades de la región Pampeana Húmeda en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe, en un área comprendida entre los 30°23' y 39°24' Lat. S y 58°47' y 62°37' Long. O y posteriormente se incluyeron poblaciones colectadas al oeste de Córdoba y San Luis. También se analizaron 4 poblaciones de *B. stamineus*.

Además, se incluyeron los cultivares Martín Fierro MAG (*B. catharticus*), Zamba (*B. stamineus*), Pampera (*B. auleticus*) y Ona (*B. inermis*), algunos de los cuales ya habían sido analizados en los primeros estudios y en consecuencia fueron seleccionados para ser utilizados como controles en los análisis posteriores.

Recientemente se analizaron también 8 poblaciones de *B. brevis* colectadas en la provincia de La Pampa y conservadas en EEA INTA Anguil.

Se incluyó también una población *B. parodii*.

Actualmente se están analizando 20 poblaciones de *B. stamineus* y 12 poblaciones de *B. auleticus*.

3.2 Metodología de laboratorio y análisis de datos

Para la extracción de ADN cada entrada fue representada por un *bulk* de 10 plántulas de aproximadamente 4-5 semanas desde la germinación. Para las reacciones de PCR, se utilizaron *primers* informativos de la serie Operon. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa 2% (p/v) disueltos en buffer TBE, conteniendo bromuro de etidio y fueron fotografiados bajo luz ultravioleta. Para el análisis, cada marcador RAPD fue considerado como un locus cuyos dos alelos fueron identificados por la presencia o ausencia de una banda particular. Con la información obtenida se construyó una matriz básica de datos y la estimación de la similitud genética fue calculada de acuerdo a Jaccard (1908). Los resultados de esta matriz se procesaron mediante el análisis de agrupamiento, con la técnica UPGMA y se generaron dendogramas. El paquete estadístico utilizado fue NTSYS-pc versión 2.02g (Rohlf, 1998).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que las metodologías AFLP y RAPDs (Puecher *et al.*, 1998), generaron información semejante, por razones de simplicidad técnica y costo, se continuaron los trabajos con el método RAPDs (Puecher *et al.*, 2001a). Se determinó que la técnica de RAPDs es útil por su rapidez y reproducibilidad para evaluar la variabilidad de cebadilla criolla, además de permitir discriminar otras especies del género *Bromus* y que con un bajo número de individuos (10-15) se representa la variabilidad de las poblaciones de cebadilla criolla (Puecher *et al.*, 2001a). En el dendograma derivado de un análisis de agrupamiento, (**Figura 1**) se puede observar que los cultivares argentinos, al igual que los obtenidos en Francia (Maribel, Anabel y Bellegarde) resultaron ser muy semejantes, con un coeficiente de similitud de 90%. Por otro lado, el grupo *B. catharticus* se distanció ampliamente de *B. stamineus*. Cabe aclarar que MFierro 1 a 3 corresponden a distintas procedencias del viejo cultivar Martín Fierro MAG y que los indicados como cvExp son cultivares sintéticos experimentales no inscriptos.

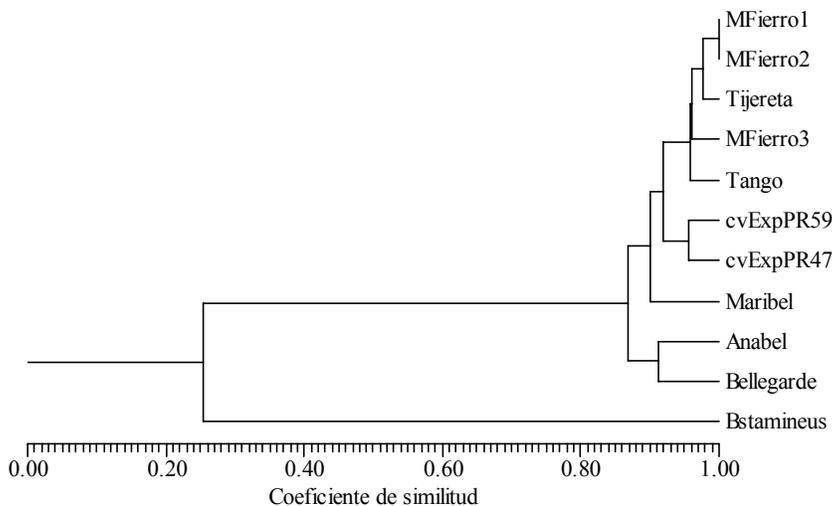


Figura 1. Dendograma obtenido por análisis cluster (UPGMA), basado en el coeficiente de similitud de Jaccard en cultivares de *Bromus catharticus*

Los resultados de la evaluación con marcadores moleculares de la variabilidad genética existente en cultivares y poblaciones naturales de cebadilla criolla mostraron niveles de similitud muy altos lo que indicó una estrecha base genética de la muestra de materiales de *B. catharticus* estudiados (Puecher *et al.*, 2001a y b). La caracterización fenotípica de estas mismas poblaciones naturales provenientes de la región pampeana húmeda mostró resultados similares (Rosso, 2001). Por otro lado estos resultados no concordaban con lo encontrado por varios autores, en cuanto a que cebadilla criolla presenta una alta variabilidad fenotípica (Pérez López 1975, Arturi *et al.*, 1983, Pahlen 1986, Garcia y Arturi 1992, Spiniak *et al.*, 1995, Wolff *et al.*, 1996). Esta discrepancia puede explicarse teniendo en cuenta la plasticidad fenotípica (Bradshaw, 1965) fenómeno que ha sido mencionado para el género *Bromus* (Forde y Edgar, 1995). De acuerdo a nuestros trabajos la variabilidad genética en cebadilla criolla es reducida y coincidimos con lo propuesto por Aulicino y Arturi 2002, en cuanto a que esta especie presenta la

habilidad de responder a cambios ambientales con caracteres plásticos que le proporcionan una estrategia adaptativa en períodos cortos.

Como se expresó hasta aquí los resultados moleculares mostraban un bajo nivel de variabilidad genética en poblaciones naturales en coincidencia con lo detectado previamente en los cultivares comerciales. Para profundizar el estudio se analizaron por RAPDs genotipos de cebadilla criolla seleccionados en el programa de Mejoramiento de la EEA INTA Pergamino por su morfología contrastante y no fue posible establecer una relación entre la variación morfológica y la molecular ya que nuevamente la variabilidad molecular fue reducida, no siendo posible delinear criterios de selección, posiblemente debido a la marcada plasticidad fenotípica determinada por Gieco *et al.* (2002) para la especie.

Luego de estos resultados obtenidos se decidió continuar con los estudios moleculares de diversidad genética en poblaciones colectadas en zonas marginales al cultivo de esta especie, en las provincias de San Luis y Oeste de Córdoba. En estos estudios se incorporaron poblaciones de otras especies del mismo género que coexisten con *B. catharticus*: 4 poblaciones y el cultivar Zamba de *B. stamineus*, una población de *B. brevis* y los cultivares Pampera INTA de *B. auleticus* y Ona de *B. inermis*. Los resultados indican que la similitud genética es mayor dentro de cada especie (*B. catharticus* y *B. stamineus*) y el análisis de agrupamiento permitió distinguir claramente a las 5 especies, a un valor de similitud de 50%. (Figura 2). A un valor superior al 70% de similitud se agruparon las poblaciones de *B. catharticus* colectadas en localidades de la región Pampeana Húmeda en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe. Sin embargo, una población del Oeste de Córdoba y una de San Luis se agruparon aproximadamente al 85% de similitud entre si, presentaron una distancia (52-54%) con respecto al resto de poblaciones de *B. catharticus*, lo cual no había sido detectado en ninguno de los análisis de las muestras anteriormente estudiadas (Sellaro *et al.*, 2005). Se destaca que la inclusión de las poblaciones de *B. catharticus* colectadas fuera de las áreas de utilización de la especie como pastura cultivada, permitió ampliar el espectro de variabilidad genética. Estos resultados sugieren que es posible encontrar variabilidad para ser utilizada en los programas de mejoramiento de esta especie nativa, considerada una de las gramíneas de mayor valor forrajero.

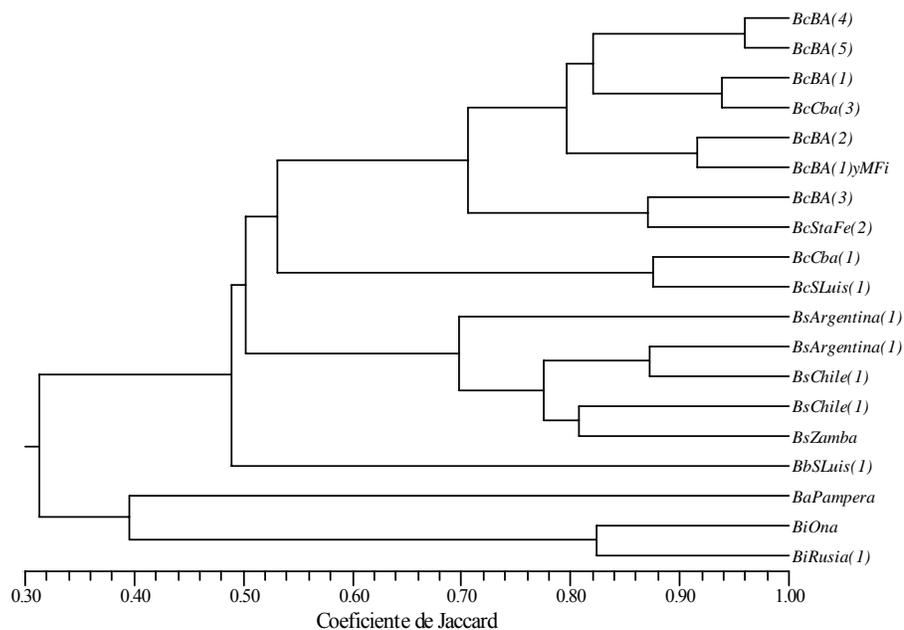


Figura 2. Dendrograma obtenido por análisis cluster (UPGMA), basado en el coeficiente de similitud de Jaccard en poblaciones y cultivares de *Bromus*.

Referencias: *Ba*: *Bromus auleticus*, *Bb*: *Bromus brevis*, *Bc*: *Bromus catharticus*, *Bi*: *Bromus inermis*, *Bs*: *Bromus stamineus*. BA: Buenos Aires, Cba: Córdoba, StaF: Santa Fé.

El número entre (.) corresponde al número de poblaciones en ese grupo.

Los cultivares son: Mfi: Martín Fierro MAG, Zamba, Pampera INTA y Ona.

Actualmente, debido a la necesidad de buscar variabilidad genética novedosa fuera del área de cultivo de la cebadilla criolla y a la coexistencia geográfica y/o superposición en caracteres morfológicos de otras especies de

Bromus con la misma, se ha decidido intensificar el estudio de diversidad genética de poblaciones de especies nativas como *B. brevis*, *B. parodii*, *B. stamineus* y *B. auleticus*. El análisis preliminar de las poblaciones de *B. brevis* (Cuyeu *et al.*, 2005), muestra que las mismas forman claramente un grupo separado de otras especies, pero con una amplia variabilidad intrapoblacional. Es importante destacar que las poblaciones de *B. brevis* presentaron una marcada distancia comparada al resto de las especies del género incluidas en el estudio, lo cual nos está confirmando una vez más la utilidad de marcadores RAPDs tanto para la caracterización de la variabilidad intraespecífica como así también para su diferenciación con otras especies del género *Bromus*.

5. CONCLUSIONES

En este contexto, las relaciones filogenéticas de las divisiones del género *Bromus* son controvertidas. Así, a modo de ejemplo, Gutierrez y Pensiero (1998) indican en la sección *Ceratochloa* que la especie tipo es *B. wildenowii* Kunt. (= *B. catharticus* Valh.) y las especies representadas en Argentina son *B. bonariensis*, *B. brevis*, *B. catharticus*, *B. coloratus*, *B. lithobius*, *B. mango*, *B. parodii*, *B. stamineus* y *B. tunicatus*. Pero, por otro lado, Planchuelo y Peterson (2000) no reconocen dentro de *Ceratochloa* a *B. brevis* Nees ex Steud. (Cámara Hernández, 1978) y *B. burkartii* Muñoz (Matthei, 1986), lo cual discrepa con los autores anteriores y con Naranjo 1992. En consecuencia, no hay consenso en cuanto al tratamiento sistemático de las especies del género *Bromus*, en gran parte debido a que los caracteres utilizados no permiten una aceptable discriminación o son insuficientes para permitir la delimitación de algunas especies. Es por ello, que la información generada a través de los marcadores moleculares puede resultar un aporte importante a la clasificación taxonómica de las especies del género *Bromus*.

Por otro lado, un mejor entendimiento de la variación genética dentro y entre especies, facilitará el mejoramiento genético permitiendo el desarrollo de nuevos tipos forrajeros más productivos, persistentes y de mejor calidad nutricional en pasturas cultivadas. El uso de pasturas en la recuperación de ecosistemas pastoriles, con el avance de la degradación de los ecosistemas naturales y el desplazamiento de la ganadería, también necesita del conocimiento de esa variación genética. Además, se logrará una conservación más eficiente de estos recursos genéticos nativos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arturi, M.J.; Marchetta, M.; Rapela, M. y Mujica, M. 1983. Variabilidad y correlaciones en cebadilla criolla. Rev. Fac. Agron. La Plata 59(1-2):191-197.

Aulicino, M. and Arturi, M. 2002. Phenotypic diversity in Argentinian populations of *Bromus catharticus* (Poaceae). Genetic and environmental components of quantitative traits. N.Z.J. of Botany, Vol. 40: 223-234.

Bradshaw, A. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. Adv. Genet. 13: 115-155.

Cámara Hernández, J. 1978. *In*: Nicora. Gramineae. Flora patagónica. Colección científica del INTA. Buenos Aires 8, 3:77-93.

Cladera, J. and Pahlen, A. 1984. Genetic and populational study of esterases on *Bromus catharticus* Vahl. Bol. Gen. Inst. Fitot. 12:25-30. INTA Castelar.

Cuyeu, A.; Pagano, E.M.; Rosso, B.; Traverso, J. y Rios, R.D. 2005. Caracterización molecular de poblaciones de *Bromus brevis* En *Journal of Basic & Applied Genetics*. Actas XXXIV Congreso Argentino de Genética, GMV pp.

Forde, M. and Edgar, E. 1995. Checklist of pooid grasses naturalised in New Zealand. 3 Tribes Bromeae and Brachypodieae. New Zealand Journal of Botany, 33: 35-42.

Forster, J.; Jones, E.; Kölliker, R.; Drayton, M.; Dupal, M.; Gu, K. and Smith, K. 2001. Application of DNA profiling to outbreeding forage species. En *Plant Genotyping: The DNA fingerprinting of plants*. Ed. Henry, R.J., Lismore, Australia. CAB International.

- García, M. y Arturi, M. 1992. Variabilidad fenotípica en progenies de *Bromus catharticus* Vahl, originadas de flores chasmógamas y cleistógamas. Rev. Fac. Agron. La Plata 68:27-33.
- Gieco, L. 2002. Caracterización genética y agronómica de genotipos de Cebadilla Criolla (*Bromus catharticus* Vahl.) con morfotipos diferentes para delinear criterios de selección. Tesis M.Sc, UNR-INTA, Rosario, Argentina.
- Gieco, L.; Pagano, E.M.; Rios, R. y Rimieri, P. 2002. Caracterización molecular de líneas selectas de cebadilla criolla. V Encuentro Latino-Americano de Biotecnología Vegetal. Buenos Aires. REDBIO.
- Gutiérrez, H. y Pensiero J. 1998. Sinopsis de las especies argentinas del género *Bromus* (Poaceae). Darwiniana 35 1-4: 75-114.
- Harris, S.A. 1999. RAPDs in systematics - A useful methodology? In: Advances in Molecular Systematics (Hollingsworth, P.M. *et al.*, eds.). Taylor & Francis, London, pp 211-228.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 1985. Descriptor list for forage grasses. Roma, Italia, pp 1-30.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.. 44 :223-270.
- Karp, A. 2002. The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity? *In*: Engels, J.M.M; Ramanatha Rao, V; Brown, A.H.D; Jackson, M.T. (eds) Managing Plant Genetic Diversity. Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI, pp 43-56.
- Karp, A.; Kresovich, S.; Bhat, K.V.; Ayad, W.G. and Hodgkin, T. 1997. Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a Guide to the Technologies (IPGRI technical bulletin N°. 2). International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Massa, A.; Larson, S.; Jensaen, K. and Hole, D. 2001. AFLP Variation in *Bromus* Section *Ceratochloa* germplasm of Patagonia. Crop Sci. 41:1609-1616.
- Matthei, O. 1986. El género *Bromus* L. (Poaceae) en Chile. Gayana, Bot. 43 (1-4): 47-110.
- Morant, A. 1990. Determinación del porcentaje de fecundación cruzada en cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.). Tesis M.Sc, UNR-INTA, Rosario, Argentina
- Naranjo, C.A. 1992. Estudios biosistemáticos en especies de *Bromus* (sección *Ceratochloa*, Poaceae). I. Sistemas reproductivos y barreras de aislamiento. Darwiniana, 31:173-183.
- Novoplansky, A. 2002. Developmental plasticity in plants: implications of noncognitive behavior. Evolutionary Ecology 16:177-188.
- Pagano, E.M.; Rosso, B.; Rimieri, P. y Rios, R.D. 2005. Aplicación de marcadores moleculares al estudio de la variabilidad genética en el género *Bromus* (Poaceae). *En Journal of Basic & Applied Genetics*. Actas XXXIV Congreso Argentino de Genética. S2, pp 44-45
- Pahlen, A. 1986. Evaluation of genetic variability of some native forage plants. Bol. Gen. Inst. Fitot. 14:1-6.
- Pérez López, F. 1975. Estudio de variabilidad en *Bromus unioloides* de diferentes habitats. Tesis M.Sc, Esc. Grad. Cs. Agrop., INTA Castelar.
- Pistorale, S. y Wolff, R. 1996. Estrategia reproductiva en *Bromus catharticus* Vahl. (cebadilla criolla). Componentes del rendimiento. XXVII Congreso Argentino de Genética. 39º Reunión Anual Soc de Biología de Chile. Viña del Mar, Chile. Pp. 135.

- Planchuelo, A.M. and Peterson, P.M. 2000. The species of *Bromus* (*Poaceae*: by S.W.L Jacobs and J. Everett. CSIRO Publishing, Collinwood, Australia. pp. 89–101.
- Puecher, D.; Robredo, C.; Ríos, R.D. y Rimieri, P. 1998. Evaluación de la variabilidad por RAPDs en *Bromus catharticus* Vahl.. Congreso Argentino de Botánica. Río Cuarto, Octubre de 1998.
- Puecher, D.I.; Robredo C.G.; Rios, R.D. and Rimieri, P. 2001a. Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 121: 229–236.
- Puecher, D.; Robredo, C.; Pagano, E.; Rimieri, P. y Rios, R. 2001b. Evaluación de la variabilidad genética en poblaciones naturales de cebadilla criolla a través de RAPD. IV Encuentro Latino-Americano de Biotecnología Vegetal. Brasil. REDBIO.
- Ragonese, A. y Marcó, P. 1941. Observaciones sobre la biología floral de cebadilla criolla. *Rev. Arg. Agron.* 8(3):196-199.
- Ragonese, A. y Marcó, P. 1943. Influencia del fotoperíodo sobre la formación de flores cleistógamas y chasmógamas en cebadilla criolla. *Rev. Arg. Agron.* 10(2):178-185.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc.
- Rosso, B. 2001. Colecta y caracterización de cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.) en la región central de Argentina. En: *Diálogo LVI, Los recursos fitogenéticos del género Bromus en el Cono Sur/PROCISUR.* pp 99-101.
- Sellaro, R.; Pagano, E.M.; Rosso, B.; Rimieri, P. and Rios, R.D. 2005. Genetic characterization of prairie grass (*Bromus catharticus* Vahl.) natural populations. *In: Molecular Breeding for the genetic improvement of forage crops and turf.* Ed M. O. Humphreys. Section 8: Genetic diversity, genetic resources and breeding systems. pp 266
- Stewart, A.V. 1996. Potential value of some *Bromus* species of the Section *Ceratochloa*. *N.Z.J. Agric. Res.* 39:611-618.
- Szczepaniak, M.; Cieślak, E. and Bednarek, P. 2002. Morphological and AFLP variation of *Elymus repens* (L.) Gould (poaceae). *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 547–558.
- Szpiniak, B.; Ferreira, V. and Sepiarsky, A. 1995. Variabilidad en Cebadilla criolla del sur de Córdoba. *Proced. XXIII Congreso Argentino de Genética.* P 28. Wolff, R., Abbott, L. and Pistorale, S. 1996. Reproduction behaviour of *Bromus catharticus* Vahl (Cebadilla criolla) in natural and cultivated populations. *J. Genet. and Breed.* 50:122-128.
- Wolff, R.; Abbott, L. and Pistorale, S. 1996. Reproduction behaviour of *Bromus catharticus* Vahl (Cebadilla criolla) in natural and cultivated populations. *J. Genet. and Breed.* 50:122-128.
- Wolff, R.; Abbott, L. and Pistorale, S. 2006. Estimation of genetic parameters in *Bromus catharticus* Vahl. *Journal of Basic & Applied Genetic* 17(1): 51-59.
- Xena de Enrech, Nereida. 2000. Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. (Revisión Biología) *Acta Científica Venezolana*, 51: 197–206.

EVALUACIÓN BAJO PASTOREO DE DOS MATERIALES DE *Bromus stamineus* E. Desv. SELECCIONADOS EN CHILE

Ortega, F.¹; Rojas, C.¹; Seguel, I.¹ y Levío, J.¹

1. RESUMEN

Según antecedentes botánicos el género *Bromus* comprende a nivel mundial alrededor de 400 especies, de las cuales 24 están presentes en Chile. A pesar de las bondades de este género, en Chile no se han valorizado estos recursos y han sido otros países quienes han seleccionado cultivares a partir de ellos. La presente investigación consideró la evaluación del comportamiento productivo, durante cuatro temporadas, de dos selecciones de *Bromus stamineus* E. Desv., BR1 y BR2 y su relación con especies forrajeras de uso comercial en Chile (*Bromus stamineus* cv. Gala, *Festuca arundinacea* cv. Quantum y *Lolium perenne* cv. Nui). Los resultados indican que en una primera temporada las selecciones de *B. stamineus* BR1 y BR2 presentaron un menor rendimiento inicial al ser comparados con *L. perenne* cv. Nui pero igual que *F. arundinacea* cv. Quantum. En una segunda temporada se observó un aumento del rendimiento de BR2 en relación a los demás materiales evaluados. En la tercera temporada BR2 alcanzó un rendimiento significativamente superior a las otras gramíneas. Los resultados de la evaluación del rendimiento acumulado de cuatro temporadas en condición de pastoreo rotativo bovino demuestran que BR2 fue superior en un 22% al cultivar Gala y en 54% a *L. perenne* cv. Nui. Lo anterior estaría demostrando que existe un potencial real de incorporar variedades del género *Bromus* seleccionadas en Chile como alternativa forrajera en el Sur del país.

Palabras claves: Domesticación, *Bromus*, especie nativa, Chile

2. INTRODUCCIÓN

El género *Bromus* comprende a nivel mundial alrededor de 400 especies (Stewart, 1996), de las cuales 24 están presentes en Chile (Matthei, 1986). Su taxonomía no está clara; la mayor parte de las publicaciones neocelandesas se basan en Forde y Edgar (1995), la que discrepa de lo descrito por Matthei (1986), autor que describe a *Bromus stamineus* (Syn. *B. valdivianus*) en la sección *Ceratochloa* del género *Bromus*. En esta presentación se utilizará la denominación *Bromus stamineus* E. Desv. para los dos materiales colectados y seleccionados BR1 y BR y para la variedad comercial Gala.

Las especies de este género son una alternativa forrajera interesante por su amplia distribución y adaptación a diversas condiciones, *B. stamineus* E. Desv forma parte de las praderas naturales en el centro sur y sur de Chile y tiene entre sus principales atributos agronómicos la resistencia a la sequía estival, su crecimiento relativamente uniforme a través del año, su elevada persistencia en comparación a otras gramíneas introducidas y la inexistencia de limitaciones nutricionales ya que no tiene asociación con hongos endófitos.

A pesar de las bondades de este género, en Chile no se han aprovechado estos recursos genéticos. En cambio, han sido otros países como Nueva Zelanda quienes los han utilizado para liberar al mercado variedades que se comercializan a nivel mundial y que incluso Chile importa actualmente. Tal es el caso por ejemplo, de *Bromus stamineus* cv. Gala, la única variedad comercial en Chile, que fue seleccionada en Nueva Zelanda a partir de recursos genéticos de la zona cordillerana central de Chile (Stewart, 1992). Recientemente en Nueva Zelanda fue liberada la variedad Bareno, descrita como *Bromus valdivianus* y de origen genético también chileno (Charlton y Stewart, 2000).

El objetivo general de esta línea de investigación ha sido valorizar los recursos genéticos naturalizados del género, priorizando en primera instancia aquellos de la sección *Ceratochloa* del género *Bromus*. En el marco del proyecto

¹ INIA Carillanca, Temuco, Chile. Correo-e: fortega@inia.cl

binacional Argentina-Chile financiado por PROCISUR “Colección de germoplasma forrajero en los bosques andinos patagónicos” se realizaron tres campañas de colecta de germoplasma entre 1994 y 1996, cubriendo entre los grados 38° y 54° Lat.S por ambos lados de la cordillera (Zappe y otros, 1999), dando lugar a una colección inicial de 115 accesiones de *Bromus* pertenecientes a 12 especies. De estas accesiones, 76 fueron caracterizadas y evaluadas agrónomicamente (Seguel y otros, 1999) y las de mejor comportamiento fueron sometidas a dos ciclos de selección masal intrapoblacional.

A partir del año 2001 se inició una serie de ensayos en diversas localidades y condiciones para evaluar el comportamiento agronómico de dos accesiones de *B. stamineus* E. Desv (BR1 y BR2), en comparación al cultivar neocelandés de *B. stamineus* Gala y otras gramíneas adaptadas a la zona. En este trabajo se describen los resultados de un ensayo con cuatro años de evaluación en condiciones de pastoreo rotativo con bovinos en una localidad (INIA Carillanca).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en INIA Carillanca (38°41' L.S y 72°25' L.W, 200msnm) en un suelo transicional con características de Ultisol, de textura franco arcillosa, de topografía plana a ligeramente ondulada, y clase III de capacidad de uso del suelo. La composición química inicial indicó 9% de materia orgánica, 27mg kg⁻¹ de P Olsen, 25ppm de N, 0,95cmol+ kg⁻¹ de K, 4.8 de pH H₂O, 0.73cmol+ kg⁻¹ de Al, 8.4% Al saturación y 8.69cmol+kg⁻¹ de suma de bases. La temperatura media anual en cobertura en el sector es de 11,2°C en primavera y de 15,5°C en verano, con una precipitación media anual de 1.350mm, según los registros de INIA Carillanca.

La siembra del ensayo se realizó el 6 de abril de 2001 ajustando la dosis de siembra para obtener 880 semillas viables m⁻² para *Lolium perenne* L. (ballica perenne) y *Festuca arundinacea* Schreb. (festuca) y 400 semillas viables m⁻² para *Bromus*. El ensayo se sembró sin leguminosa acompañante y durante todo el período experimental se mantuvo libre de leguminosas y malezas de hoja ancha aplicando herbicidas. La dosis de semilla utilizada, así como el peso de la semilla para cada material se indica en el **Cuadro 1**. La siembra se hizo a chorro continuo en hileras distanciadas a 20cm. El diseño experimental correspondió a bloques completos al azar con cuatro repeticiones. El tamaño de cada parcela fue de 30m² (5x6m).

Cuadro 1. Peso de semilla, dosis de siembra y población a la emergencia de accesiones de *Bromus stamineus* y cultivares testigo de *Festuca arundinacea* Schreb. y *Lolium perenne* L. INIA Carillanca (Temuco, Chile)

TRATAMIENTO	Número de semillas g ⁻¹	Dosis de siembra		Plantas m ⁻²
		kg ha ⁻¹	Semilla m ⁻²	14-05-2001
<i>F. arundinacea</i> Quantum	526	14.0	884	280 b
<i>L. perenne</i> Nui	433	16.8	884	672 a
<i>B. stamineus</i> BR1	150	28.4	512	325 b
<i>B. stamineus</i> Gala	90	37.5	400	295 b
<i>B. stamineus</i> BR2	147	27.2	478	296 b
Signif.	-	-	-	**

**indica diferencias significativas (P≤0,01).

Cifras seguidas por distinta letra en sentido horizontal indican diferencias significativas. (Duncan, P≤0.05).

La fertilización de establecimiento y mantención se realizó de acuerdo a los resultados de análisis de suelo según lo indicado en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Fertilización al establecimiento y de mantención en cada temporada del ensayo. INIA Carillanca (Temuco, Chile)

	Establecimiento		Mantención		
	2001	2001	2002	2003	2004
N (kg/ha)	32	40	80	110	120
P₂O₅ (kg/ha)	150	0	100	100	80
K₂O (kg/ha)	25	0	80	80	80
S (kg/ha)	0	0	36	36	36
CaO (kg/ha)	0	0	66	526	296

A la emergencia de las plántulas se detectó el ataque del gorgojo de las ballicas (*Listronotus bonariensis*), razón por la cual se aplicó el insecticida Oxamilo (Vydate, L, 2L i.a. ha⁻¹) en cuatro oportunidades (18-05-01; 12-06-01; 28-06-01 y 3-08-01). En las siguientes temporadas se controló a salidas de invierno-inicios de primavera (13-08-02; 24-06-03; 9-07-04) cuncunilla negra (*Dalaca spp.*) con el insecticida Lambdacihalotrina (Zero, 200cc i.a. ha⁻¹). Por otro lado, para el control de plantas de hoja ancha se aplicó la mezcla de herbicidas Dicamba (Banvel-D, 250cc i.a. ha⁻¹) + MCPA (MCPA 750, 1000cc i.a. ha⁻¹) el 11-09-01, 21-10-02, 29-09-03 y 6-07-04.

El ensayo se manejó con pastoreo rotativo con novillos de aproximadamente 250kg de PV cada uno. El pastoreo se realizó en forma simultánea en todo el ensayo, sin dividir entre repeticiones, en un lapso de 3 a 5 horas.

Las evaluaciones fueron:

- Recuento de plantas a la emergencia (14-05-01). Se contó el número de plantas en medio metro de doce hileras centrales de cada parcela (superficie evaluada 1,2m²/parcela) y se expresó como número de plantas m⁻².
- Rendimiento de materia seca y composición botánica: se evaluó 1,0m² de la parte central de cada parcela (2 cuadrantes de 0,5m² c/u) a una altura de 4 a 5cm. Una submuestra del material verde de 100 a 150gramos fue secada en horno a 65°C durante 48 horas para obtener el % de materia seca y estimar el rendimiento en kg MS ha⁻¹. Otra submuestra de aproximadamente 100gramos de materia verde fue separada en especie sembrada y malezas para estimar la contribución de la especie pura en base a materia seca obtenida según procedimiento de secado detallado anteriormente.
- Calidad del forraje. La submuestra de especie pura de los pastoreos con mayor producción en cada temporada fueron enviadas a laboratorio de bromatología para análisis de proteína total, fibra detergente ácida y fibra detergente neutro.

Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias por diferencias mínimas significativas (5% de probabilidad) cuando ANDEVA fue significativo, utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 1999).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La población de plantas al establecimiento fue superior para *Lolium perenne* e igual entre los *Bromus* sp y *Festuca* (**Cuadro 1**). Los resultados de la primera temporada no mostraron diferencias significativas en producción acumulada; sin embargo, si hubo diferencia significativa en el rendimiento del primer y último pastoreos (**Cuadro 3**). En el primer pastoreo el cultivar Nui superó en más del doble el rendimiento de las otras gramíneas, lo que se explica por la rapidez de establecimiento de *Lolium perenne* (López, 1996), que supera en dicho parámetro a *B. stamineus* según lo reportado por Stewart (1993) y por su buen establecimiento avalado por la elevada población inicial (**Cuadro 2**). En el último pastoreo de la primera temporada, el *Bromus stamineus* cv. Gala fue similar en su rendimiento a bromo BR2 y superó a las otras gramíneas.

Cuadro 3. Rendimiento de forraje (kg MS ha⁻¹) en la primera temporada de 3 materiales de *Bromus stamineus* y cultivares testigo de *Festuca arundinacea* Schreb. y *Lolium perenne* L. manejados bajo pastoreo. INIA Carillanca (Temuco, Chile), sin riego, temporada 2001-2002

TRATAMIENTO	Pastoreo 1 (17-10-01)	Pastoreo 2 (21-11-01)	Pastoreo 3 (17-12-01)	Pastoreo 4 (30-01-02)	Pastoreo 5 (10-4-02)	Pastoreo 6 (30-5-02)	Total temporada 2001-2002
<i>F. arundinacea</i> Quantum	534 b	808	367	296	895	512 bc	3411
<i>L. perenne</i> Nui	1549 a	1040	320	85	804	333 c	4131
<i>B. stamineus</i> BR1	613 b	933	469	310	577	431 c	3334
<i>B. stamineus</i> Gala	738 b	726	496	292	791	762 a	3805
<i>B. stamineus</i> BR2	682 b	887	473	353	673	694 ab	3762
Signif.	**	ns	Ns	ns	ns	**	ns

** indica diferencias significativas ($P \leq 0,01$).

Cifras seguidas por distinta letra en sentido horizontal indican diferencias significativas. (Duncan, $P \leq 0,05$).

En la segunda temporada la *Festuca* Quantum y el *Bromus* BR2 superaron estadísticamente el rendimiento acumulado de los otros tratamientos. Quantum destacó por sobre BR2 en los dos primeros pastoreos, en tanto que en los pastoreos de noviembre y diciembre fueron similares y en los dos últimos pastoreos BR2 superó a Quantum. Al comparar el rendimiento de las tres accesiones de *Bromus sp.*, se ve claramente que en la segunda temporada BR2 superó el rendimiento de Gala y de BR1 (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Rendimiento de forraje (kg MS ha⁻¹) en la segunda temporada de 3 materiales de *Bromus stamineus* y cultivares testigo de *Festuca arundinacea* Schreb. y *Lolium perenne* L. manejados bajo pastoreo. INIA Carillanca (Temuco, Chile), sin riego, temporada 2002-2003

TRATAMIENTO	Pastoreo 1 (2-9-02)	Pastoreo 2 (15-10-02)	Pastoreo 3 (14-11-02)	Pastoreo 4 (16-12-02)	Pastoreo 5 (21-01-03)	Pastoreo 6 (4-03-03)	Total temporada 2002-2003
<i>F. arundinacea</i> Quantum	914 a	1462 a	1175 a	715 a	295 b	138 bc	4699 a
<i>L. perenne</i> Nui	395 d	894 b	676 b	332 c	260 b	97 c	2653 b
<i>B. stamineus</i> BR1	431 cd	600 b	873 b	581 b	404 b	163 ab	3052 b
<i>B. stamineus</i> Gala	633 bc	799 b	634 b	572 b	369 b	174 ab	3180 b
<i>B. stamineus</i> BR2	688 b	663 b	1191 a	825 a	945 a	212 a	4525 a
Signif.	**	**	**	**	**	**	**

** indica diferencias significativas ($P \leq 0,01$).

Cifras seguidas por distinta letra en sentido horizontal indican diferencias significativas. (Duncan, $P \leq 0,05$).

En la tercera temporada BR2 tuvo un rendimiento significativamente superior a las otras gramíneas (**Cuadro 5**). En el primer pastoreo nuevamente destacó Quantum por su rápido crecimiento a inicios de temporada; sin embargo, a partir del segundo pastoreo fue superado por BR2 y posteriormente además por las otras líneas o cultivares de *Bromus*.

Cuadro 5. Rendimiento de forraje (kg MS ha⁻¹) en la tercera temporada de 3 materiales de *Bromus stamineus* y cultivares testigo de *Festuca arundinacea* Schreb. y *Lolium perenne* L. manejados bajo pastoreo. INIA Carillanca (Temuco, Chile), sin riego, temporada 2003-2004

TRATAMIENTO	Pastoreo1 (23.9.03)	Pastoreo2 (21.10.03)	Pastoreo3 (13.11.03)	Pastoreo4 (17.12.03)	Pastoreo5 (16.01.03)	Pastoreo6 (4.05.03)	Total temporada 2003-2004
<i>F. arundinacea</i> Quantum	1005 a	842 b	418 cd	619 bc	179 cd	393 cd	3456 b
<i>L. perenne</i> Nui	512 c	627 b	256 d	496 c	109 d	346 d	2346 c
<i>B. stamineus</i> BR1	745 bc	707 b	691 b	764 abc	342 b	570 bc	3819 b
<i>B. stamineus</i> Gala	821 ab	815 b	518 c	851 ab	245 c	824 a	4073 b
<i>B. stamineus</i> BR2	775 ab	1135 a	927 a	1038 a	581 a	702 ab	5158 a
Signif.	*	**	**	*	*	**	**

** indica diferencias significativas ($P \leq 0,01$).

Cifras seguidas por distinta letra en sentido horizontal indican diferencias significativas. (Duncan, $P \leq 0,05$).

En la cuarta temporada bromo BR2 fue similar estadísticamente a BR1 y nuevamente superó a los restantes tratamientos (**Cuadro 6**). A diferencia de la segunda y tercera temporadas, en esta última temporada Quantum no mostró mayor rendimiento en el primer pastoreo al terminar el invierno.

Cuadro 6. Rendimiento de forraje (kg MS ha⁻¹) en la cuarta temporada de 3 materiales de *Bromus stamineus* y cultivares testigo de *Festuca arundinacea* Schreb. y *Lolium perenne* L. manejados bajo pastoreo. INIA Carillanca (Temuco, Chile), sin riego, temporada 2004-2005

TRATAMIENTO	Pastoreo 1 (20-09-04)	Pastoreo 2 (19-10-04)	Pastoreo 3 (16-11-04)	Pastoreo 4 (20-12-04)	Pastoreo 5 (24-01-05)	Pastoreo 6 (24-05-05)	Total temporada 2004-2005
<i>F. arundinacea</i> Quantum	637 bc	978	629	1320 b	210 b	470 b	4244 bc
<i>L. perenne</i> Nui	536 c	889	532	910 b	125 c	345 b	3337 c
<i>B. stamineus</i> BR1	506 c	691	686	2401 a	345 a	398 b	5026 ab
<i>B. stamineus</i> Gala	897 a	829	563	1363 b	191b	615 a	4459 b
<i>B. stamineus</i> BR 2	799 ab	925	772	2436 a	326a	473 b	5730 a
Signif.	**	Ns	Ns	**	**		**

ns indica diferencias no significativas ($P > 0.05$),

** indica diferencias significativas ($P \leq 0.01$)

Cifras seguidas por distinta letra en sentido horizontal indican diferencias significativas (Duncan, $P \leq 0.05$).

El rendimiento acumulado de cuatro temporadas en condiciones de pastoreo rotativo bovino muestra que BR2 fue superior a las otras gramíneas; BR1, Gala y Quantum fueron similares, en tanto que el *Lolium perenne* cv. Nui mostró un rendimiento inferior (**Figura 1**). Es importante destacar que en producción de las cuatro temporadas, el material mejorado de *Bromus stamineus* BR2 superó en 22% el rendimiento de la variedad introducida Gala y en 54% el de *Lolium perenne* cv. Nui. Por otro lado, al revisar la evolución del rendimiento a través de las temporadas, se observa una tendencia decreciente para el *Lolium perenne* cv. Nui; Quantum y Gala no muestran una tendencia clara y más bien tienden a mantener su rendimiento; en tanto que BR2 y BR1 muestran claramente que van aumentando su rendimiento cada temporada, lo que refleja una muy buena persistencia de ambos materiales.

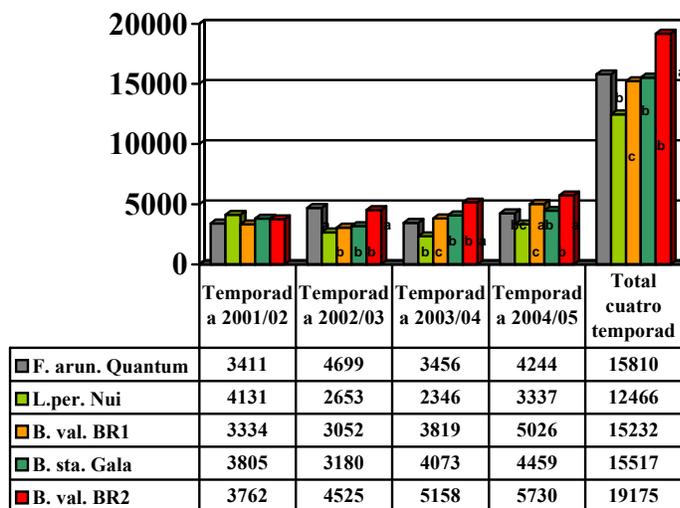


Figura 1. Rendimiento de forraje (kg MS ha⁻¹) en cuatro temporadas de 3 materiales de *Bromus staineus* y cultivares testigo de *Festuca arundinacea* Schreb. y *Lolium perenne* L. manejados bajo pastoreo. INIA Carillanca (Temuco, Chile), sin riego, temporadas 2001 a 2005.

Al analizar la estacionalidad del crecimiento en las cuatro temporadas (**Cuadros 3 a 6**), se ve que el *Lolium perenne* Nui tuvo una mayor velocidad de establecimiento, mientras que, una vez establecida, Quantum tiende a presentar mayor crecimiento a inicios de temporada.

Los *Bromus stamineus* BR1, BR2 y Gala se caracterizaron por mostrar mayor crecimiento, en comparación a *Lolium perenne* y *Festuca* a partir de diciembre. El buen crecimiento en el período seco estival, en términos comparativos a otras gramíneas forrajeras, de *B. stamineus* ha sido descrito por diversos autores (Stewart, 1992; Stewart, 1993; Mosimann y Chalet, 1996; Stewart, 1996).

La calidad del forraje ha sido difícil de evaluar ya que las cuatro gramíneas tienen fenología distinta y entre las dos especies de *Bromus* también existen claras diferencias, siendo Gala más precoz en su desarrollo que BR1 y BR2. Esto determina que al aplicar una misma fecha de pastoreo para todos los materiales, dicha fecha no sea la óptima para todos ellos, lo que se ha traducido en que en algunos pastoreos un material esté en inicios de etapa reproductiva mientras los otros estén en estado vegetativo, alterando obviamente los parámetros de calidad (**Cuadro 7**). En la primera temporada, en términos generales los materiales de *Bromus stamineus* mostraron mayor contenido de proteína que el *Lolium perenne* Nui y la *Festuca arundinacea* Quantum y mayor contenido de fibra, siendo el *B. stamineus* cv. Gala el material que más destacó por su contenido de proteína. En el pastoreo de octubre de la segunda temporada los materiales de bromo nuevamente destacaron por su mayor contenido de proteína, especialmente BR1, en tanto que Quantum y Gala mostraron mayor contenido de fibra. En el pastoreo de noviembre de la misma temporada destacó Gala por su mayor contenido de proteína y, finalmente, en el pastoreo de enero de la tercera temporada nuevamente destacó Gala por su mayor contenido de proteína, los tres materiales de bromo mostraron mayor contenido de FDA.

Cuadro 7. Calidad de forraje de 3 materiales de *Bromus stamineus* y cultivares testigo de *Festuca arundinacea* Schreb. y *Lolium perenne* L. manejados bajo pastoreo. INIA Carillanca (Temuco, Chile)

TRATAMIENTO	21-11-01			10-4-02			15-10-02			14-11-02			21-01-03		
	MS	PT	FDA	MS	PT	FDA	MS	PT	FDA	MS	PT	FDA	MS	PT	FDA
<i>F. arundinacea</i> Quantum	25.4	13.0	27.9	17.8	17.0	27.6	18.2	12.3	32.8	16.5	17.0	29.7	27.2	10.9	34.6
<i>L. perenne</i> Nui	25.8	11.0	28.0	16.2	15.0	25.8	20.3	11.2	25.0	18.0	16.5	27.9	32.5	11.5	32.3
<i>B. stamineus</i> BR1	27.8	13.5	34.9	19.6	18.5	33.2	19.5	16.1	28.6	20.0	15.5	37.3	27.0	11.8	36.6
<i>B. stamineus</i> Gala	27.8	15.5	34.8	18.2	19.2	33.3	20.5	14.4	33.1	20.2	21.5	32.4	26.5	12.8	36.5
<i>B. stamineus</i> BR2	27.9	12.1	35.2	19.4	17.8	33.5	20.0	14.8	28.3	19.4	16.5	34.8	26.5	10.5	36.3

MS=%materia seca; PT=%proteína total; FDA=%fibra detergente ácida.

Los resultados de cuatro temporadas de evaluación bajo pastoreo, mostraron que el material experimental seleccionado, el *B. stamineus* BR2 tuvo un buen rendimiento, acompañado de una calidad apropiada. Actualmente se conducen otros ensayos en diversas condiciones y localidades a objeto de evaluar la adaptación de los *B. stamineus* BR1 y BR2 en distintos ambientes.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero de PROCISUR e INIA-Chile.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Charlton, D. y Stewart, A. 2000. Pasture and forage plants for New Zealand. Grassland Research and Practice Series # 8. 74 p.

- Forde, M.B. and Edgar, E. 1995. Checklist of pooid grasses naturalised in New Zealand. 3. Tribes Bromeae and Brachypodieae. *New Zealand Journal of botany* 33: 35-44.
- López, H. 1996. Especies forrajeras mejoradas. *En*: Ruiz, I. (ed.). Praderas para Chile. INIA, Centro Regional de Investigación La Platina, Santiago, Chile. pp. 41-108.
- Matthei, O. 1986. El género *Bromus* L. (Poaceae) en Chile. *Revista Gayana Bot.* 43 (1-4): 47-110.
- Mosimann, E. et Chalet, C. 1996. Comparaison d'especies et de variétés de brome. *Revue suisse Agric.* 28 (1): 23-26.
- SAS. 1999. SAS system for windows 8.2. Statistical Analysis Systems. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Seguel, I.; Ortega, F.; Romero, O. y Matthei, J. 1999. Colecta, regeneración y caracterización de *Bromus sp.* en Chile. XXIV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal SOCHIPA A. G. Temuco, Chile.
- Stewart, A.V. 1992. "Grasslands Gala" grazing brome (*Bromus stamineus* Desv.)- a new dryland pasture grass. *New Zealand Journal of Agricultural Research*: 349-353.
- Stewart, A.V. 1993. *Bromus stamineus*- a potential new species for pastures in dry regions of New Zealand. *Proceedings of the XVII International Grassland Congress*: 409-410.
- Stewart, A.V. 1996. Potential value of some *Bromus* species of the section *Ceratochloa*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39: 611-618.
- Zappe, A.H.; Massa, A.; Gandullo, R.; Acuña, H; Seguel, I. y Oliva, G. 1999. Colecta de germoplasma en los Andes Patagónicos. *Diálogo LV-Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur.*

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS MÉTODOS DE REGENERACIÓN PARA POBLACIONES DE MAÍZ EN BANCOS DE GERMOPLASMA

Pantuso, F.^{1,2}; Ferrer, M.³

1. RESUMEN

La regeneración de germoplasma consiste en incrementar una entrada cuando presenta baja cantidad de semilla y/o poder germinativo manteniendo su integridad genética. Durante el proceso se puede producir erosión genética como resultado de la selección natural y/o como producto de la acción de insectos, patógenos o factores climáticos adversos. En las especies alógamas la fecundación de los individuos es cruzada razón por la cual se debe evitar la contaminación con polen extraño a fin de mantener la integridad genética de la población, para lo cual existen diversos métodos de polinización. En este trabajo se evaluaron cuatro métodos utilizados en la regeneración de una población de maíz conservada en el Banco Activo de Germoplasma de INTA Pergamino. Se evaluó la eficiencia de la regeneración en función del número de espigas y la cantidad de granos por espigas cosechadas. Los resultados de ambas determinaciones presentaron diferencias altamente significativas entre los métodos utilizados, favoreciendo al Lote Aislado, que es económico por su bajo requerimiento de mano de obra e insumos, pero presenta la desventaja de requerir grandes extensiones para obtener un adecuado aislamiento, lo que dificulta regenerar un número elevado de entradas de maíz. Los métodos de regeneración con polinización controlada (Mezcla de Polen, Planta a Planta, En Cadena) tienen la ventaja que se pueden trabajar numerosas entradas por hectárea. De la comparación entre dichos métodos el más efectivo resultó ser el de Planta a Planta por haberse obtenido mayor número efectivo de espigas cosechadas y mayor cantidad de granos por espiga. Resultó, además, ser el más conveniente y práctico para las actividades de regeneración de poblaciones de maíz en los Bancos de Germoplasma.

Palabras Claves: Maíz, Recursos Genéticos, Bancos de Germoplasma, Regeneración

Key words: Maize, Genetic Resources, Gene Banks, Regeneration.

2. INTRODUCCIÓN

Es esencial conservar los recursos genéticos para el mantenimiento y mejora de la producción agrícola. Esto es porque la diversidad biológica es uno de los factores primarios que hacen a la producción sustentable, siendo utilizada por los fitomejoradores para la incorporación de nuevas características dentro de las variedades existentes (Troyer, 1990).

La calidad de un Banco de Germoplasma debe juzgarse en función de los materiales disponibles para los científicos, de poder contar con cantidad adecuada, de alta calidad, rápida disponibilidad y una completa descripción del material entregado, Goodman (1990).

La utilización del germoplasma de los Bancos Activos del INTA es variable según la especie. Se considera que se ha utilizado un 20% de la colección activa de soja, el 25% de la de trigo y el 5% de la colección de maíz. Existe intercambio de germoplasma con los centros internacionales, así como con la mayoría de los Bancos de Germoplasma del mundo, lo que permite obtener nuevos materiales necesarios para incrementar la variabilidad en algunos cultivos, lográndose un intercambio equilibrado (Ferrer, 1998).

En los Bancos de Germoplasma, la regeneración es la operación de incrementar una entrada con el fin de obtener una nueva muestra de semilla de calidad y en cantidad adecuada; este procedimiento se realiza cuando la cantidad almacenada es insuficiente o su viabilidad ha declinado más allá de un límite establecido, procurando por todos los medios mantener su integridad genética (Brown *et al.*, 1997). La pérdida del poder germinativo está asociada a procesos fisiológicos y bioquímicos que se desarrollan en la semilla almacenada, dichos procesos se encuentran directamente relacionados con la temperatura y la humedad. Para Clark *et al.* (1997) y Hawkes (1979) las

¹Dpto. de Tecnología, Universidad Nacional de Luján

² Fac. CEQyN Universidad de Morón; pantuso@ubbi.com

³ INTA EEA Pergamino

condiciones óptimas para asegurar la longevidad máxima y reducir el número de regeneraciones necesarias de cada entrada son de 4°C y una humedad del grano entre el 8 y 5%. Las causas por las que una entrada del Banco debe ser regenerada son la pérdida del poder germinativo causado por prolongadas y/o inadecuadas condiciones de almacenamiento o la disminución en el tamaño de la muestra como consecuencia del uso por parte de los fitomejoradores u otros investigadores.

Durante el proceso de regeneración se pueden producir cambios genéticos (erosión genética) como resultado de la selección natural y como producto de la acción de insectos, patógenos o factores climáticos adversos. Esta situación se presenta debido a que en ocasiones los materiales son regenerados en ambientes diferentes a los de su área de origen donde se reducen las oportunidades de adaptación, originándose restricciones en el tamaño de la población, lo que puede acelerar la pérdida en la variabilidad genética a través de la selección aleatoria de genotipos (Roos, 1984).

Condiciones apropiadas de almacenamiento a largo plazo hacen innecesaria la regeneración por decenios, mientras que en los Bancos Activos, se estima que la duración de una muestra es de 10 años por lo que la regeneración anual debería ser de alrededor del 10% de la colección. Sin embargo las necesidades de regeneración pueden ser superiores debido a limitaciones técnicas y/o financieras para llevarlas a cabo y en consecuencia los curadores de los Bancos de Germoplasma posponen en algunos casos la regeneración hasta que las muestras presentan un bajo nivel de viabilidad, produciéndose selección por longevidad de la semilla. En ocasiones el tamaño de la muestra usada es inadecuado debido al número reducido de semilla del que se dispone.

La regeneración de los materiales está orientada a la conservación de la diversidad alélica y genotípica y de los complejos adaptados de cada entrada original. En las sucesivas regeneraciones se debe conservar la integridad genética de cada entrada, tratando de minimizar la probabilidad de cambios. Para ello la elección del método de regeneración está supeditada a la naturaleza del sistema de fecundación (López Ubiría *et al.*, 1999). El maíz es una especie alógama donde la fecundación es cruzada, razón por la cual se debe evitar la contaminación con polen extraño a fin de mantener la integridad genética de la población.

En grandes poblaciones de apareamiento libre, se conoce como “tamaño efectivo (N_e)” al número de progenitores cuya descendencia constituirá la siguiente generación. Para un número dado de plantas (N), no todas contribuyen del mismo modo para la próxima generación disminuyendo, entonces, el número efectivo de la población (Falconer, 1990).

El objetivo del presente trabajo es determinar cual es el método de regeneración más eficiente medido en función del número de espigas cosechadas, la cantidad de granos por espiga y el efecto del ambiente, durante la regeneración de poblaciones de maíz almacenadas en los Bancos de Germoplasma.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una población perteneciente al Banco Activo de Germoplasma del INTA Pergamino identificada como ARMZ07077; esta entrada posee elevada variabilidad genética, considerándose estabilizada por haber sido multiplicada en sucesivas generaciones de libre recombinación, en su lugar de origen, por parte de agricultores. Posee además dos tipos de endosperma (flint y harinoso), los que fueron utilizados como marcador genético. Se confirmó que la población se encontraba en equilibrio al ser regenerada en dos campañas agrícolas por el método de lote aislado, realizándose el recuento del marcador genético, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre la población original y las progenies obtenidas (Pantuso y Ferrer, 1998).

Se utilizaron cuatro métodos de regeneración:

3.1. Lote Aislado, (LA).

Consiste en permitir que los individuos se crucen libremente entre sí, evitando la contaminación con polen extraño; para este trabajo se utilizó el Aislamiento Espacial, que se logra sembrando materiales de igual fecha de floración a una distancia mayor a doscientos metros (Tyler, 1982); la probabilidad de cruzamiento es mínima debido a que el polen del maíz es pesado y la polinización entomófila es escasa. Este método es económico, sólo requiere mantener

la población libre de malezas y de insectos, pero su utilización es poco práctica por la cantidad de superficie que se necesita para regenerar varios materiales (más de una hectárea por población y por fecha de siembra). Su utilización se limita a ciertos materiales seleccionados por algún fin específico.

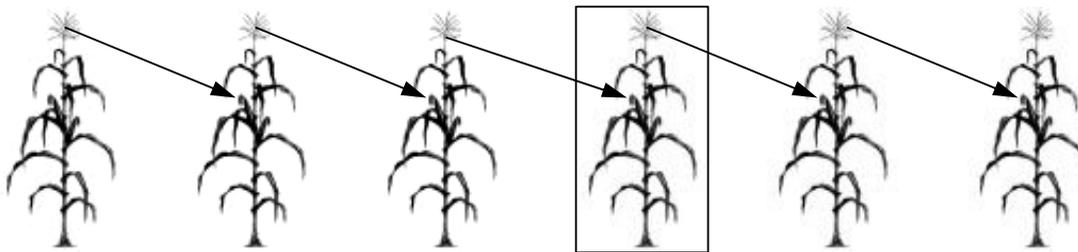
Los otros tres métodos utilizados *con control de la polinización*, son también llamados “*bajo sobre*”, porque en todos los casos se procedió a tapar las espigas antes de la aparición de los estigmas, con el propósito de impedir la fecundación de éstos con polen extraño. Se utilizó para ello sobres de papel manteca, que permiten ver la emergencia de los estigmas y su desarrollo. Cuando éstos tienen entre 3 y 5cm de largo se procede a realizar el cruzamiento teniendo en cuenta el método a emplear en cada caso. Una vez fecundada la espiga se tapó nuevamente con el sobre de papel manteca y luego con un sobre de papel craft siliconado con el que se obtuvo el polen.

Estos sistemas de regeneración son los más usados en los Bancos Activos de Germoplasma, ya que permite la regeneración de hasta 150 poblaciones en una hectárea para una misma fecha de siembra. La superficie que requiere cada población con 300–350 plantas es de 63m² (15 surcos de 5m, 0,25 a 0,30m entre plantas y 0,7m entre surcos, incluyendo 1m de pasillo)

Los métodos de polinización “bajo sobre” utilizados fueron:

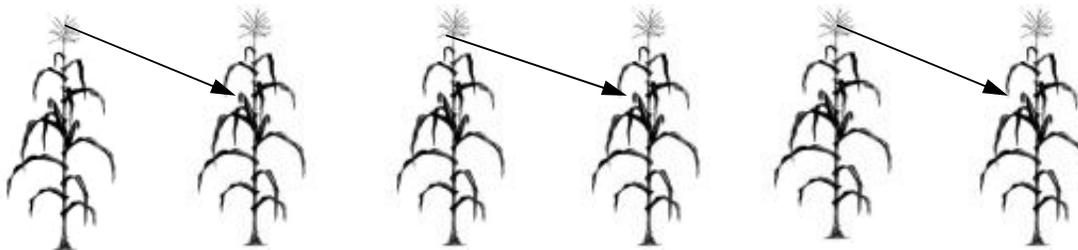
3.2. Polinización En Cadena (EnC).

Consiste en fecundar con el polen de una planta a otra y con el polen de esta última a una tercera y así sucesivamente. Cada individuo participa una vez como macho y otra como hembra. Esto genera una cadena de familias de medios hermanos, donde la espiga i e $i+1$ son medio hermanos, así como la $i+1$ e $i+2$ y así sucesivamente (Crossa y Venkovsky, 1999).



3.3. Polinización Planta a Planta (PaP).

Con este método cada individuo es utilizado una sola vez, como macho o como hembra, por lo tanto el número efectivo de cruzamientos posibles en el mejor de los casos es igual a $N/2$, siendo N el número total de plantas. En este caso no se crean familias relacionadas, ya que si una planta se utiliza como polinizadora no se utiliza su espiga. Al igual que en la polinización en cadena no interviene la selección natural ya que cada planta utilizada como polinizadora aporta su polen a una sola espiga, independientemente de la cantidad de polen que produzca, de esta manera se iguala la probabilidad de aportar gametas masculinas. De acuerdo con Hallawer y Miranda Filho (1988) para este tipo de regeneración el tamaño efectivo $N_e=2N$, siendo N el número de espigas cosechadas.



3.4. Mezcla de Polen (MeP).

El método mezcla de polen o bulk de polen consiste en recolectar diariamente durante el período de floración, el polen de la mayor cantidad de plantas en una bolsa y se realizan todas las operaciones posibles. Aquí actúa la selección natural, ya que las plantas que producen mayor cantidad de polen, aumentan su probabilidad de fecundar mayor cantidad de óvulos. En este caso no existe control eficiente sobre el número de padres que uno puede esperar incluir, y tiene como limitación principal que el polen efectivo puede provenir de unas pocas plantas.

Por lo general se trata de no tomar polen de las plantas que tengan estigmas receptivos, hasta después de haber realizado el cruzamiento, para evitar la posibilidad de autofecundación.

En este tipo de regeneración la colecta de polen insume gran parte del tiempo, ya que se debe recorrer todo el lote para obtener el polen que se encuentra disponible. Una vez recolectado las operaciones se realizan con rapidez debido a que se cuenta con polen necesario para realizar los cruzamientos. El tamaño efectivo es $N_e=1,33N$, cuando hay control gamético femenino, siendo N el número de espigas cosechadas y $N_e=N$ cuando no hay control gamético (Hallawer y Miranda Filho, 1988).



Para el análisis de la eficiencia de los métodos de regeneración en estudio revisten importancia:

- a) La cantidad de *espigas cosechadas* por su relación directa con la posibilidad de pérdida de alelos y el número efectivo de la población.
- b) El número de *granos por espiga* obtenido, ya que éste está relacionado con la cantidad mínima de granos a almacenar.
- c) El *efecto del ambiente*, teniendo en cuenta en este punto el efecto de las condiciones agroecológicas de cada una de las zonas donde se realizaron las regeneraciones y la eficiencia del operador, comparándose las operaciones realizadas por el personal del Banco Activo Pergamino (BAP) y las realizadas por alumnos de la Universidad de Luján.

Se realizó el análisis de variancia para los factores involucrados con un diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos (métodos de regeneración) y 3 repeticiones. El tamaño de parcela utilizada estaba compuesto de parcelas de 5m de largo por 12 surcos y 0,7m de distancia entre surco, sembrándose 300 plantas por parcela.

Los ensayos se realizaron en la Universidad Nacional de Luján y en la Estación Experimental INTA Pergamino, sembrándose en ambos casos en la primera semana del mes de octubre del 2000.

Se corroboraron los supuestos del diseño a través de los test de Bartlett (varianza de los errores son homogéneas), el test de Tukey (para aditividad) y el test de Cochran (distribución normal).

Para el análisis de las medias de los tratamientos obtenidos, se utilizó el test de Tukey con un $\alpha=0.05$. Los tratamientos con distinta letra difieren significativamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para el carácter *número de espigas cosechadas* muestran diferencias altamente significativas entre los distintos métodos de regeneración utilizados. De la tabla de comparación de medias (**Tabla 1**) se observan diferencias entre LA y los métodos de regeneración bajo sobre.

Tabla 1. Comparación de medias, test de Tukey para espigas cosechadas de cada método de regeneración.

Tratamientos	Nº Espigas	
Lote Aislado	156.3	A
Planta a Planta	65.75	B
Mezcla de Polen	56.50	B
En Cadena	51.00	B

Los tratamientos con distinta letra difieren de manera estadísticamente significativa.

Valor crítico de comparación	26.89	Nivel de significación	0.05
Error estándar	10.59		

Los resultados son coherentes con las observaciones realizadas a campo (**Figura 1**), debido, a que en el LA se pueden utilizar todas las espigas polinizadas mientras que en los métodos bajo sobre sólo se aprovechan las espigas polinizadas manualmente. Existen factores que limitan el número de espigas obtenidas, entre los cuales se destacan la disponibilidad de personal y las condiciones del material y del ambiente en el momento de realizar la polinización.

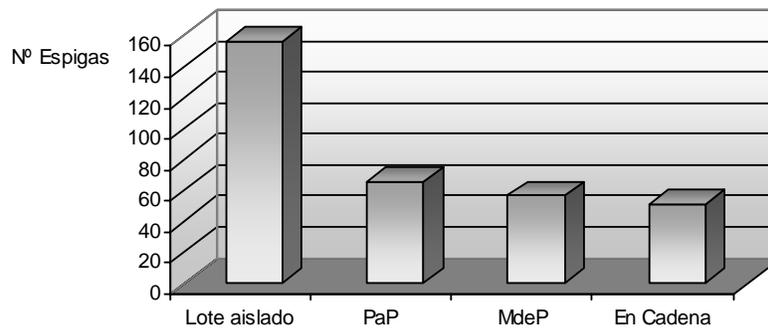


Figura 1. Número de espigas cosechadas en función del método de regeneración utilizado

Cuando se analiza el carácter *granos por espigas cosechadas* se advierte en la tabla de comparación de medias (**Tabla 2**) diferencias significativas entre el LA y los métodos bajo sobre, pero no entre estos últimos. No obstante el método *PaP* se ubica por encima de *MeP* y *EnC*.

Tabla 2. Comparación de medias, test de Tukey para granos por espigas cosechadas para cada método de regeneración.

Tratamientos	Nº Granos por Espigas	
Lote Aislado	298.0	A
Planta a Planta	254.7	B
Mezcla de Polen	224.7	B
En Cadena	223.0	B

Los tratamientos con distinta letra difieren de manera estadísticamente significativa.

Valor crítico de comparación	59.51	Nivel de significación	0.05
Error estándar	23.43		

Estos resultados se explican porque la fecundación en el LA se realiza con todo el polen disponible a lo largo del período de floración, mientras que en los métodos de polinización manual la espiga entra en contacto con el polen una sola vez, pudiendo no coincidir con la aparición de todos los estigmas. También puede deberse a que la cantidad y/o calidad del polen no es la adecuada o incluso porque las condiciones ambientales no sean las ideales (elevada temperatura y baja humedad del aire), lo que afecta la receptividad de los estigmas (**Figura 2**). Esta situación suele presentarse principalmente en el método *EnC* donde se está obligado a utilizar el polen de la planta a la que se le está polinizando su espiga. Los métodos PaP y MeP presentan mayor número de granos por espiga porque se pueden elegir las plantas que proveerán el polen para realizar la operación.

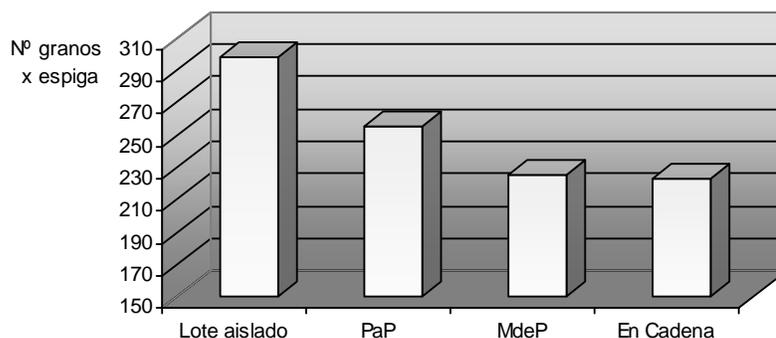


Figura 2. Número de granos por espiga cosechada en función del método de regeneración utilizado

De la evaluación del efecto del ambiente (Pergamino/Luján) en función del número de *espigas cosechadas* por método de regeneración utilizado, se observa que existen diferencias significativas entre las localidades (**Tabla 3**).

Tabla 3. Comparación de medias, test de Tukey para espigas cosechadas por cada localidad como promedio de los tres métodos de regeneración.

Localidades	Nº Espigas	
Pergamino	79.33	A
Luján	50.55	B

Los tratamientos con distinta letra difieren de manera estadísticamente significativa.

Las diferencias significativas entre las localidades, se pueden atribuir a diferencias debidas al ambiente agro-ecológico y a la eficiencia del operador al realizar las operaciones bajo sobre. Las mismas se pueden apreciar en la **Figura 3**.

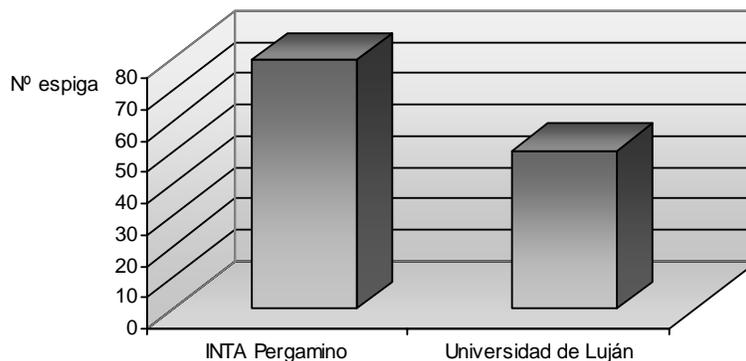


Figura 3. Número de espigas cosechada como promedio por localidad

Finalmente se evaluó el número de *granos por espiga*, parámetro que nos da una idea de cómo se desarrollaron las operaciones, importante en el momento de evaluar la eficiencia de cada método; los datos se muestran en la **Tabla 4** donde se observa que existen diferencias significativas entre las localidades analizadas.

Tabla 4. Comparación de medias, test de Tukey para granos por espigas cosechadas por cada localidad como promedio de los tres métodos de regeneración.

Localidades	N° granos por Espigas	
Pergamino	284	A
Luján	218	B

Los tratamientos con distinta letra difieren de manera estadísticamente significativa.

Al observar la tabla de medias (**Tabla 4 y Figura 4**) se advierte que la eficiencia de los cruzamientos realizados en Pergamino se ubican por encima de los realizados en Luján, existiendo entre éstas diferencias significativas.

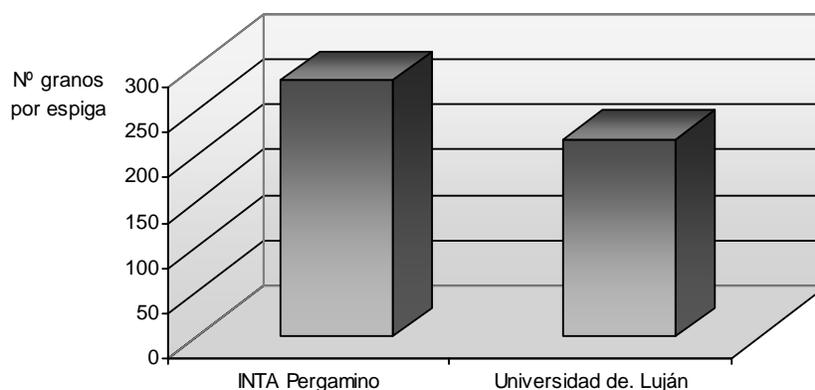


Figura 4. Número de granos por espiga cosechada como promedio por localidad

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en número de espigas cosechadas y número de granos por espiga, favorecen al método de *LA*, que es económico por no necesitar mano de obra, ni sobres para la polinización, aunque posee como desventaja el requerimiento de grandes extensiones, que dificulta la regeneración de un número elevado de entradas y en consecuencia es poco utilizado en la regeneración de entradas de maíz. La regeneración con polinización controlada tiene la ventaja de la cantidad de materiales que se pueden trabajar por hectárea y no presenta limitaciones en cuanto a la fecha de siembra, que suele realizarse de manera escalonada, para que las poblaciones florezcan en momentos diferentes, lo que hace más efectivo el trabajo del personal.

Al comparar los métodos de regeneración bajo sobre en función de su operatividad se observa que el método de *MdeP* fue con el que se obtuvieron adecuada cantidad de espigas cosechas y relativamente elevada cantidad de granos por espiga, lo que se atribuye a que el polen que se utiliza es generalmente abundante, situación que se vio reflejada en el número de granos por espiga.

El método *EnC* presenta menor número de espigas cosechadas y la menor cantidad de granos por espigas generando además familias de medios hermanos. Se ha observado que cuando la floración está finalizando, existen dificultades para continuar la cadena por falta de polen, lo que no ocurre al inicio. Esta situación se explica porque los estigmas se mantienen receptivos durante varios días mientras están tapados en tanto que condiciones ambientales adversas pueden generar falta de polen (lluvias, exceso de calor, sequía).

El método *PaP* fue el que produjo mayor número de espigas cosechadas y mayor número de granos por espiga dentro de los métodos bajo sobre. En este caso el tamaño efectivo $N_e=2N$. De los métodos de polinización controlada resultó ser el más conveniente y práctico para las actividades de regeneración en los Bancos de Germoplasma para poblaciones de maíz.

Finalmente en la EEA INTA Pergamino se obtuvo el mayor número de espigas por método de regeneración y el mayor número de granos por espiga.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brown, A.H.D.; Brubaker, C.L. and Grace, J.P. 1997. Regeneration of Germplasm: Wild Versus Cultivated Plant Species. *Crop Science* 37, 7-13.

Clark, R.L.; Shands, H.L.; Bretting, P.K. and Eberhart, S.A. 1997. Germplasm regeneration: developments in population genetics and their implications. *Crop Science* 37 (1), 1-6.

Crossa, J.Y. and Vencovsky, R. 1999. Sample size and variance effective population size for genetic resources conservation. *Plant Genetic Resources Newsletter* 119, 15-25.

Falconer, D.S. 1990. Introducción a la Genética cuantitativa, CECSA, México: 82-114.

Ferrer, M. 1998. El INTA y los Recursos Fitogenéticos en la Argentina, Seminario "Los recursos fitogenéticos en la Argentina", INTA, Pergamino.

Goodman, M.M. 1990. Genetic and germplasm stocks worth conserving, *Journal of Heredity* 81, 11-16.

Hallauer, A.R. and Miranda Filho, J.B. 1988. Quantitative genetics in maize breeding. Ames: Iowa State University.

Hawkes, J.G. 1979. La conservación de los Recursos Genéticos Vegetales, *Fitotécnica Latinoamericana*, Vol. 11 N° 1 Pag. 59-65.

López-Ubiria, I.; Suso, M.J. and Moreno, M.T. 1999. Estimation of outcrossing and contamination rates in a germplasm-regeneration field of bean (*Vicia faba* L.), *Plant Genetic Resources Newsletter* 120, 15-19.

Pastuso, F. y Ferrer, M. 1998. Regeneración de Poblaciones de maíz: Efecto del tamaño de muestra. XXVI Jornadas Argentinas de Botánica, UNRC. Pág. 341.

Roos, E.E. 1984. Genetic shifts in mixed bean populations. II Effects of regeneration. *Crop Science* 24, 711-715.

Troyer, A.F. 1990. A retrospective view of corn genetic resources. *Journal of Heredity*, 81: 17-24.

Tyler, B.F. 1982. Practical aspects of regeneration scheme in forage grasses. Pp 69-78 in *Seed regeneration in cross-pollinated species*. Rotterdam, the Netherlands.

Solanum commersonii*: UNA ESPECIE CON GRAN POTENCIAL PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA POR RESISTENCIA A *Ralstonia solanacearum

Galván, G.¹ Franco Fraguas, L.²; Quirici, L.¹; Santos, C.¹; Silvera, E.¹; Siri, M.I.²; Villanueva, P.²; Raudiviniche, L.¹; González, M.³; Torres, D.³; Castillo, A.³; Dalla Rizza, M.³; Vilaró, F.³; Gepp, .V¹; Ferreira F.²; Pianzola, M.J.²

1. RESUMEN

Ralstonia solanacearum es un problema creciente para la producción de papa. Uruguay es parte del centro de diversidad primario de *Solanum commersonii*, una especie nativa que constituye una fuente de resistencia a *R. solanacearum*. En esta investigación se planteó su utilización como fuente de resistencia explotando la diversidad disponible. Los trabajos comprendieron la colecta en todo el país, análisis de su diversidad genética, evaluación de propiedades químicas y bioquímicas, evaluación de la resistencia a *R. solanacearum* y la búsqueda de genes análogos de resistencia (RGAs). La especie *S. commersonii* se encontró distribuida en todo el territorio, en ambientes fitogeográficos específicos. La caracterización mediante marcadores RAPDs, realizada para entradas del sur del país, reveló una gran diversidad aun entre clones de un mismo punto de colecta. También se encontró gran variación en la composición y cantidad de glicoalcaloides, en la actividad hemo-aglutinante y en el efecto inhibitorio de extractos foliares *in vitro* sobre el crecimiento de *R. solanacearum*. Mediante PCR anidado con cebadores diseñados específicamente, se encontraron aplicones similares a los reportados para RGAs, lo que sugiere la presencia de genes R en *S. commersonii*. En la evaluación de la resistencia en invernadero mediante inoculación en la axila, se observó predominantemente marchitez tardía con respecto al testigo *S. tuberosum* y plantas que se mantuvieron asintomáticas. La inoculación al suelo en condiciones controladas (27°C) con plántulas obtenidas por micropropagación, permitió identificar clones con resistencia completa (asintomática). Clones resistentes con bajo contenido de glicoalcaloides fueron cruzados con *S. phureja*. Se obtuvieron poblaciones híbridas interespecíficas mediante rescate de embriones, lo que permitirá realizar estudios genéticos.

Palabras claves: papa, marchitez bacteriana, RAPDs, RGAs, glicoalcaloides, lectinas, hemo-aglutinación.

2. INTRODUCCIÓN

En Uruguay se ha observado una incidencia importante de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, en el cultivo de la papa en algunos años (MGAP-DIEA, 2003). Este incremento se atribuye a la inexistencia de tratamientos curativos efectivos y a la ocurrencia de condiciones ambientales muy propicias para su desarrollo. *R. solanacearum* también es causa de crecientes pérdidas en el cultivo en todo el mundo, evolucionando desde enfermedad típicamente tropical, hacia una enfermedad prominente también en climas templados (Janse *et al.*, 2004).

La marchitez bacteriana se ve agravada por la ausencia de cultivares de papa con resistencia estable. Cultivares como Achatt (de origen alemán) y Molinera (CIP, Perú) que poseen resistencia de campo, están entre los escasos ejemplos. En tanto, híbridos de *S. tuberosum* L. con fuentes de resistencia como *S. chacoense* Bitt., *S. sparsipilum* (Bitt.) Juz. & Buk. y *S. multidissectum* Hawkes, mostraron moderada resistencia y altos niveles de glicoalcaloides (French *et al.*, 1998). Accessiones de *S. phureja* se comportan como resistentes a las razas 1 y 3, pero la respuesta es dependiente de la temperatura y solo resultó efectiva en climas fríos (French y De Lindo, 1982).

1 Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo. Email: hortics@fagro.edu.uy.

2 Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

3 Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Estación Experimental Las Brujas, Canelones, Uruguay.

Uruguay se ubica en el centro de diversidad primario de *Solanum commersonii* Dun. ex Poir. (Correll, 1962). Esta especie tuberosa diploide ($2x=2n$, 1EBN) ha sido destacada desde décadas atrás por su potencialidad para el mejoramiento de papa por su resistencia al frío y a sequías (Chen *et al.*, 1999). Entre los factores bióticos, además de resistencias a virus y hongos, se destaca precisamente su alta resistencia a *R. solanacearum* (Laferriere *et al.*, 1999; Kim-Lee *et al.*, 2004).

A pesar de las numerosas características de interés potencial en *S. commersonii*, su introducción en la base genética del cultivo ha sido limitada por la incompatibilidad para la hibridación interespecífica con especies diploides 2EBN o haploides de *S. tuberosum*. Jansky (2006) reseña diversas estrategias que se han propuesto para superar esta barrera, como la explotación de la capacidad de clones de *S. commersonii* para producir gametos $2n$ (Masuelli, 1990), la duplicación cromosómica, el rescate de embriones *in vitro* y la hibridación somática.

Independientemente de la metodología utilizada, la mayoría de los reportes de inclusión de *S. commersonii* en programas de mejoramiento se basan en uno o pocos clones (Laferriere *et al.*, 1999; Carputo *et al.*, 2003; Kim-Lee *et al.*, 2004). Debido a que Uruguay cuenta con numerosas poblaciones de esta especie, la estrategia de utilización planteada involucra la selección en una base genética amplia de clones con alto nivel de resistencia a *R. Solanacearum*, alta fertilidad y a la vez bajos niveles de glicoalcaloides. La selección poblacional, con entrecruzamiento de genotipos superiores, permitiría la acumulación de genes de efecto cuantitativo y la selección simultánea sobre distintos caracteres, con mayor potencial que en el retrocruzamiento simple (CIP, 1985; Bradshaw *et al.*, 2006). La caracterización de entradas clonales mediante marcadores moleculares, se introduce como herramienta para el análisis de la diversidad y para el estudio de la base genética de la resistencia así como de otras características de interés.

Los glicoalcaloides son compuestos de las *Solanáceas* relacionados con la defensa, que en concentraciones altas son tóxicos para la alimentación humana (Friedman y McDonald, 1997). En Uruguay, Vázquez *et al.* (1997) estudiaron los glicoalcaloides en *S. commersonii* y encontraron gran variabilidad entre entradas tanto en la cantidad como en la composición, lo que permitiría seleccionar clones con bajo contenido total. Esto fue confirmado por Pianzola *et al.* (2005) para entradas del sur del país.

Dentro de los componentes defensivos preformados de naturaleza proteica, se encuentran las lectinas, involucradas en la interacción entre el vegetal y su entorno con diversas funciones fisiológicas descritas (Rüdiger y Rougé, 1998). Una propiedad remarkable en las lectinas es su capacidad aglutinante, debido a la presencia de múltiples sitios de unión a carbohidratos en la molécula. Plá *et al.* (2003) reportaron altos niveles de actividad en tubérculos, hojas y frutos de *S. commersonii* en Uruguay. Pianzola *et al.* (2005) encontraron gran variación en niveles de actividad hemo-aglutinante de diferentes entradas colectadas en el país.

Genes de resistencia (genes R) a patógenos como virus, bacterias y hongos, han sido identificados en los últimos años en diferentes especies vegetales. La mayoría de las proteínas codificadas por estos genes (proteínas R) tienen motivos estructurales comunes como TIR, NBS y WRKY (McDowell y Woffendel, 2003). El dominio TIR es conocido también por su similitud con la proteína Toll de *Drosophila* y el receptor de la Interleukina-1 de mamíferos. Los dominios NBS contienen varios motivos kinasa y también motivos hidrofóbicos. Las proteínas WRKY son factores de transcripción exclusivos del reino vegetal que contienen 60 aminoácidos altamente conservados interrumpidos por un intrón, contando con la secuencia aminoacídica WRKYGKQ prácticamente invariable en esta familia de proteínas (Deslandes *et al.*, 2002). La construcción de cebadores para PCR basados en secuencias consenso de dominios conservados de proteínas codificadas por genes R permitiría generar marcadores de resistencia en *S. commersonii*.

En este artículo se describen los resultados obtenidos hasta el presente en el estudio de *S. commersonii* desarrollado por la Facultad de Agronomía y la Facultad de Química de la Universidad de la República y el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Los trabajos comprendieron la colecta de poblaciones silvestres de *S. commersonii* en todo el país, el estudio de su diversidad genética, de sus características químicas y bioquímicas, la evaluación de la resistencia a *R. solanacearum* y el estudio de genes análogos de resistencia (RGAs). Finalmente, se describen los primeros trabajos orientados hacia la introducción de *S. commersonii* en el mejoramiento genético de papa en Uruguay.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta

Las entradas de *S. commersonii* fueron colectadas en el período 1999-2003. En una primera etapa, la colecta se realizó en la región Sur y Este (Departamentos de San José, Canelones, Maldonado y Rocha). Posteriormente, se realizó otra etapa que cubrió todo el territorio de Uruguay: Litoral Oeste (Soriano, Río Negro, Paysandú, Salto y Artigas), Noeste (Tacuarembó), Sur (Colonia, San José, Montevideo, Canelones) y Este (Maldonado, Rocha, Lavalleja. y Treinta y Tres). La colecta pretendió incluir el área de distribución de la especie en Uruguay en su totalidad.

Las colectas se realizaron a finales de la primavera y del otoño, cuando *S. commersonii* se encuentra en floración o fructificación. De cada sitio de colecta se conservaron entre seis y diez clones (tubérculos y/o plantas en maceta) y en algunos casos semillas. El mantenimiento del material vegetal se realizó en el Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía, bajo invernadero. Posteriormente, la colección se introdujo parcialmente *in vitro* en la Estación Experimental INIA Las Brujas. En el caso de aquellos clones con características de interés, los mismos se mantienen en medio de conservación (sales de MS + 40g/l de sorbitol) a 10°C.

3.2. Estudios de diversidad de *S. commersonii* mediante marcadores RAPD

La extracción del ADN se realizó según el método CTAB, siguiendo el procedimiento descrito por Pianzzola *et al.* (2005). Para la obtención de perfiles RAPD, las reacciones se realizaron a partir de 10ng de ADN genómico en un volumen final de 25µl. Se utilizó el kit comercial *puRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads* (Amersham Pharmacia Biotech, USA) que contiene todos los reactivos necesarios, a excepción del primer y del templado. Se seleccionaron tres primers que produjeron perfiles con un adecuado número de bandas en el rango de 200-2000 pb: Primer 6: 5' GGT GGG GAC T 3'; Primer 10: 5' CAG CCG CCC C 3' (Laroche *et al.*, 1995); Primer F: 5' CCC GTC AGC A 3' (Amersham Pharmacia Biotech). Se trabajó con una concentración final de *primer* de 25 picomoles por reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400, con un primer paso de desnaturalización durante 8 minutos a 96°C, seguido de 35 ciclos consecutivos de desnaturalización (1 min. a 96°C), alineamiento (2 min. a 34°C) y extensión (2:30 min. a 72°C) y un paso de extensión final durante 10 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación (20 µl) se separaron por electroforesis en geles de agarosa *MetaPhor®* ultrapura al 1,5% con bromuro de etidio (0,5µg/ µ l) en buffer TBE 1X. Los geles fueron fotografiados bajo luz UV con una cámara digital Kodak DC120 (*Kodak Digital Science*) y convertidos a un archivo de imagen usando el Sistema de Análisis y Documentación de Electroforesis 120 de Kodak (*Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA*).

3.3. Aislamiento de cepas de *Ralstonia solanacearum*

Se realizó a partir de tubérculos de *S. tuberosum*, colectados en establecimientos comerciales de las diferentes zonas paperas. Se utilizó medio semiselectivo modificado SMSA a partir del material exudado de los haces vasculares de los tubérculos. Las colonias típicas se reislaron en medio NAD (dextrosa al 1%) y sobre ellas se realizó la observación microscópica y las pruebas bioquímicas (Hayward, 1964). La identidad de la cepa utilizada en este estudio se confirmó por secuenciado del gene del ARN ribosomal 16S. La secuencia se encuentra depositada en el banco de Datos GenBank, bajo el N° AY712685.

3.4. Extractos para determinación de glicoalcaloides

Se prepararon extractos crudos de glicoalcaloides a partir de muestras de hojas liofilizadas según el procedimiento descrito por Ferreira *et al.* (1993). Las muestras de hojas secas (30mg) se extrajeron en mortero con 2 fracciones de 1ml de ácido acético (2%, v/v) cada una. La mezcla de ambos sobrenadantes constituye el extracto crudo de glicoalcaloides. Estos extractos crudos fueron purificados por extracción en fase sólida, aplicándolos en cartuchos Sep-Pak C₁₈ (ODS-4, 500mg, Whatman). El cartucho fue lavado con una mezcla de acetonitrilo-buffer KH₂PO₄ 50mM (3:17,5ml) y los glicoalcaloides fueron eluidos con una mezcla de acetonitrilo-buffer KH₂PO₄ 50mM (3:7,4ml) (Hellenas, 1986). El contenido de glicoalcaloides en los extractos purificados fueron determinados mediante TLC cuantitativa usando el método optimizado descrito por Siri *et al.* (2005).

3.5. Extractos orgánicos y acuosos

Los extractos fueron realizados a partir de hojas liofilizadas siguiendo el método sugerido por McCloud *et al.* (1988) modificado, 40mg de material seco fueron pulverizados en mortero y macerados durante 24 horas a temperatura ambiente, con una mezcla de cloroformo-metanol (1:1, v/v) en una columna de percolación (1x5cm). Luego de eluir la primera fracción de solvente, el material se cubrió con metanol durante 15 minutos. Las fracciones eluidas fueron combinadas y constituyen el llamado extracto orgánico (EO). El solvente se removió bajo corriente de N₂(g) y el extracto seco se almacenó en desecador hasta ser empleado en los ensayos de actividad *in vitro*. El marco de la extracción orgánica fue re-extraído por maceración durante 24 horas a temperatura ambiente con agua destilada. La solución acuosa resultante constituye el llamado extracto acuoso (EA₁), que fue liofilizado y almacenado en desecador hasta su uso.

Por otro lado, se prepararon extractos acuosos (EA₂) a partir de hojas frescas de *S. commersonii*, colectadas en el día y conservadas a 4°C. Las hojas frescas fueron lavadas y procesadas en mortero con arena y se extrajeron las proteínas solubles con 0.15M NaCl. La suspensión se filtró por gasa y el filtrado se centrifugó durante 30 minutos a 8.000r.p.m. El sobrenadante obtenido se trató con sulfato de amonio al 60% de saturación y se incubó 24 horas a 4°C. Se centrifugó durante 20 minutos a 8000rpm y el precipitado se resuspendió en NaCl 0.15M. El sobrenadante se gel-filtró utilizando columna PD-10 (Sephadex G-25) equilibrada con NaCl 0.15M. Se aplicaron a la columna fracciones de 2.5ml y se eluyó con 3.5ml de NaCl 0.15M. Estas soluciones fueron identificadas como AE₂, esterilizadas por filtración a través de 0.2μ y almacenadas a 4°C hasta su uso.

3.6. Determinación de proteínas solubles y actividad hemo-aglutinante (HAG)

Las proteínas solubles se determinaron en los extractos acuosos identificados como AE₂ usando el método del ácido Bicinconínico (BCA, Smith *et al.*, 1985). El reactivo de trabajo BCA se preparó fresco antes de su uso. Se usaron 100μl de una dilución apropiada de extracto y se incubaron con 2ml de reactivo BCA durante 15 minutos a 60°C. Se leyó la absorbancia a 562nm. Se utilizó una curva de calibración preparada con seroalbúmina bovina (0.02-0.2mg/ml) como estándar.

La actividad hemo-aglutinante (HAG) se determinó según Plá *et al.* (2003) en los extractos acuosos identificados como AE₂, usando glóbulos rojos de conejo y se estimó por ensayos de dilución seriada al medio. Los glóbulos rojos se obtuvieron a partir de sangre fresca de conejo colectada en medio de Alsever. Los eritrocitos se lavaron 4 veces por centrifugación suave durante 3 minutos a 1500g con solución de buffer fosfato-salino (PBS) y diluidos en el mismo buffer para dar una suspensión al 4%. El *Título*, se definió como el recíproco de la última dilución capaz de dar HAG visible con los glóbulos rojos de conejo, luego de 30 minutos de incubación. La hemo-aglutinación específica (HAE) se definió como la relación entre la menor concentración de HAG (título/ml) y la concentración de proteínas (mg/ml).

3.7. Ensayo de actividad *in vitro* frente a *R. solanacearum*

Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de *S. commersonii* frente a *R. solanacearum* según Siri *et al.* (2005). El ensayo está basado en el método de difusión en agar en el cual la actividad antimicrobiana es detectada mediante aparición de halos de inhibición del crecimiento. En el protocolo optimizado se utilizaron placas de sílica gel de 4cm de lado como soporte de las muestras. Se sembraron cuatro muestras por placa consistentes en 50μl de los extractos acuosos preparados según se ha indicado (AE₁, AE₂, OE), un control positivo de inhibición (50μl de gentamicina 100μg/ml) y un control negativo (50μl NaCl 0,15M). Para la preparación del inóculo se realizó una suspensión de *R. solanacearum* en solución salina al 0,9% a partir de un cultivo de 48 horas en medio NAD. La concentración de la suspensión se ajustó hasta lograr una turbidez equivalente al tubo 2 de la escala de McFarland. Se agregaron 4ml de esta suspensión sobre 100ml de medio NAD previamente termostatzado a 45°C (2,4x10⁷ células/ml). A continuación se repartieron 10ml de medio de cultivo inoculado y termostatzado en cada placa de forma de cubrir la placa de sílica gel conteniendo las muestras. Una vez solidificado el medio, las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se agregó a cada placa una solución de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0.1% y se incubaron a 28°C durante 30 minutos más. Finalmente se retiraron las placas de la estufa y se registraron los resultados indicando el diámetro de los halos de inhibición.

3.8. Evaluación de la resistencia

La resistencia de *S. commersonii* a *Ralstonia solanacearum* fue evaluada mediante ensayos en invernadero, siguiendo la técnica de inoculación en tallo modificada de Winstead y Kelman (1952). Se evaluaron 26 entradas clonales pertenecientes a la colección de germoplasma de *S. commersonii*, con tres a cinco repeticiones por cada clon. Se incluyeron plantas de *S. tuberosum* como control.

El inóculo se preparó según la metodología de Thurston y Lozano (1968) modificada. Las colonias bacterianas fueron cultivadas en medio TTC durante 48 horas a 28°C. La suspensión se preparó en solución salina al 0,9% a una concentración de 1×10^4 ufc/ml. Plantas con 8-10 hojas se inocularon en la axila de la tercera hoja desde el ápice, con una gota de 15 a 30 μ l, equivalente a 100 ufc. Posteriormente se hirieron con una aguja hipodérmica estéril. Luego de la inoculación las macetas se cubrieron con bolsas de nylon por dos días para favorecer las condiciones de infección. Las plantas se mantuvieron en invernáculo y se evaluaron en las tres semanas, de acuerdo a los índices de severidad de Nielson y Haynes (1960). Se establecieron diferentes categorías de resistencia según el comportamiento de cada entrada en comparación con *S. tuberosum* (**Tabla 1**).

Tabla 1. Definición de categorías de respuesta de *S. commersonii* en la evaluación de la resistencia frente a *R. solanacearum* mediante inoculación en la axila.

Categorías de respuesta		Definición
S	Susceptible	Marchitamiento completo que aparece en forma simultánea al testigo
MS	Medianamente susceptible	Marchitamiento completo que aparece tardíamente respecto al testigo
MR	Medianamente resistente	Marchitamiento leve y que no aparece en todas las plantas
R	Resistente	Sin síntomas, o marchitamiento en algunas plantas leve y tardío respecto al testigo

Posteriormente, se ajustaron las condiciones para la evaluación de la resistencia a *R. solanacearum* mediante inoculación del suelo, metodología más ampliamente utilizada ya que se aproxima mejor a las condiciones en que se produce la infección natural (Montanelli *et al.*, 1995). Se realizó con plántulas micropropagadas a partir de la colección *in vitro*. La aclimatación se realizó durante tres a cuatro semanas en invernadero, en bandejas de celdas individuales de 40ml, en un sustrato comercial hortícola estéril.

La inoculación se realizó con una suspensión bacteriana (1×10^8 ufc/ml) por plántula, preparada siguiendo la metodología descrita para la inoculación en la axila de la hoja. Se hizo un hoyo en el sustrato junto a cada plántula, en el que se vertió 1ml de suspensión. Las plántulas permanecieron en condiciones controladas (27°C, 12 horas de luz $78 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y se evaluó la presencia de síntomas en las tres semanas posteriores a la inoculación, en base a la escala utilizada por Montanelli *et al.* (1995).

3.9. Estudio de genes análogos de resistencia

La extracción de ADN se realizó según reportado por Dalla Rizza *et al.* (2004), empleando además genotipos de arroz y trigo como controles. El diseño de los cebadores se basó en las secuencias consenso obtenidas del alineamiento de los motivos estructurales conservados TIR, NBS y WRKY de los genes R. Para asignar bases en las terceras posiciones de los codones se consideró la frecuencia de uso de codones disponibles en papa y en los casos donde no había consenso se emplearon inosinas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C 5min, 10 ciclos de 94°C x 60seg, 47°C x 30seg, 72°C x 60seg con una rampa de -0.5°C de temperatura de hibridación por ciclo (touch-down) seguidos de 35 ciclos de 94°C 30seg, 42°C 30seg y 72°C 30seg y finalmente 72°C x10min. Se empleó un termociclador Perkin Elmer, GeneAmp system 2400. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 μ l conteniendo 1 U de Taq polimerasa (Fermentas) buffer de PCR 1X, 0.1mM de cada dNTP, 1.5mM MgCl_2 , 0.25 μM de cada primer, y 50ng de ADN. Se realizaron diferentes combinaciones de reacción según los cebadores diseñados y también amplificaciones internas a los productos de amplificación (**Figura 1**).

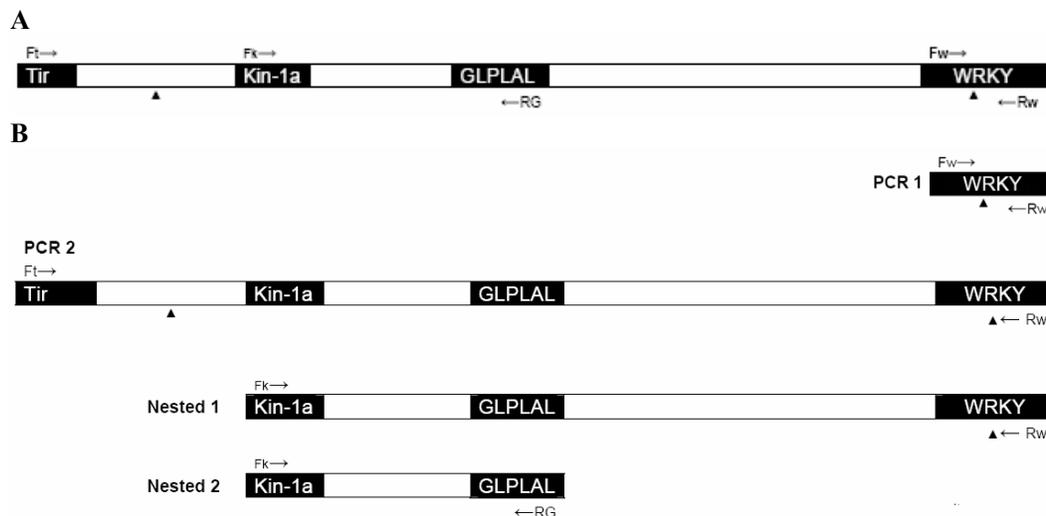


Figura 1. Estudio de genes análogos de resistencia (RGAs). (A) Representación esquemática de la proteína RRS-1, y los cuatro motivos estructurales analizados en este estudio con sus respectivos cebadores. (B) Representación esquemática de los motivos estudiados y detalle de reacciones *nested*-PCR.

Para la nested-PCR se emplearon 2 μ l del producto de la PCR 2 manteniéndose igual las condiciones de amplificación. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis usando un equipo vertical (Hoeffer Sturdiar, SE400 Amersham Pharmacia S. Francisco Cal, USA). Se emplearon geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes 6% (w/v), buffer TBE 1X, glicerol 2% (w/v). El resultado de la electroforesis fue revelado mediante tinción con nitrato de plata.

3.10. Cruzamientos

Clones de *S. commersonii* se incluyeron en los cruzamientos en INIA Estación Experimental Las Brujas, con dos objetivos: (a) Estudiar la base genética de la resistencia y para ello, se utilizaron clones de *S. commersonii* resistentes a *R. solanacearum* en cruzamientos con clones susceptibles y (b) Introducir la resistencia detectada al programa de mejoramiento de papa, utilizando clones de *S. commersonii* resistentes x *S. phureja*.

S. phureja Juz. y Buk. ($2x=2n$, 2EBN) se ha propuesto como especie puente para cruzamientos posteriores con *S. tuberosum*. Los clones de *S. phureja* utilizados provienen de una población seleccionada por varios ciclos en North Caroline St. Univ. (US) por F. Haynes para adaptación a día largo. Se introdujo al programa de INIA en forma de familias de progenies y se entrecruzaron los clones selectos.

Para el rescate de embriones, de las bayas provenientes de los cruzamientos *S. commersonii* x *S. phureja* se separaron las semillas y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 30% (v/v) durante 20 minutos. Por último, se enjuagaron cuatro veces en agua destilada estéril. Se sembraron entre 11 y 15 semillas por placa de Petri, evaluando dos medios de cultivo:

- base de sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) complementado con vitaminas de MS y 100mg/l de mio-inositol, 2mg/l de glicina, 0.1mg/l de AIA (ácido indol acético), 0.001 mg/l de kinetina, 0.001mg/l de sulfato de adenina y 2% m/v de sacarosa (Singsit *et al.*, 1991).
- base de sales de MS complementado con 250mg/l de caseína hidrolizada, 1mg/l de tiamina, 1mg/l de ácido nicotínico, 1mg/l de piridoxina, 100mg/l de mio-inositol y 4% de sacarosa (m/v) (Iwanaga *et al.*, 1991).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Colecta

La colecta comprendió más de 50 sitios en diferentes regiones del país. *S. commersonii* se encontró desde topografías altas como las sierras de Lavalleja y Treinta y Tres, hasta en la costa del Río de la Plata (a pocos metros del mar) y del Océano Atlántico. No se encontró en valles inundables junto a los grandes ríos. Se distribuye en rodales (*patches*), en microambientes de suelos fértiles y sueltos.

Solamente en doce sitios se encontró abundante fructificación, a partir de lo cual se extrajeron semillas que dieron origen a lotes o entradas por sitio de colecta. Se conservan en el Banco de Germoplasma de INIA (La Estanzuela, Colonia). Se infiere que en esas localidades y lotes se cuenta con alta calidad y producción de polen. Por otro lado, que existe auto-compatibilidad, o que se encuentran genotipos distintos, que son autoincompatibles pero se forman numerosos frutos por la presencia de genotipos distintos.

Las entradas correspondieron tanto a la subespecie *commersonii* (prominente folíolo terminal, cáliz con sépalos ovales acuminados), como a la subespecie *malmeanum* (folíolo terminal y laterales similares, algunos peciolulados, sépalos triangulares) (Hawkes, 1990). Esta última, se encontró principalmente en el norte de Uruguay, aunque se han reportado ambas subespecies en el litoral del Río Uruguay en Río Grande do Sul (Brasil) (Castro *et al.*, 2006).

Se colectaron además clones que constituyen formas especiales, como las numerosas referidas por Correll (1962). El clon 01.02.TA corresponde a *S. commersonii* aunque con algunas características de *S. chacoense*, por lo que podría ser un híbrido natural. En tanto, el clon 05.02.6 se destacó por su vigor, por lo que podría tratarse de un triploide natural.

4.2. Estudio de la diversidad mediante marcadores RAPDs

La utilización de perfiles genéticos mediante marcadores RAPDs permitió diferenciar todas las entradas clonales del sur de Uruguay estudiadas, aun clones de un mismo sitio de colecta (Pianzola *et al.*, 2005). Esta diversidad no se encontró asociada a un patrón de distribución geográfica (**Figura 2**). Actualmente se está trabajando en la ampliación de los estudios de la diversidad con otros tipos de marcadores moleculares, incluyendo entradas de diferentes regiones del país.

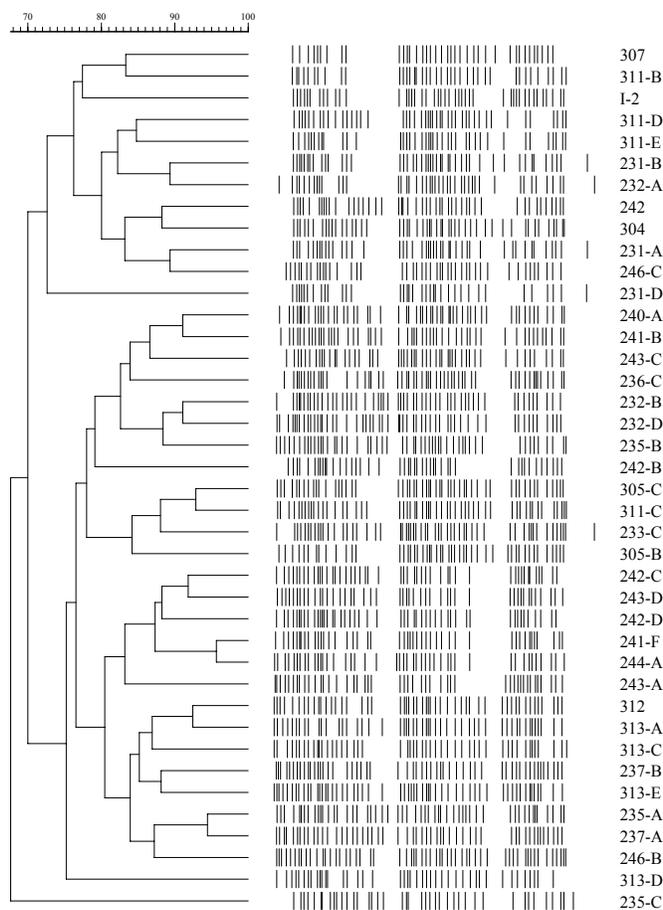


Figura 2. Dendrograma de similaridad genética (Jaccard) de 39 entradas de *Solanum commersonii* y una muestra de *Solanum tuberosum* (I2). Basado en tres perfiles genéticos obtenidos con RAPDs (según Pianzzola *et al.*, 2005).

4.3. Aislamiento de cepas de *Ralstonia solanacearum*

A partir de tubérculos de campos infestados se aislaron cepas locales de *Ralstonia solanacearum* las que se identificaron por métodos clásicos y moleculares. Se dispone de unas diez cepas y se continúa con la construcción de una colección. Si bien se ha ensayado la caracterización de las cepas, por el método molecular de rep-PCR no se las ha podido diferenciar hasta el momento. Todas las cepas correspondieron al Biovar 2 Raza 3.

4.4. Actividad HAG y contenido de glicoalcaloides

Se analizaron los extractos de hojas de diferentes entradas de *S. commersonii* para detectar la presencia de lectinas (mediante análisis de actividad HAG) en AE₂ y la presencia y cantidad de glicoalcaloides (mediante TLC cuantitativa) (Tabla 2). Seis de los diez AE₂ analizados dieron positivo para HAG, la cual fue inhibida por N,N'-diacetylchitobiose, un disacárido que es reconocido específicamente por la lectina de *S. commersonii* (Plá *et al.*, 2003). Esto indica que la actividad HAG es debida a la presencia de lectinas. Los niveles de actividad HAG específica variaron entre las entradas, incluso entre aquellas provenientes del mismo sitio de colecta.

Se encontró también una variación significativa en el contenido total de glicoalcaloides de las entradas, entre 3,9 y 25, 5mg/g de material seco ($p < 0.05$, LSD). Respecto a la distribución de los puntos de colecta, ni la actividad HAG ni el contenido total de glicoalcaloides sigue una tendencia geográfica. Estas variaciones pueden ser debidas a variaciones fitoquímicas significativas, lo cual es consistente con la biodiversidad ya conocida y reportada para esta especie.

Tabla 2. Contenido de glicoalcaloides totales, actividad hemo-aglutinante (HAG) y efecto inhibitorio producido por extractos foliares de *S. commersonii* sobre el crecimiento *in vitro* de *R. solanacearum* (según Siri *et al.*, 2005).

Entradas	Glicoalcaloides totales (mg/kg PS)	Actividad			
		HAG AHE *	AE ₁ **	AE ₂ **	OE**
1	25.5	-	- ***	0,6	0,8
2	13.4	246	-	-	1,2
3	11.2	2612	-	-	1,8
4	12.8	-	0,6	-	0,7
5	14.1	-	-	-	1,1
6	15.3	160	-	0,6	1,2
7	22.7	-	1,0	-	1,1
8	3.9	160	-	0,9	1,0
9	24.6	320	0,7	-	0,6
10	19.2	640	-	-	0,9

* AHE: Actividad HAG específica (definida en Métodos).

** AE₁, AE₂: extractos acuosos. OE: extracto orgánico, preparado como se describe en Métodos. Los valores son el diámetro (cm) de la zona de inhibición.

*** Resultados negativos, corresponden a extractos de entradas específicas sin inhibición del crecimiento y difieren de los resultados positivos con $p \leq 0.167$ (Mossel randomization test).

4.5. Ensayo de actividad *in vitro* frente a *R. solanacearum*

Los extractos preparados fueron evaluados en función de su actividad antimicrobiana frente a *R. solanacearum*, detectando actividad en dieciséis de las muestras ensayadas (**Tabla 2**). Los diez extractos orgánicos analizados presentaron actividad. La heterogeneidad de resultados observada para las entradas estudiadas, reafirma una vez más la diversidad de esta especie. Aún así, es interesante el gran número de extractos que inhibieron el crecimiento de este patógeno. Serán necesarios más estudios para determinar la naturaleza química de los compuestos responsables.

4.6. Evaluación de la resistencia

En una primera etapa se trabajó con plantas en invernadero mediante inoculación en la axila de la cuarta hoja. Las entradas tuvieron respuestas diversas. Predominantemente, se observó marchitez tardía con respecto al testigo *S. tuberosum* (**Figura 3**). El testigo mostró síntomas desde los 5-8 días después de la inoculación y entradas de *S. commersonii* caracterizadas como resistentes desde los 14-18 días, diferencia significativa en el índice de enfermedad ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test).

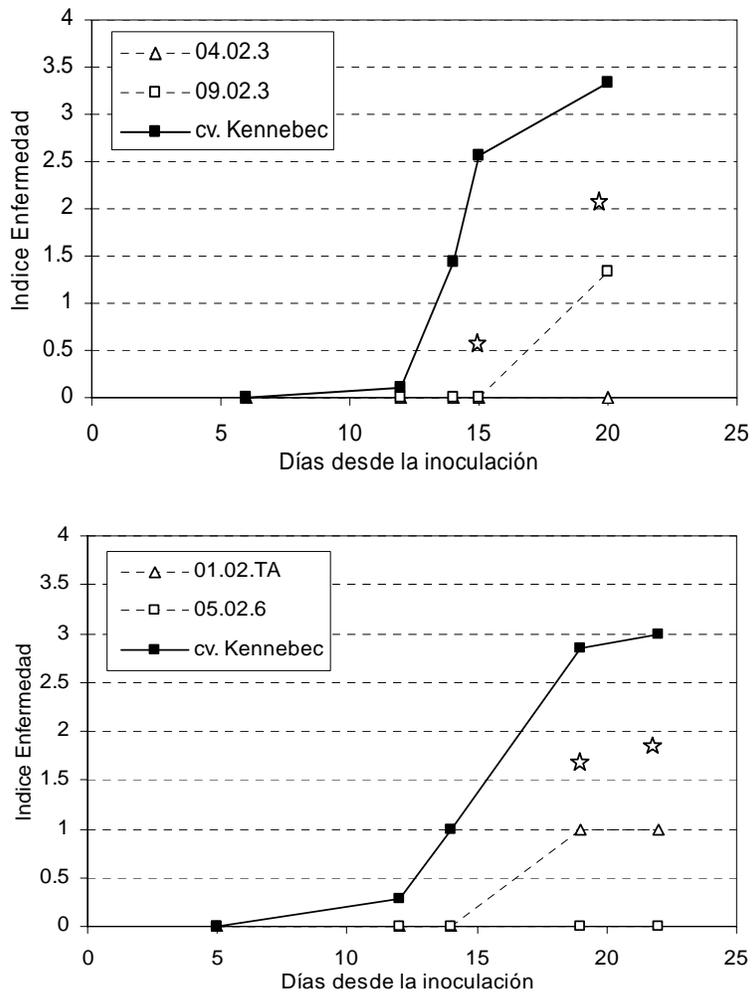


Figura 3. Evolución del nivel de marchitez promedio en dos experimentos independientes para cuatro clones de *S. commersonii*, en comparación con el cv. Kennebec utilizado como testigo. Inoculación realizada en la axila de la cuarta hoja desarrollada desde el ápice, $15 \text{ a } 30 \mu\text{L} \times 10^4 \text{ cfu/mL}$. (□) Diferencia estadísticamente significativa, Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

La **Tabla 3** resume la caracterización de la resistencia y el contenido de glicoalcaloides de algunos clones.

Tabla 3. Clones de *Solanum commersonii* caracterizados en su contenido de glicoalcaloides totales y en su respuesta frente a *Ralstonia solanacearum*. Inoculación mediante infiltración en la axila de la cuarta hoja desde el ápice.

Clon	Sitio de colecta	Glicoalcaloides totales (mg/kg PS)	Respuesta a <i>R. solanacearum</i> *
<i>Clones colectados a campo</i>			
01.02.TA	Soriano	32.820	R
02.04.1	Rocha	25.441	R
04.02.3	Colonia	12.647	R
04.09.T	Río Negro	-	R
05.02.6	Canelones	11.948	R
06.01.2	Canelones	-	R
09.02.2	Paysandú	-	S
09.02.3	Paysandú	32.508	R
09.02.4	Paysandú	-	S
09.02.11	Paysandú	-	S
10.05.8	Salto	1.931	R
10.08.6	Artigas	30.407	R
10.18.4	Salto	-	MR
10.16.7	Artigas	-	S
10.17.6	Salto	11.476	MR
10.08.5	Artigas	26.883	MR
10.07.3	Artigas	19.976	MR
<i>Clones obtenidos a partir de semillas</i>			
05.05.2.2	Canelones	42.770	R
05.05.2.4	Canelones	-	S
05.05.2.5	Canelones	-	S
05.05.2.6	Canelones	32.240	MR
05.05.2.8	Canelones	1.957	MR
05.05.2.10	Canelones	-	MS
05.05.2.16	Canelones	-	MS
05.05.2.18	Canelones	-	MS
05.05.2.19	Canelones	22.350	MR
05.05.2.22	Canelones	14.320	R

* Referencia: ver Tabla 1.

Otra respuesta fue la ocurrencia de repeticiones que se mantuvieron asintomáticas en clones que presentaron marchitez tardíamente. Tras la multiplicación vegetativa estos clones continuaron asintomáticos, aunque mediante rep-PCR con primers específicos se confirmó la presencia de *R. solanacearum*, por lo que *S. commersonii* se comportaría como portadora asintomática (latencia). Se prevé estudiar la ocurrencia de latencia luego de inoculación al suelo y testear la transmisión de la bacteria a los tubérculos. La evaluación por inoculación en la axila de la hoja mostró ser un método efectivo, pero probablemente muy severo y de limitada utilidad, en la medida que no refleja la forma en que se produce la infección natural en cultivos.

La evaluación por inoculación al suelo en condiciones controladas (27°C) con plántulas obtenidas por micropropagación, permitió identificar clones con resistencia completa (asintomática). Esta respuesta, similar a la reportada por Laferriere *et al.* (1999), confirma la potencialidad de *S. commersonii* como fuente de resistencia a *R. solanacearum*. Aun cuando se observó variación intraespecífica, en los clones caracterizados como sensibles la marchitez ocurrió tardíamente con respecto a *S. tuberosum*, lo que sugiere la presencia de diferentes mecanismos de resistencia.

4.7. Estudio de genes análogos de resistencia

En todas las reacciones de amplificación realizadas a partir de los cebadores diseñados, se obtuvieron amplicones en genotipos de *S. commersonii* (**Figura 4**) y en los controles; en particular, se consideró importante en el ajuste de las condiciones de reacción mantener el nivel de $MgCl_2$ de hasta 1.5mM para evitar posibles reacciones inespecíficas. Con los cebadores que flanquean el intrón presente en los motivos WRKY, se obtuvieron bandas de ~250, ~800 y ~900bp presentes en todos los genotipos testados (monomórficos). Con el empleo de cebadores dirigidos a los motivos TIR y WRKY se observaron tres bandas consistentemente en todos los genotipos, una de más de 2000bp y otras de ~200 y ~100bp. La banda de 2000bp resulta muy atractiva para estudios posteriores ya que es la que mejor se ajusta por su peso molecular a lo reportado en genes de tales características (Deslandes *et al.*, 2002). Si bien no hay diferencias observables entre el peso molecular de los amplicones obtenidos de los diferentes genotipos es esperable que exista variabilidad a nivel de secuencia.

En las reacciones de re-amplificación (*nested-PCR*) se obtuvieron dos bandas de 400 y 300bp presentes en todos los genotipos. Esto tiende a coincidir con las distancias existentes entre los motivos Kinasa 1^a y el hidrofóbico GLPLAL reportadas en varios genes R (Leister *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos mediante PCR y *nested-PCR* con el enfoque de genes análogos de resistencia, estarían confirmando la presencia de varios dominios conservados de genes R. Los perfiles electroforéticos identificaron varios amplicones monomórficos presentes en todos los genotipos testados y de pesos moleculares similares a los reportados en RGA, lo que sugiere que se han reconocido posibles genes candidatos. Estos primeros avances obtenidos alientan estudios posteriores tendientes a encontrar marcadores asociados a resistencias en *S. commersonii*.

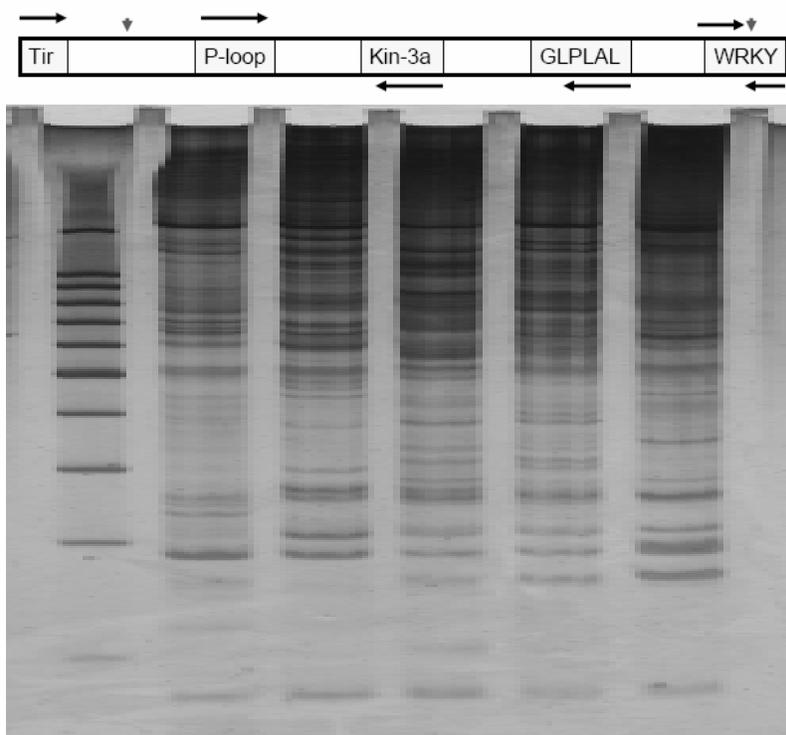


Figura 4. Perfiles de electroforesis obtenidos en genotipos de *S. commersonii* con una de las combinaciones de cebadores diseñados en el estudio de genes análogos de resistencia (RGAs). Carril izquierdo: marcador de peso molecular de 100 pb.

4.8. Cruzamientos

La **Tabla 4** detalla los cruzamientos realizados y el número de híbridos interespecíficos obtenidos mediante rescate de embriones *in vitro*. No se observaron diferencias entre los medios de cultivo ensayados, obteniendo porcentajes de germinación del orden de 70% en ambos casos. Las semillas se sembraron enteras, sin que hubiese necesidad de retirar la testa.

Los híbridos interespecíficos fueron clonados y conservados en medio de lento crecimiento (sales de MS + 40g/l de sorbitol). Serán evaluados en su resistencia a *R. solanacearum* mediante inoculación al suelo. La evaluación preliminar de glicoalcaloides reveló bajos niveles en *S. phureja* y en algunos híbridos interespecíficos, por lo que se esperan rápidos avances en esta característica.

Los clones 01.02.TA y el 05.02.6, que fueron caracterizados morfológicamente como formas atípicas de *S. commersonii*, tuvieron muy buen rendimiento como padres en el cruzamiento con *S. phureja*. Este hecho confirma las observaciones morfológicas, a las cuales se asociaría una mayor producción de polen 2n y compatibilidad con especies 2EBN. Se reafirma así la importancia de la exploración amplia de la especie realizada en Uruguay.

Tabla 4. Utilización de clones *Solanum commersonii* en cruzamientos realizados dentro del Programa de mejoramiento genético de papa de INIA.

Madre	Padre	Progenie resultado del rescate de embriones
Cruzamientos <i>S. commersonii</i> (R x S)		<u>13</u>
04.02.3 (R)	05.05.2.4 (S)	3
02.04.1 (R)	05.05.2.4 (S)	9
05.02.6 (R)	05.05.2.4 (S)	1
Cruzamientos <i>S. commersonii</i> (R) x <i>S. phureja</i>		<u>72</u>
04.02.3 (R)	Bulk <i>phu</i> *	6
02.04.1 (R)	Bulk <i>phu</i> *	2
01.02.TA (R)	94209	36
05.02.6 (R)	94209	28

* Comprende los clones 94.209 y 94.212-1.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. F. Haynes (North Carolina State University, US), quien facilitara el germoplasma *S. phureja*.

A la Asociación Nacional de Semilleristas de Papa (ANSEPA) por su colaboración e interés permanente.

Estas investigaciones se realizaron en el marco de los Proyectos CONICYT 99-4066, INIA-LIA 003, CSIC Sector Productivo 273 y PDT32-24 (Proyecto en curso).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradshaw, J.E.; Bryan, G.J. and Ramsay G. 2006. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Research* 49:49-65.

Carputo, D.; Terra, A.; Barone, A.; Esposito, F.; Fogliano, V.; Monti, L. and Frusciante, L. 2003. Glycoalkaloids and acclimation capacity of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent hardy species *Solanum commersonii*. *Theor. & Appl. Gen.* 107:1187-1194.

Castro, C.; Pereira A.; Costa, D.; Choer, E.; Mentz, L.; Augustin, E.; Viegas, J.; Gomes, C.; Campos, A.; Pedroso, R.; Garrastazú, M. and Barbieri, R.L. 2006. Wild potato genetic resources conserved in Southern Brazil: current knowledge and future perspectives. PAA Solanaceae Conference, July 2006. Madison, Wisconsin, US.

Chen, Y.K.H.; Palta, J.P. and Bamberg, J.B. 1999. Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. *Theoretical and Applied Genetics* 99:100-107.

CIP. 1985. Present and future strategies for potato breeding and improvement. Planning Conference 26th (Lima, 12-14 Dec. 1983). Centro Internacional de la papa. Lima. 203p.

- Correll, D.S. 1962. The potato and its wild relatives, section *Tuberarium* of the genus *Solanum*. Renner, Texas Research Foundation. 606p.
- Dalla Rizza, M.; Real, D.; Quesenberry, K.H. and Albertini, E. 2004. Plant reproductive system determination under field conditions based on codominant markers. *J. Genet. & Breed.* 58:47-54.
- Deslandes, L.; Olivier, J.; Peeters, N.; Theulières, F.; Hirsch, J.; Xin Feng, D.; Bittner-Eddy, P.; Beynon, J. and Marco, I. 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.* 99 (4) 2404-2409.
- Ferreira, F.; Moyna, P.; Soulé, S. and Vázquez, A. 1993. Rapid quantitative determination of *Solanum* glycoalkaloids by TLC-scanning. *Journal of Chromatography* 653:380-384.
- French, E.R. and De Lindo, L. 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. *Phytopathology* 72:1408-1412.
- French, E.R.; Anguiz, R. and Aley, F.P. 1998. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. *In*: P. Prior, C. Allen, J. Elphinstone (Eds), *Bacterial wilt disease, molecular and ecological aspects*. Springer, Berlin, pp. 381-385.
- Friedman and McDonald, 1997. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety and plant physiology. *Critical Reviews in Plant Sc.* 16:55-132
- Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27: 265-277.
- Hawkes, J.G. 1990. The potato: evolution, diversity and genetic resources. Belhaven Press. London. 259 pp.
- Hellenas, K.E. 1986. Simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloids in tuber extracts by HPLC, comparison with ELISA and a colorimetric method. *Journal of Science of Food and Agriculture* 37:776-782.
- Kim-Lee, H.; Moon, J.S.; Hong, Y.S.; Kim, M.S. and Cho, H.M. 2004. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Amer. J. of Potato Res.* 82:129-137.
- Iwanaga, M.; Freyre, R. and Watanabe, K. 1991. Breaking the crossability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica* 52:183-191.
- Janse, J.D.; van den Beld, H.E.; Elphinstone, J.; Simpkins, S.; Tjou-Tam-Sin, N.N.A. and van Vaerenbergh, J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, Race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *J. of Plant Pathology* 86(2):147-155.
- Jansky, S. 2006. Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding* 125:1-12.
- Laferriere, L.T.; Helgeson, J.P. and Allen, C. 1999. Fertile *S. tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. *Theor. & Appl. Gen.* 98:1272-1278.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley and Sons. New York.
- Laroche, A.; Gaudet, D.A.; Schaalje, G.B.; Erickson, R.S. and Ginns, J. 1995. Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating, RAPD and RFLP analyses. *Mycological Research* 99: 297-310.
- Leister D.; Ballvora, A.; Salamini, F. and Gebhardt C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature genetics* 14: 421-429.
- Masuelli, R.W. 1990. Gametos 2n y poliploidización sexual en la especie silvestre de papa *Solanum commersonii* Dun. Tesis M.Sc. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 54p.

- McCloud, T.G.; Nemeč, J.; Muschik, G.; Sheffield, H.G.; Quesenberry, P.; Suffness, M.; Cragg, G. and Thompson, J. 1988. Extraction of bioactive molecules from plants. Proceedings of an International Congress on Natural products Research. July, Park City, Utah, USA.
- McDowell, J.M. and Woffenden, B.J. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology* 21(4):178-183.
- MGAP-DIEA. 2003. Caracterización de la producción de papa. Encuesta 2003. Dirección de Investigación y Estadísticas Agropecuarias, Boletín Informativo, Serie Encuestas Nro 214. Montevideo.
- Montanelli, C.; Chiari, A.; Chiari, T.; Stefanini, F. and Nascari, G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. *Euphytica* 81:35-43.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nelson, L. and Haynes, F.L. 1960. Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas solanacearum*. *Amer. Potato J.* 37: 260-267.
- Pianzola, M.J.; Zaranonelli, L.; Gonzalez, G.; Franco-Fraguas, L. and Vazquez, A. 2005. Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild accessions of *Solanum commersonii*. *Biochem. System. & Ecology* 33:67-78.
- Plá, A.; Alonso, E.; Batista-Viera, F. and Franco-Fraguas, L. 2003. Screening for carbohydrate-binding proteins in extracts of Uruguayan plants. *Brazilian J. of Medical and Biol. Res.* 36:851-860.
- Rüdiger, H. and Rougé, P. 1998. Structure and functions of plant lectins. *Carbohydrates in Europe* 23:18-22.
- Singsit, C. and Hanneman, R.E.Jr. 1991. Rescuing inter EBN potato hybrids through double pollination and embryo rescue. *Plant Cell Reports* 9:475-478.
- Siri, M.I.; Villanueva, P.; Pianzola, M.J.; Franco-Fraguas, L.; Galván, G.; Acosta, M. and Ferreira, F. 2005. *In vitro* antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun from Uruguay. *Potato Research* 47:127-138.
- Smith, P.K.; Khron, R.I.; Hermanson, G.F.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D. *et al.*, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85.
- Thurston, H.D. and Lozano, J.C. 1968. Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. *Amer. Potato J.* 45:51-55.
- Vázquez, A.G.; González, F.; Ferreira, P.; Moyna and Kenne, L. 1997. Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* Dun. *Ex Poir. Euphytica* 95:195-201.
- Winstead, N.N. and Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42: 628-634.

LOS RECURSOS GENÉTICOS DE *Acca sellowiana* (Berg.) Burret EN URUGUAY.

Rivas, M.¹ Vignale, B.²; Camussi, G.¹; Puppo, M.¹; Pritsch, C.¹

1. RESUMEN

Acca sellowiana (Berg.) Burret, conocido como guayabo a nivel local o pineapple guava a nivel internacional, presenta su centro de diversidad en el sur de Brasil y norte de Uruguay. Es reconocido internacionalmente por su valor como especie frutal y ornamental. El interés despertado por el cultivo de guayabo en otros países se debe a su adaptabilidad a un amplio rango de condiciones climáticas y elevadas cualidades organolépticas de sus frutos. A nivel general se distinguen dos grupos de guayabos, el tipo Brasil de semillas grandes y cáscara dura y seca; y el tipo Uruguay, con semillas pequeñas y cáscara blanda y succulenta. Los cultivares obtenidos en otras regiones del mundo provienen de una estrecha diversidad genética de germoplasma del “tipo Uruguay”. El conocimiento sobre la distribución, diversidad genética y valor agronómico de poblaciones silvestres y materiales seleccionados por pobladores locales en Uruguay se encuentra en sus primeras etapas. El objetivo del proyecto “Primer estudio sistemático de las poblaciones de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret como recurso genético” es la caracterización de la diversidad genética y el valor agronómico de poblaciones de *Acca sellowiana* de Uruguay. Se propone la prospección de poblaciones silvestres y de materiales cultivados, la caracterización de las poblaciones, la ampliación de la base genética de las colecciones existentes, la evaluación del potencial agronómico de los materiales y la realización de un estudio de mercado. Los resultados señalan la existencia de poblaciones silvestres y de materiales cultivados que albergan importante diversidad genética, tanto en características morfo-fenológicas como productivas. Estos recursos genéticos resultan sumamente valiosos para la ampliación de la base genética del programa de mejoramiento y para diseñar programas de conservación *in situ* y *ex situ*. La prueba de degustación y encuesta de opinión estaría indicando una buena valoración de la fruta desde el punto de vista del sabor, aroma y textura, no así para las características externas del fruto. Estas consideraciones deberán ser tenidas en cuenta al momento de lanzar un producto comercial al mercado, ya que serán necesarias estrategias en las que esté presente la degustación del fruto, así como una explicación de sus bondades y usos.

Palabras claves: *Acca sellowiana*, Diversidad, Caracterización.

2. INTRODUCCIÓN

Acca sellowiana (Berg.) Burret, ex *Feijoa sellowiana* Berg., de la familia Myrtaceae, es conocida en Uruguay como Guayabo del país o Guayabo. Es un árbol pequeño, generalmente de 2 a 4 metros de altura. En Brasil se lo conoce como “goiabeira serrana” o “do mato”, e internacionalmente como “pineapple guava”. El centro primario de distribución incluye el sur de Brasil y el norte de Uruguay. Ecológicamente se encuentra asociado a los bosques de *Araucaria angustifolia* en el planalto meridional brasileño y a menor altitud asociado a bosques ralos y praderas naturales, en serranías y quebradas del sur de Brasil y nor-noreste de Uruguay. El guayabo en Uruguay se incluye en la flora Oriental, integrada en gran parte por especies paranaenses (Grela, 2004).

El guayabo es reconocido por su valor como especie ornamental y frutal desde fines del siglo XIX, en que fue introducido a Europa desde el centro de diversidad primario y de ahí se dispersó por la cuenca mediterránea. A principios del siglo XX la especie fue llevada desde Francia a California y Florida en los Estados Unidos y desde allí a Australia y Nueva Zelanda. En la actualidad es cultivado a escala comercial en Nueva Zelanda, California, Colombia, Georgia y Azerbaijón (Thorp y Bielecki, 2002); mientras que en Uruguay y Brasil sólo existen pequeñas experiencias de cultivo.

El interés despertado por el cultivo de guayabo en otros países se debe a su adaptabilidad a un amplio rango de condiciones climáticas y elevadas cualidades organolépticas de sus frutos, que se prestan tanto para el consumo en fresco como para diversas técnicas de elaboración (mermeladas, jugos, etc.) (Cacioppo, 1984). Esta especie presenta buena resistencia a heladas y precocidad productiva.

¹ Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay Garzón 780. Montevideo, Uruguay. e.e.: mrivas@fagro.edu.uy

² Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto. Ruta 31, km 21.5. Salto. Uruguay. e.e.: herbea@adinet.com.uy

El fruto es una baya de forma variable, cuyo color varía en tonalidades del verde, con cáscara lisa o rugosa, y con pesos entre 25 y 60g, aunque algunos cultivares llegan a pesos de 130g o más (Tocornal, 1988). La pulpa cuando el fruto es maduro se presenta gelatinosa y color hielo, con un aroma penetrante y peculiar. Es rico en yodo (3mg/100g) y el tenor de vitamina C es comparable al de los cítricos (Ducroquet *et al.*, 2000).

Naturalmente se distinguen dos poblaciones, una distribuida en las mayores altitudes del planalto meridional brasileño, con semillas grandes y cáscara dura y seca y la otra población restringida a Uruguay y al sur del Brasil, asociada a las áreas de menor altitud, con semillas pequeñas y cáscara blanda y succulenta (Thorp y Bielecki, 2002). Nodari *et al.* (1997) reportaron, para el guayabo “grupo Brasil” y “grupo Uruguay”, el rango de variación de caracteres morfológicos y agronómicos, así como la estimación de la diversidad genética con marcadores isoenzimáticos, detectándose diferencias apreciables entre ambos tipos de guayabo.

Por otra parte, Mattos (1986) también considera que existen dos tipos de variedades cultivadas de guayabo, el “guayabo grande o rugoso”, con frutos de cáscara rugosa y pulpa ácida y el “guayabo chico o típico”, de cáscara lisa y pulpa dulce. El autor señala que en Montevideo en 1952, estas variedades se comercializaban con precios de venta diferentes. En esa época encontró en Uruguay una importante diversidad de formas cultivadas, intermedias entre ambas variedades, así como materiales con ciclos precoces, intermedios y tardíos. Estos ejemplares cultivados eran diferentes de aquellos existentes en el Norte de Uruguay, donde abundan los ejemplares silvestres por ser su sitio natural de distribución, lo que indicaría el grado de selección realizado por los pobladores locales.

Los programas de mejoramiento han creado diversos cultivares, siendo los más conocidos los neocelandeses Triumph, Mammoth, Gemini y Apollo. Dettori y Palombino (2000) analizaron la diversidad de marcadores RAPDs en 25 cultivares y entradas presentes en los programas de mejoramiento y concluyeron que la mayoría de los materiales provenían de muy pocas introducciones. Esta situación también ha sido señalada por Nodari *et al.* (1997). Se considera que la mayoría de los cultivares provienen de germoplasma del guayabo “grupo Uruguay”, representando una estrecha diversidad genética (Ducroquet *et al.*, 2000; Thorp y Bielecki, 2002).

Con respecto a la diversidad de la especie a nivel silvestre, el único antecedente existente en Uruguay es un estudio sobre nueve pies de guayabos ubicados en el departamento de Tacuarembó, al norte del país. Se destaca la diversidad apreciada en fecha de floración y fructificación, abundancia de flores y frutos, tamaño y forma de frutos, grosor, rugosidad y color de la cáscara, espesor y jugosidad de la pulpa (Tálice *et al.*, 1996). Estos datos, aunque realizados sobre pocas plantas de guayabo, señalan la diversidad que presenta la especie en el país y la necesidad de coleccionar materiales para ampliar la base genética para la domesticación y mejoramiento genético de la especie.

También se reconoce que los pobladores rurales han seleccionado y propagado las mejores plantas, que pueden considerarse variedades locales y que son prioritarias para el mejoramiento genético. Estos materiales se cultivan en huertos y jardines familiares, desde donde es posible se hayan escapado de cultivo, pasando a ocupar áreas naturales como individuos o poblaciones subespontáneas (Marchesi, com. pers.).

Desde 2002, la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto, desarrolla un proyecto de evaluación y selección de diferentes tipos de guayabo. En el jardín de introducción se han plantado materiales colectados de huertas y jardines de diferentes zonas del país (Vignale y Bisio, 2005). También se realiza el seguimiento de un monte instalado a partir de plantas de semilla provenientes de diferentes viveros del país, en el que se distinguen diferentes tipos de plantas.

Cunda (2006) estudió 14 plantas de 28 años de edad de un monte instalado a partir de semillas cosechadas de un árbol de guayabo, que provenía de la selección realizada por un fruticultor del área rural de Montevideo. Los resultados obtenidos evidencian homogeneidad en las características vegetativas así como en la fenología de la floración. Sin embargo se observó una notoria variabilidad entre plantas, a pesar del grado de parentesco entre ellas, en cuanto a las características productivas y calidad de fruta, permitiendo una primera selección de materiales promisorios para la fruticultura.

La comercialización del guayabo en Uruguay puede definirse como de tipo informal ya que el volumen transado es reducido, con venta directa a comercios minoristas. Los fruticultores resaltan como ventaja de la especie una muy

buena conservación de la fruta en mostrador y como desventajas la gran variabilidad de las frutas y las plantas (plantas provenientes de semillas de plantas seleccionadas), la alternancia productiva de algunos árboles así como el desconocimiento del consumidor sobre la especie. Por otra parte, los técnicos consultados señalan además como limitante para el desarrollo del cultivo el desconocimiento de las prácticas agronómicas adecuadas al mismo (Camussi, com. pers.).

La apuesta al desarrollo del cultivo de guayabo en Uruguay se justifica por el éxito de la especie en otros lugares del mundo, la necesidad de diversificar la oferta de fruta, las cualidades nutricionales de la misma y la amplia gama de destinos a los que se ajusta. También es necesario valorizar el carácter ornamental de la especie.

Paralelamente en las regiones donde ocurren naturalmente las poblaciones de guayabo, los pobladores locales que conocen y valoran el recurso genético son actores fundamentales para la conservación y utilización de la especie “*in situ*”.

El objetivo del proyecto “Primer estudio sistemático de las poblaciones de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret como recurso genético” es la caracterización de la diversidad genética y el valor agronómico de poblaciones de *Acca sellowiana* de Uruguay. Se propone la prospección de las zonas de distribución natural, la caracterización de las poblaciones y los sitios ecológicos; la ampliación de la base genética de las colecciones existentes mediante incorporación de materiales silvestres y variedades locales; la caracterización y evaluación del potencial agronómico de los materiales y la realización de un estudio de mercado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Prospección y caracterización de poblaciones naturales

En la primavera del 2005 se identificaron dos áreas geográficas para la prospección de individuos de guayabo: la Quebrada de los Cuervos en el departamento de Treinta y Tres, y el Valle Edén en el departamento de Tacuarembó (**Figura 1**). Los principales antecedentes para ambas áreas provinieron de la base de datos perteneciente al Herbario “Profesor Bernardo Rosengurtt” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República Oriental del Uruguay.

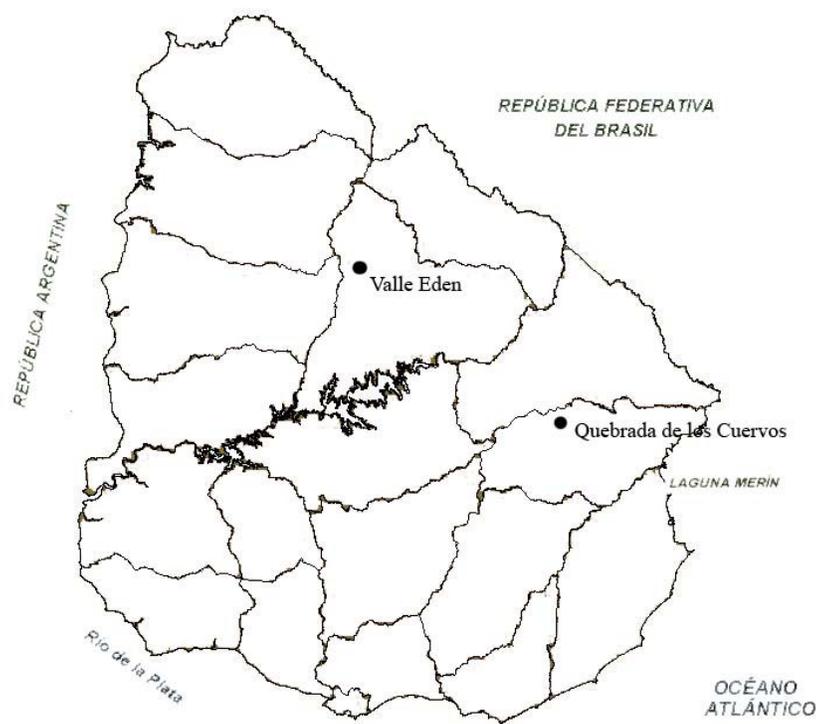


Figura 1.- Mapa con la ubicación geográfica de las poblaciones silvestres de *Acca sellowiana*: Quebrada de los Cuervos y Valle Edén.

	DESCRIPTOR
PLANTA	Hábito de crecimiento
	Diámetro de copa
	Altura
	Diámetro de tronco a 20 cm del suelo
	Nº de troncos

La Quebrada de los Cuervos ocupa un área de 3100 hectáreas que se ubica en la carta topográfica E-18 “Puntas del Yerbal” (escala 1:50000) y en la foto aérea del Servicio Geográfico Militar–misión 1966, número 98-011 (escala 1:20000). El Valle Edén se ubica en la carta topográfica J-12 “Tacuarembó” y en las fotos aéreas 202-035 y 203-158.

En la Quebrada se distinguen dos zonas principales por su topografía y vegetación, la pradera natural y la quebrada propiamente dicha. Acorde al relevamiento de flora realizado por Basso y Pouso (1992), se distinguen el bosque ribereño en la zona baja de la quebrada a orillas del arroyo Yerbalito; una zona media con especies tanto xerófilas como hidrófilas y donde comienza a aparecer *Syagrus romanzoffiana* (palma pindó); y una zona superior de la quebrada dominada por *Heterothalamus alienus* (romerillo), *Mimosa hassleriana*, *Radlkoferotoma cistifolium* y *Dodonea viscosa* (chirca de monte). La pradera natural se desarrolla en la cima de las sierras, asociado a pequeños bosquecillos de fisonomía achaparrada. En el listado de especies indicadas por estos autores, se señala la presencia de *A. sellowiana*. El relevamiento se realizó específicamente en el área protegida (365hás), propiedad de la Intendencia Municipal de Treinta y Tres y en un predio agropecuario aledaño a la misma.

El paisaje del área de Valle Edén se caracteriza por la típica presencia de “cerros chatos” y bosques en una matriz de praderas naturales y cultivos, donde Tállice *et al.* (1996) habían identificado plantas de guayabo.

En ambas áreas se relevó un mínimo de 50 individuos, los cuales fueron identificados y mapeados mediante el uso de un GPS.

La lista de descriptores y los estados correspondientes fue confeccionada previamente mediante revisión bibliográfica y consulta con técnicos familiarizados con la especie. En el **Cuadro 1** se presenta la lista de descriptores. También se colectaron hojas jóvenes de cada individuo de las dos poblaciones para el análisis de la diversidad genética mediante marcadores moleculares, trabajo que se encuentra en ejecución.

	Densidad de ramas
	Forma de la copa
HOJA	Forma
	Forma del ápice
	Forma de la base
	Largo (desde base del peciolo hasta ápice)
	Ancho
	Color
	Grado de pilosidad
FLOR	Diámetro medio de abertura del conjunto de estambres
	Distribución de los estambres en la flor
	Distancia entre estigma y el conjunto de anteras
	Nº de estambres
	Largo del estilo
	Color cara adaxial de los pétalos
	Grosor de los pétalos
FRUTO	Forma (según Altura y Diámetro)
	Forma de la base
	Forma del ápice
	Posición del ápice
	Posición de los sépalos
	Rugosidad (Textura de la cáscara)
	Persistencia del pistilo
	Color externo de la cáscara
	Color interno de la cáscara
	Color de la pulpa
	Peso
	Dureza de la cáscara
	Espesor de la cáscara
	Peso de la pulpa
	Presencia de espacio entre pulpa y cáscara
	Nº de semillas por fruto
	Peso de 100 semillas
Acidez	
Sólidos Solubles Totales	

Cuadro 1. Lista de descriptores de *Acca sellowiana*

3.2. Selección de materiales con potencial frutícola

Se realizaron prospecciones de materiales potencialmente interesantes tanto en zonas silvestres como en establecimientos rurales, parques, jardines y quintas frutícolas, en diferentes regiones del país. Los materiales seleccionados se instalaron en un jardín de introducción en el predio de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto. De las plantas seleccionadas se posee, en su gran mayoría, alguna información previa productiva y de calidad de fruta. Se realizó la caracterización de la fruta, según descriptores internacionales para fruta (IPGRI, 1999), adaptándolos a esta especie. Se realizaron también observaciones fenológicas, vegetativas, productivas y sanitarias.

3.3. Sondeo del valor de mercado de la fruta

Con el objetivo de comenzar a caracterizar objetivamente la opinión de los consumidores, se realizó con fruta proveniente de plantas de semilla, una degustación dirigida a estudiantes, docentes y funcionarios de la Facultad de Agronomía, con posterior encuesta de opinión (Vernette, 2000). Se obtuvieron 95 respuestas en total. Los principales aspectos de la encuesta se referían a:

- Conocimiento de la fruta.
- Opinión sobre aroma, sabor, textura de la pulpa, color de la cáscara y aspecto del fruto.
- Conocimiento sobre forma de consumo en fresco.
- Sugerencia de una frase con la que promocionar la fruta de guayabo.
- Precio que estaría dispuesto a pagar por kilogramo de fruta.
- Datos personales.

En el próximo año, contando con más fruta y un cuestionario mejorado en función del realizado, se pretende realizar un acción similar pero expandiendo a una muestra representativa de la población de la ciudad de Montevideo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Prospección y caracterización de poblaciones naturales

En este trabajo se presentan los resultados correspondientes a la caracterización por forma y textura de la cáscara de los frutos de las poblaciones de Quebrada de los Cuervos y Valle Edén (**Cuadros 2 y 3**, respectivamente).

Cuadro 2. Frecuencia de individuos según la forma de los frutos.

Forma de fruto	Quebrada de los Cuervos	Valle Edén
Redondo	0.40 (12/30)	0.14 (5/37)
Oval	0.47 (14/30)	0.51 (19/37)
Oblongo	0.13 (4/30)	0.30 (11/37)
Elongado	0 (0/30)	0.05 (2/37)

Cuadro 3. Frecuencia de individuos según la textura de la cáscara de los frutos.

Textura de la cáscara	Quebrada de los Cuervos	Valle Edén
Liso	0.24 (7/29)	0.16 (6/37)
Semi-rugoso	0.41 (12/29)	0.73 (27/37)
Rugoso	0.35 (10/29)	0.11 (4/37)
Muy rugoso	0 (0/29)	0 (0/37)

La forma de fruto se definió a partir a la relación entre altura y diámetro, siendo redondos aquellos con una relación menor a 1.1, ovals con una relación entre 1.1 y 1.3, oblongos con una relación entre 1.3 y 1.5 y elongados con una relación mayor a 1.5 (**Figura 2**).

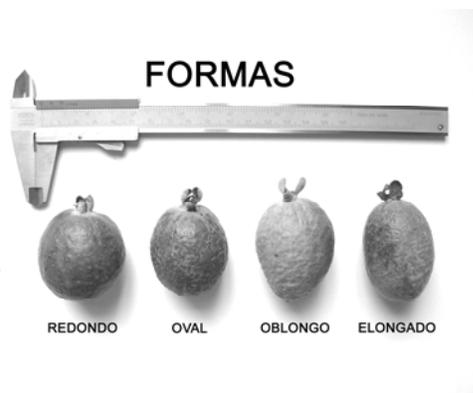


Figura 2. Estados del descriptor “forma de fruto” en *Acca sellowiana*.

La rugosidad de la cáscara se registró cualitativamente mediante la utilización de los siguientes estados: lisa, semi-rugosa, rugosa, muy rugosa (**Figura 3**). Para ambos descriptores se registraron los datos de 10 frutos por individuo. El número de individuos en los que se registraron datos es menor al total de los identificados debido a que no en todos ellos fue posible obtener frutos. En algunos casos se registró la información en menos de 10 frutos.

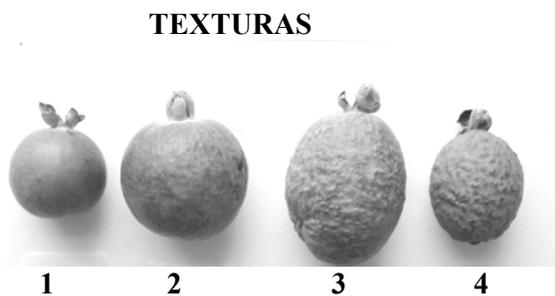


Figura 3. Estados del descriptor “Textura de cáscara” en *Acca sellowiana*.

La media de altura de los frutos de la Quebrada de los Cuervos fue de 35.9 ± 9.2 mm, mientras que la de Valle Edén fue de 23.8 ± 4.2 mm. Lo mismo sucedió con el diámetro de frutos, que fue para la Quebrada de 31.4 ± 7.1 mm y para Valle Edén de 19.4 ± 4 mm. Esta diferencia podría ser explicada por la escasez de agua ocurrida en el área de Valle Edén durante el período del verano y otoño 2006.

La diversidad encontrada entre los frutos de un mismo árbol para estos descriptores fue nula para la mayoría de los individuos, aunque excepcionalmente algún árbol presentó frutos con más de una forma o rugosidad.

La población de Valle Edén presentaría mayor diversidad para forma de fruto no sólo por poseer individuos con los cuatro estados del descriptor, sino por las frecuencias encontradas de cada categoría. La presencia de individuos con frutos elongados en esta población se destaca por ser una característica buscada por el mejoramiento genético.

La diversidad encontrada en la variable forma de fruto en ambas poblaciones pone en evidencia el potencial para el mejoramiento genético que tiene el guayabo en el centro de diversidad y la necesidad de iniciar acciones destinadas a su conservación.

Para rugosidad de la cáscara ninguno de los individuos fue clasificado con la categoría muy rugosa, acorde a las imágenes que se disponen sobre esta condición. Este resultado coincide con los antecedentes acerca de que en Uruguay no se presentaría esa característica.

Si bien ambas poblaciones tuvieron individuos con frutos de los otros tres estados del descriptor rugosidad, la población de la Quebrada de los Cuervos presentaría mayor diversidad que la del Valle Edén que concentra en la categoría de semi-rugosa un importante porcentaje de individuos. Se destaca la presencia de individuos con cáscara lisa, característica deseable para la fruta comercial.

Próximamente se culminará con el análisis de la diversidad morfo-fenológica de las dos poblaciones para los descriptores presentados en el **Cuadro 1** y se obtendrán los resultados de la diversidad molecular de las mismas. En la próxima temporada se prospeccionarán otras dos poblaciones naturales del Guayabo del País.

La identificación y caracterización de las poblaciones naturales de *Acca sellowiana* de Uruguay permitirá incrementar la base genética del programa de mejoramiento y establecer criterios para la conservación y utilización *in situ* de la especie

4.2. Selección de materiales con potencial frutícola

En concordancia con la bibliografía consultada, en la prospección se han encontrado desde ejemplares de más de 100 años hasta plantaciones jóvenes. Plantas de guayabo se observaron junto a membrilleros y perales en los jardines de antiguos establecimientos rurales de la Cuchilla Grande, y junto a otras especies como naranjos en la Cuchilla de Haedo. Existen numerosas plantas en la región frutícola del Sur, algunas también centenarias, evidenciándose que esta especie formaba parte de los frutales cultivados por otras generaciones en algunas zonas del país. Actualmente se pueden encontrar plantas jóvenes en varias regiones, tanto en parques como en plantaciones frutícolas.

Se observaron grupos de plantas muy poco productivas, aun en presencia de diversidad de polen, a su vez algunos grupos presentan hábito de crecimiento erecto y con gran densidad de ramas, mientras que otros, tienen pocas ramas y largas, formando una copa muy abierta.

Se han seleccionado plantas en 18 sitios en diversas regiones del país, introduciéndose a la colección 59 materiales diferentes, de los cuales 12 de ellos provienen de zonas silvestres o subespontáneas y el resto de materiales de quintas frutícolas y parques de establecimientos rurales.

Es de destacar que las observaciones realizadas coinciden con los estudios realizados por los Prof. Joao Rodríguez Mattos (1986) y Primavera Izaguirre (1996) y la información aportada por el Lic. Marchesi, tanto en los tipos de fruta encontrada como en su distribución.

El período de floración en general es prolongado, extendiéndose desde el mes de octubre hasta mediados de noviembre, encontrándose algunas plantas que poseen la floración más concentrada. En cuanto al período de cosecha, los materiales estudiados fueron divididos en tres categorías: tempranos (antes del 15 de marzo), de estación o intermedios (entre el 15 de marzo y el 15 de abril) y tardíos (después del 15 de abril). Esta clasificación es preliminar y se deberán ajustar las fechas a partir de los datos de la colección.

Se ha encontrado una gran diversidad en las frutas estudiadas, con diferencias en la forma (desde redondos a elongados), peso (desde 5 a 90g), color (de verde oscuro a verde claro), textura externa, espesor de cáscara, número y tamaño de las semillas y calidad interna de la fruta. Estos datos se han podido relacionar con los obtenidos por Mattos (1986), identificando numerosas plantas que producen fruta de alta calidad, de buen tamaño y muy productivas, que se acercarían a las plantas mejoradas a las que se refiere dicho autor como del tipo “guayabo grande”. En el **Cuadro 4** se detallan algunos datos de los distintos tipos seleccionados, ordenados con respecto a forma de fruta. Se han encontrado muy buenos individuos con fruta redonda, lisa o algo rugosa, de maduración temprana e intermedia. A su vez varias plantas seleccionadas pertenecen al grupo de tardías con frutos grandes, verde oscuros y no tan sabrosos como los del primer grupo.

Cuadro 4. Características de fruta y época de madurez de algunos materiales seleccionados.

Accesiones	Peso (g/fr)	Altura (mm)	Diámetro (mm)	A/D	Textura externa	Color externo	° Brix	Época de madurez
127	24.5	34.4	35.1	0.98	AR	Verde claro	12.7	2
70	29.8	36.2	36.8	0.98	AR	Verde claro	12.7	1
G 30	21.4	33.0	33.0	1.00	L	Verde claro	12.6	1
RN 5	29.9	34.7	30.7	1.13	AR	Verde	12.9	2
Tcó cab	12.0	32.1	27.4	1.17	AR	Verde claro	12.8	2
LL 3	27.5	41.6	34.4	1.21	AR	Verde	10.0	2
SJ VII 1	51.2	51.1	42.1	1.21	R	Verde oscuro	12.6	3
N 2.1	37.0	48.5	38.0	1.27	AR	Verde claro	12.5	3
LL 1	42.5	54.9	37.6	1.46	R	Verde oscuro	9.47	3
JP	48.0	56.6	38.6	1.47	R	Verde oscuro	15.3	2

1: temprana; 2: intermedia; 3: tardía

L: liso; AR: algo rugoso; R: rugoso

Desde el punto de vista sanitario, se ha podido observar en la prospección, algunos materiales con frutas que presentaban antracnosis, causada por *Colletotrichum gloesporioides* Penz (Cassanello, com. per.).

4.3. Sondeo del valor de mercado de la fruta

Los resultados preliminares indican que el 43,2% de los encuestados no conocía el fruto (debe recordarse que la población encuestada está directamente relacionada con el medio rural, por lo que en próximos estudios es esperable que el conocimiento de la fruta sea mayor). A nivel general, la opinión sobre la fruta marcó un 86.3% de opiniones a favor de los ítems: buena y deliciosa, aun en quienes no conocían la fruta y la degustaban por primera vez, llegando al 82.9% las suma de las opiniones buena y deliciosa.

Interesaba conocer la opinión sobre la apariencia del fruto y los aspectos a los que el consumidor puede atribuir valor, por lo que, utilizando una escala de Lickert de 1 a 5 (Schiffman y Kanuk, 1991), donde 1 es lo peor y 5 lo mejor, se pidió valoración para: aroma, sabor, textura de la pulpa, color de la piel del fruto, aspecto externo del fruto. Las respuestas obtenidas se presentan en el **Cuadro 5**. Se observa que la mayor valoración del fruto está dada por sus características internas, de sabor fundamentalmente y aroma en segundo lugar, mientras que el aspecto exterior, sin llegar a extremos de rechazo, no resulta tan atractivo. Estas consideraciones deberán ser tenidas en cuenta al momento de lanzar un producto comercial al mercado, ya que serán necesarias estrategias en las que esté presente la degustación del fruto, así como una explicación de sus bondades y usos.

Cuadro 5. Distribución en porcentaje de los resultados de la encuesta de opinión. Escala de Lickert¹

Características del fruto	1	2	3	4	5
Aroma	1.2	15.6	25.3	33.7	18.9
Sabor	2.2	5.4	17.4	47.8	27.2
Textura	2.2	3.3	33.0	42.9	18.7
Color cáscara	5.6	24.7	39.3	22.5	7.9
Aspecto externo	7.1	16.5	34.1	29.4	12.9

¹Valores de 1 a 5 indican opiniones de "lo peor" a "lo mejor".

Total de encuestas: 95

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al PDT (Programa de Desarrollo Tecnológico) de la DINACYT por el apoyo brindado para la realización del proyecto de investigación: “Primer estudio sistemático de las poblaciones de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret como recurso genético”.

A la Intendencia Municipal de Treinta y Tres por las facilidades brindadas para el alojamiento en la Quebrada de los Cuervos.

Al Señor Moizo, productor frutícola, que ofreció gentilmente la fruta para la prueba de degustación.

A los Ings. Agrs. J.P. Nebel (MGAP- Dirección Forestal), D. Cabrera (INIA) y N. Cunda, productores y pobladores de las áreas prospectadas por su invaluable participación y colaboración.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basso, L. y Pouso, J.M. 1992. Relevamiento y descripción de la flora arbórea y arborescente de la Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres. Tesis. Facultad de Agronomía. Uruguay. 279 p.

Cacioppo, O. 1984. La Feijoa. Manuale Practico. Reda. Ed. per l'Agricoltura. Roma. Italia. 80 p.

Cunda, N. 2006. Caracterización de plantas de “Guayabo del país” (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) desde un enfoque frutícola. Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Uruguay. 98 p.

Dettori, M.T. and Palombi, M.A. 2000. Identification of *Feijoa sellowiana* Berg accessions by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 86: 279-290.

Ducroquet, J-P.H.J.; Hickel, E.R. e Nodari, R.O. 2000. Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*). Jaboticabal, SP, Ed. Funep. 66 p. (Série Frutas Nativas).

Grela, I. 2004. Geografía Florística de las Especies Arbóreas de Uruguay: Propuesta para la Delimitación de Dendrofloras. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Ministerio de Educación y Cultura - Universidad de la República. Montevideo. Uruguay

IPGRI. 1999. Descriptors for Citrus. Internacional Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Mattos, J.R. 1986. A Goiabeira Serrana. Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renovaveis “AP”. Publicacao Nº 19. Porto Alegre. Brasil.

Nodari, R.O.; Guerra, M.P.; Meler, K.T. and Ducroquet, J.P. 1997. Genetic variability of *Feijoa sellowiana* germplasm. Proceedings of the International Symposium on Myrtaceae. *Acta Horticulturae* Nº 452:41-45

Schiffman, L. y Kanuk, L. 1991. Comportamiento del consumidor. Ed. Prentice Hall. México.

Tálice, R.; Castro, J. e Izaguirre, P. 1996. Prospección y evaluación de frutas autóctonas con énfasis en el guayabo del país y durazno. INIA-Proyecto FPTA 054. Informe final.

Thorp, G. and Bieleski, R. 2002. Feijoas: Origins, Cultivation and Uses. Ed. D. Bateman, Ltd., Auckland, New Zealand. 87 p.

Tocornal, G. 1988. La Feijoa. *En: Frutales no Tradicionales*. Santiago. Chile, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. pp.125-154. (Publicaciones Miscelaneas Agrícolas Nº 20)

Vernette, E. 2000. Techniques d'études de marché. Librairies Vuibert, Paris, Francia, 148 p.

Vignale, B. y Bisio, L. 2005. Selección de Frutales Nativos en Uruguay. *Revista Agrociencia (Uruguay)* 9: 35-39.

VALORACIÓN Y UTILIZACIÓN DE UN RECURSO GENÉTICO NATIVO: PROCESO DE DOMESTICACIÓN Y DESARROLLO DE LA MURTILLA (*Ugni molinae* Turcz.), UNA BAYA NATIVA DEL SUR DE CHILE.

Seguel, I.¹; Montenegro, A.¹; Torralbo, L.²; San Martín, J.¹; Aguilera, A.¹; Ellena, M.¹; Riveros, M.² y Scheuermann, E.³

1. RESUMEN

Sobre la base del uso potencial que presentaría la murtilla (*Ugni molinae* Turcz.), especie endémica del Sur de Chile, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ha realizado investigación tendiente a la domesticación y desarrollo productivo de la especie. Entre las actividades consideradas en este proceso se realizó una colecta de germoplasma, la regeneración de las entradas, la caracterización morfológica, agronómica, química y molecular de la colección, la determinación de los sistemas reproductivos, la evaluación y selección de materiales superiores con potencial productivo, el desarrollo de un paquete tecnológico para el cultivo de la especie y su desarrollo comercial. La investigación realizada ha permitido, a través de selecciones, obtener genotipos que por sus características de rendimiento y calidad de fruto, serían recomendados como variedades aptas para su cultivo, demostrando que es posible mediante domesticación y desarrollo de especies nativas o endémicas incorporar nuevos cultivos a los sistemas productivos del país.

Palabras claves: Domesticación, murtilla, *Ugni molinae* Turcz., especie nativa, Chile

2. INTRODUCCIÓN

En Chile existen alrededor de 6.265 especies vasculares, número limitado si se compara con otros países del Hemisferio Sur. Sin embargo, la flora chilena presenta características que hacen de ella un recurso muy atractivo. Entre los atributos que se le reconocen cabe destacar los siguientes: a) el alto grado de endemismos: de las 6.265 especies vasculares existentes en el país, el 80% es nativa y de éstas el 50% es endémica; b) la amplia variabilidad genética existente en las especies, producto de la adaptación que han desarrollado a diversas condiciones ambientales que caracterizan al país y c) el valor de uso actual y potencial del germoplasma chileno. El 13,5% de las especies fanerógamas nativas chilenas tiene registrado por lo menos un uso, como plantas alimenticias, ornamentales, edulcorantes, forrajeras, medicinales, tintóreas, productoras de fibra, insecticidas y/o fungicidas, entre otras (Cubillos, 1994).

Considerando lo anterior y situándose en el escenario actual, donde la agricultura chilena requiere introducir elementos de innovación, el endemismo de las especies chilenas constituye un elemento de valor estratégico, ya que el desarrollo de nuevos cultivos y generación de nuevos productos a partir de estas especies, permitirá que el país tenga la posibilidad de llegar a nuevos mercados con productos exóticos, altamente diversificados. Consecuentemente, se ha iniciado en Chile un proceso de valoración de especies nativas con potencial productivo. Un ejemplo de ello es el proceso de domesticación y desarrollo de la murta o murtilla (*Ugni molinae* Turcz.), especie silvestre que crece naturalmente en el sur de Chile, perteneciente a la familia de las *Myrtaceae*. La planta es un arbusto de aproximadamente 1,5m de altura, que ocasionalmente puede llegar hasta 2m. Produce frutos globosos, pequeños, de agradable sabor y aroma, los que son utilizados tradicionalmente para el consumo fresco y en la fabricación artesanal de mermeladas, jarabes, postres y licores (Novoa, 1983). En Chile, la población indígena, desde antes de la llegada de los españoles, utilizaba este fruto en su alimentación y en la elaboración de bebidas alcohólicas (Urban, 1934). En la cultura popular generalmente se le atribuyen propiedades curativas a hojas, tallos, frutos y raíces de la murtilla, así como propiedades astringentes y estimulantes. Investigaciones realizadas recientemente por Aguirre *et al.* (2005 a,b), señalan que las hojas de murtilla presentarían propiedades antiinflamatorias. Por su parte, Avello y Pastene (2005), demostraron que las hojas de la murtilla presentarían una alta capacidad antioxidante e incremento de la capacidad antioxidante plasmática asociada a la ingesta regular de infusiones de hojas de murtilla. Por otra parte, la planta de la murtilla también presenta características que le han permitido en Chile un uso ornamental (Urban,

² Universidad Austral de Chile. (UACH). Chile

³ Universidad de la Frontera. (UFRO) Chile.

1934) debido a la forma de sus ramas y flores. Con el mismo fin se utiliza en Australia, Nueva Zelanda y California (Landrum y Donoso, 1990).

La incorporación de la murtila a la fruticultura nacional ha significado el inicio de un programa sistemático de investigación, tendiente a solucionar las principales limitantes de producción y calidad del producto, permitiendo transformar este fruto silvestre en un fruto cultivado mediante un proceso de domesticación. En Chile, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ha desarrollado un programa de investigación a partir de 1996, tendiente a la domesticación y desarrollo de esta especie nativa con fines productivos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada para domesticar la murtila consistió en la colecta del germoplasma silvestre en Chile, la regeneración y multiplicación de los materiales, la determinación de su sistema reproductivo, la caracterización de la colección, la selección de materiales promisorios, la evaluación agronómica de los materiales seleccionados, el desarrollo de un paquete agronómico para el cultivo y la liberación de variedades que posibilite la producción comercial de este fruto nativo (Figura 1).

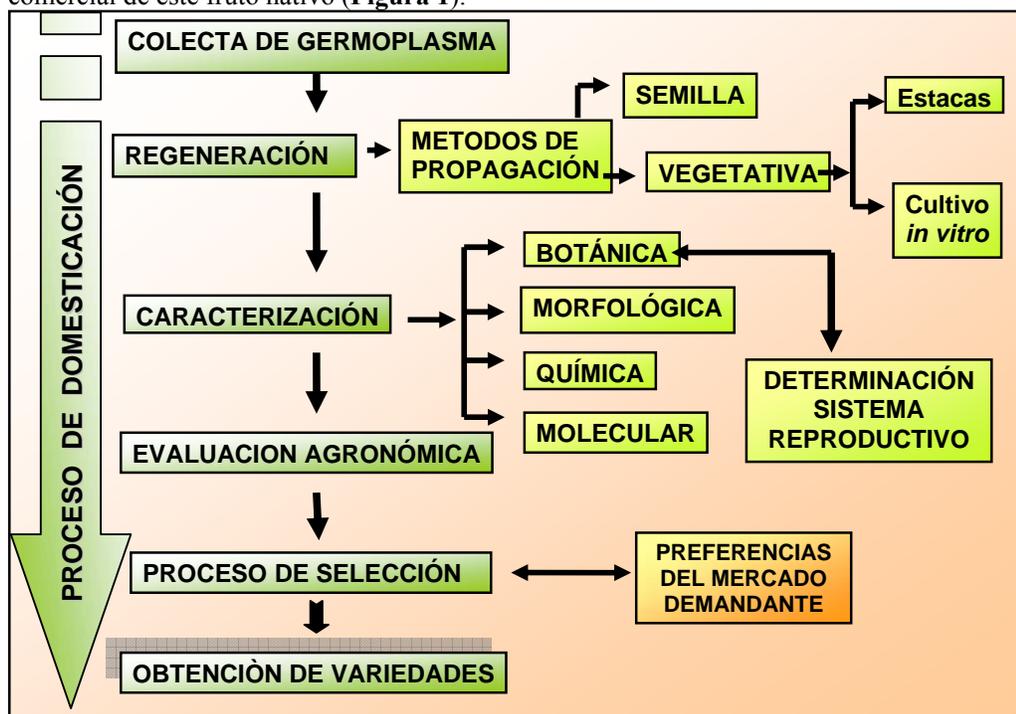


Figura 1: Proceso desarrollado en Chile para la domesticación de la murtila (*Ugni molinae* Turcz.)

3.1. Colecta y formación del banco de germoplasma de murtila en Chile

La selección de los sitios de colecta de la murtila se basó en antecedentes bibliográficos existentes sobre la distribución de la especie. La distancia entre los sitios dependió de la uniformidad de los ecosistemas, seleccionando aquellos con características disímiles en cuanto a ubicación geográfica y antecedentes edafoclimáticos. La colecta se realizó entre febrero y mayo de 1996, considerando la época de fructificación de la especie. El criterio utilizado para individualizar las entradas dentro de cada sitio se basó en características fenotípicas observables, tanto de la planta, como de los frutos, dirigiéndose la colecta hacia aquellos que presentaron mayor divergencia.

En cada sitio de colecta se tomaron muestras de frutos maduros, estacas para las etapas de regeneración y material de herbario para la determinación de las asociaciones botánicas. Paralelamente, se colectaron muestras de suelo (0-20cm de profundidad), para su posterior caracterización química. Los datos de pasaporte fueron: localización del sitio de colecta, fuente de recolección, tipo y frecuencia de la muestra, asociaciones botánicas, descripción de suelo, y observaciones de aspectos fenotípicos de la planta. Los datos de origen de las entradas fueron georeferenciados

mediante un GPS (Geographic Positional System) y digitalizados en mapas a través de un Sistema de Información Geográfica (SIG).

3.2. Regeneración, multiplicación y conservación del germoplasma colectado

3.2.1. Propagación de plantas mediante estacas semileñosas.

Con el objetivo de mantener la integridad genética de las entradas colectadas e incrementar el material disponible para el posterior establecimiento de los jardines de evaluación, se desarrollaron técnicas de regeneración y multiplicación del germoplasma colectado.

Se determinó la capacidad de enraizamiento de 95 entradas de murtila de la colección (Torres *et al.*, 1998). Se evaluaron dos reguladores de crecimiento, ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (IBA), ambos en dos concentraciones (1000 y 2500ppm), además de un enraizante comercial, todos aplicados a estacas semileñosas de aproximadamente 9cm de longitud. Cada entrada estuvo representada por 200 estacas. Los distintos tratamientos fueron evaluados con respecto a un testigo sin aplicación de enraizantes. Las estacas fueron establecidas en camas de propagación en invernadero utilizando como sustrato una mezcla de suelo y arena, en una proporción de 1:1. El enraizamiento se evaluó a través del porcentaje de estacas enraizadas.

3.2.2. Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de la murtila.

El objetivo fue desarrollar una metodología alternativa de propagación y conservación de germoplasma. (Letzkus, 1999). La investigación se dividió en cuatro etapas:

1. Identificación de un medio nutritivo para la micropropagación de plantas de murtila: Se evaluaron ocho medios nutritivos en dos etapas: Etapa I. Se evaluó el medio BTM (Broadleaved tree medium), el medio LP₁ (basado en Quoirin y Lepoivre, 1977) y el medio Anderson (Anderson, 1975). Como fuente de explantos se utilizaron yemas axilares y apicales provenientes de plantas madres de un genotipo de murtila de tres años de edad, mantenido en invernadero. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, ordenado como factorial 3x2 correspondiente a 3 medios nutritivos y 2 tipos de explantes (yemas axilares y apicales) con 95 repeticiones. El porcentaje de sobrevivencia y el número de brotes fueron analizados estadísticamente con un ANDEVA de Fischer. Para la separación de promedios se utilizó el test de comparaciones múltiples de Tukey.

Etapa II. Las yemas axilares fueron establecidas en 6 medios nutritivos, en donde uno de ellos correspondió al mejor tratamiento de la etapa anterior (yema axilar en medio BTM, el cual fue utilizado como control). Se evaluaron los medios WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd y McCown, 1981), FOSSARD (Fossard, 1974), ER (Economou y Read, 1984), el MS (Murashige y Skoog, 1962) y el medio MS/2 (medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad de su concentración). El porcentaje de sobrevivencia y el número de brotes fueron analizados estadísticamente mediante un ANDEVA de Fischer. Para la separación de promedios se utilizó un test de comparaciones múltiples de Tukey.

2. Evaluación del efecto de reguladores de crecimiento sobre el crecimiento en altura de los explantos. En una primera etapa se evaluó el efecto del ácido giberélico (GA₃), aplicado a tres medios nutritivos (BTM, LP₁ y ANDERSON) y tres dosis de GA₃ (mg L⁻¹). Para el análisis de los resultados se utilizó un diseño experimental completamente al azar, ordenado como factorial 3x3 correspondiente a la combinación de 3 medios nutritivos y 3 concentraciones de GA₃, con un número constante de 12 repeticiones por tratamiento. En la segunda etapa los explantos fueron establecidos en 5 medios nutritivos, más un medio control (mejor medio de la etapa anterior <BTM>), aplicándoseles a cada uno tres dosis de GA₃. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento.

3. Control de la oxidación de los explantos. Se evaluó el efecto de ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido salicílico y polivinilpirrolidona (PVP), cada uno aplicado en concentraciones 1,0, 1,5 y 10mgL⁻¹, incorporados al medio MS utilizado como base. Para el análisis de los resultados se utilizó un diseño completamente al azar, ordenado como factorial 4x3x2, producto de 4 agentes antioxidantes, 3 concentraciones y 2 formas de incubación (luz y oscuridad), con un número constante de 20 repeticiones por tratamiento. Una vez finalizada esta evaluación se seleccionó el mejor tratamiento y se aumentó a éste la concentración del antioxidante, aplicándose 10 y 50 mgL⁻¹. Los explantos permanecieron en oscuridad durante 15 días y posteriormente fueron transferidos a condición de luz. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un número constante de 50 repeticiones por tratamiento.

4. Evaluación del efecto de la luz y de la oscuridad en el proceso de oxidación de los explantos. Se establecieron explantos, yemas axilares en el medio BTM, durante 15 días en condición de oscuridad; cumplido este periodo, los explantos fueron trasladados a condición de luz para continuar su desarrollo. El tratamiento control consistió en mantener desde el establecimiento los explantos en condición de luz solamente. Los resultados fueron evaluados en base al porcentaje de sobrevivencia y el número de brotes. Se utilizó una ANDEVA de Fischer.

En todos los ensayos se consideró la evaluación visual de los explantos. Ésta se realizó mediante una escala de apariencia: 1. explanto sano verde y sin daño, 2. explanto verde, con principio de daño, 3. explanto dañado entre un 25% y 50%, 4. explanto dañado sobre un 50%. Los resultados de la apariencia visual fueron analizados mediante métodos no paramétricos, análisis de varianza de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn.

3.3. Caracterización de la colección de murtila

La caracterización de la colección se realizó en dos etapas. En la primera de ellas, se consideró la evaluación de los frutos obtenidos en la colecta y en la segunda, se efectuó la caracterización de las entradas establecidas en un “jardín de caracterización” en INIA Carillanca.

3.3.1. Caracterización de los frutos colectados

Los descriptores utilizados fueron: color de la pulpa y del epicarpio, peso unitario del fruto, número de semillas por fruto, diámetro polar y ecuatorial, contenido de sólidos solubles, pH y acidez titulable. El color de los frutos se determinó utilizando el atlas de colores de Koppers (1996), en tanto que los sólidos solubles se obtuvieron mediante refractometría (expresado en °Brix) y la acidez titulable mediante meq NaOH/100g. Estos parámetros fueron evaluados en todos los ecotipos colectados considerando 20 frutos por entrada.

3.3.2. Caracterización morfoagronómica

A partir de las plantas propagadas en forma vegetativa, se estableció un jardín para la caracterización de la colección, ubicado en el INIA Carillanca, (38°41' Lat. S y 72°25' Long. O, 200msnm), Región de la Araucanía, durante la temporada agrícola 1997-1998. Se caracterizaron 90 de las 100 entradas colectadas. Cada entrada quedó representada por 24 plantas, las cuales fueron distribuidas en un diseño en bloques completo al azar con tres repeticiones, en una superficie de 6.300 m². Al no disponer de descriptores para la especie, se seleccionaron 16 en base a descriptores propuestos por el IPGRI para otras especies frutales con características similares (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Descriptores utilizados para la caracterización del banco de germoplasma de murtila (*Ugni molina Turcz*)

CÓDIGO	DESCRIPTOR	UNIDAD DE MEDIDA
AP	Altura de la planta	cm.
DTP	Diámetro del tallo principal	mm.
LTP	Largo del tallo principal	Cm
NEN	Número de entrenudos	Nº
LH	Largo de la hoja	mm.
AH	Ancho de la hoja	Mm
INIF	Inicio de floración	Días
MAXF	Máxima floración	días
TERF	Término de floración	Días
FC	Porcentaje de flores cuajadas	%
LPF	Largo del pedúnculo floral	Mm
DPF	Diámetro polar del fruto	cm.
DEF	Diámetro ecuatorial del fruto	cm.
NSF	Número semillas por fruto	Nº
SS	Sólidos solubles fruto	°Brix
RFP	Rendimiento frutos por planta	g/planta

Los resultados de la caracterización se analizaron mediante análisis multivariado. Para ello, la colección inicial se dividió en dos grupos de acuerdo al color del epicarpio. El Grupo R fue conformado por plantas cuyos frutos presentaron epicarpio color rojo uniforme y el Grupo B por plantas con frutos variegados. Para los análisis de

componentes principales (ACP) los algoritmos del cálculo se realizaron a partir de una matriz de correlación simple R; a partir de esta matriz se calcularon los valores propios y vectores propios para obtener la proporción de la variación original explicada por cada componente principal de la matriz de correlación (Vivanco, 1999). Para agrupar los casos se utilizó un análisis de conglomerado según Dillon y Goldstein (1984).

3.3.3. Caracterización de propiedades antioxidantes de la murtila.

El objetivo de esta actividad fue cuantificar los polifenoles, determinar la actividad antioxidante e identificar compuestos fenólicos presentes en frutos y hojas de murtila. La cuantificación de polifenoles en frutos, se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, *et al.*, 1965) y la determinación de actividad antioxidante se efectuó mediante el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Von Gadow *et al.*, 1997). Estas dos metodologías son ampliamente utilizadas para alimentos y permiten establecer comparaciones con base en la Concentración Efectiva (EC₅₀). En el caso de las hojas, para cuantificar los polifenoles presentes en extractos se utilizó la metodología de Folin-Ciocalteu. Para determinar la capacidad antioxidante se usó el método del DPPH y para la identificación de los compuestos fenólicos se analizó con HPLC-MS, Cromatografía Líquida de Alto Desempeño asociada a Espectrometría de Masa (Rubilar *et al.*, 2006).

3.3.4. Caracterización molecular.

Se utilizó la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Seguel *et al.*, 2000). El análisis molecular se realizó en 45 entradas de murtila representativas de todos los sitios de colecta. En total se evaluaron treinta y tres partidores seleccionados al azar; de éstos, se seleccionaron siete para los estudios posteriores, sobre la base de la generación de productos amplificados reproducibles. El ADN se extrajo de hojas en crecimiento según procedimiento de Doyle y Doyle (1987), con algunas modificaciones. La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó en un volumen de 16ml. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa. La posición de las bandas se transformó en una matriz de caracteres binarios (1 presencia, 0 ausencia). Los datos fueron analizados mediante análisis multivariado. El grado de heterogeneidad entre entradas se determinó a través de los coeficientes de Jaccard (1901) y de Nei y Li (1979).

3.4. Determinación del sistema reproductivo de la especie.

Para determinar el sistema reproductivo e identificar mecanismos de autoincompatibilidad genética en la especie, se evaluaron cinco tratamientos, cuatro de ellos, de polinización manual y un recuento de polinización natural, según metodología de Ruiz y Arroyo (1978), Sobrevilla y Arroyo (1982). Los resultados fueron evaluados por la formación de frutos y semillas.

Los tratamientos fueron: 1. Autopolinización sin vector (A), para ello se marcaron las ramas con yemas florales y se aislaron hasta la senescencia y/o caída de la flor, 2. Apomixis (APO), las yemas florales se emascularon y se aislaron hasta la senescencia floral, 3. Autopolinización con vector (S), las yemas florales se mantuvieron aisladas hasta la floración y luego se autopolinizaron y se volvieron a aislar, 4. Polinización cruzada (C), las yemas florales emasculadas se mantuvieron aisladas hasta la receptibilidad del estigma y luego se polinizaron con polen proveniente de otro individuo, aislándose nuevamente las flores hasta la senescencia y 5. Polinización natural (N), se identificaron flores al estado de yema y se mantuvieron expuestas en condición natural de polinización, sin intervención, hasta la madurez de los frutos. Los tratamientos se evaluaron en base a la formación de frutos y semillas. Para la interpretación de los resultados se utilizó el índice de autoincompatibilidad (IAI) que permite definir el sistema reproductivo de la especie y se obtiene a través del promedio de semillas obtenidas por autopolinización con vector (S) dividido por el promedio de semillas obtenidas por polinización cruzada manual (C). Para este índice, valores menores a 0,199 son atribuidos a un sistema de autoincompatibilidad y valores superiores a 0,199 a un sistema de autocompatibilidad, según Ruiz y Arroyo (1978), Sobrevilla y Arroyo (1982).

3.5. Evaluación Agronómica

Manejo agronómico preliminar. Para domesticar la especie se consideró necesario estudiar la densidad de plantación, el efecto de la fertilidad de suelos, el uso de cubiertas inertes para control de malezas y la identificación de plagas y enfermedades del cultivo, entre otros.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Colecta y conformación del banco de germoplasma de murtilla

La colecta de germoplasma de murtilla se realizó en el año 1996, en las zonas comprendidas entre los paralelos 35 al 42° Lat.S. (Región del Maule a la Región de los Lagos, Chile). Se colectaron 100 entradas en 36 sitios prospectados entre la Cordillera de la Costa y la precordillera Andina de esta zona. Esta colección es mantenida en INIA Carillanca y constituye la base para la investigación desarrollada en la especie.

De los antecedentes obtenidos de la colecta de murtilla se concluyó que:

1. Del total de entradas colectadas, un 93% corresponde efectivamente a *Ugni molinae* (Turcz.) y un 7.0% a *Ugni candolleii* (Barm.). En Chile el género *Ugni* está representado por tres especies, dos en Chile continental, *Ugni molinae* (Turcz) y *Ugni candollei* (Berg.) y una especie endémica del archipiélago de Juan Fernández, *Ugni selkirkii* (H.et A.) Berg. Botánicamente *U. molinae* y *U. candollei* son especies con características morfológicas muy similares. *U. candolleii*, a diferencia de *U. molinae* presenta brotes nuevos, tallos y pecíolo ferugíneo, pubescente. Siendo ésta una característica muy sutil que muchas veces dificulta su identificación.
2. La distribución latitudinal de la especie observada en la colecta de germoplasma, indica que la murtilla se desarrolla en diversas condiciones climáticas. Longitudinalmente, la mayor frecuencia de la especie se determinó desde la depresión intermedia hacia la Cordillera de la Costa (72° a 74° Long. O). En un gradiente altitudinal, las entradas se coleccionaron entre 10 y 250 msnm. (Seguel *et al.*, 2000) (**Figura 2**).



Figura 2. Sitios de colecta del germoplasma de murtila (*Ugni molinae* Turcz.) en las regiones Del Maule, de La Araucanía y de Los Lagos. Chile

3. En su hábitat natural la especie se encontró preferentemente en terrenos no cultivados, a orillas de caminos, en bosques naturales o en manchones (“murtales”), alejados de centros urbanos y por lo tanto de baja presión antrópica.

4. En base al estudio de las asociaciones botánicas, se determinó que *U. molinae* crece naturalmente asociada a otras especies nativas que se desarrollan en el sur del país. En la mayoría de los casos, en sectores costeros caracterizados por una alta humedad relativa, suelos húmedos, cercanos a riberas de ríos y lagos, y conformando los bosques del Centro Sur de Chile.

5. El análisis del suelo de los sitios de colecta de la especie indica que éstos son de baja fertilidad en general (Seguel *et al.*, 2000). Ello queda demostrado, entre otras características, por los bajos niveles de nitrógeno, fósforo, potasio (principales macro elementos) y por los altos niveles de saturación de aluminio (**Cuadro 2**). Bajo estas condiciones, la especie se desarrolla formando plantas arbustivas de altura variable, entre 0,5 y 1,70m. Excepcionalmente puede alcanzar una altura superior a 2m, lo que se demostró al coleccionar entradas en la Isla de Chiloé. Es interesante destacar que esta especie es capaz de desarrollarse y producir frutos en suelos de mala calidad, hecho que podría estar indicando la presencia de mecanismos de adaptación que proporcionarían a la planta una alta eficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes del suelo bajo condiciones desfavorables.

Cuadro 2. Análisis de los parámetros químicos evaluados en los suelos de los sitios de colecta de germoplasma de murtila.

Parámetro químico	Unidad de medida (*)	Rango observado mínimo /máximo		Clasificación	Observación
Fósforo Olsen	Ppm	1	7	Muy bajo a muy alto	Del total de suelos analizados, el 97% de ellos presentaron niveles de P disponible menores a 5 ppm, considerados como muy bajos
Nitrógeno inorgánico disponible	Ppm	1	16	Muy bajo a bajo	El 76% de los suelos analizados presentaron valores de N disponibles menores a 9ppm, considerados como muy bajos
Potasio intercambiable	meq/100g	0,11	1,22	Muy bajo a muy alto	El 62% de los suelos analizados presentaron valores de K intercambiable menor a 0.26meq/100g, considerado muy bajo a bajo
Calcio intercambiable	meq/100g	0,22	12,53	Muy bajo a muy alto	El 97% de los suelos analizados presentaron niveles de Ca intercambiable menores a 0,6meq/10 g considerados como muy bajos a bajos.
Magnesio intercambiable	meq/100g	0,16	5,57		El 47% de los suelos presentaron contenidos de Mg intercambiable menores a 0,60meq/100g considerados muy bajos a bajos. Por otra parte, un 38% de éstos presentaron niveles altos a muy altos de este elemento.
Sodio intercambiable	meq/100g	0,08	1,41	Muy bajo a alto	El 88% de los suelos presentaron valores de Na intercambiable menores a 0,50 meq/100g considerados muy bajos a bajo.
Aluminio intercambiable	meq/100g	0,01	7,15		
Suma de bases	meq/100g	0,72	18,73	Muy bajo a muy alto	El 77,% de los suelos presentaron una suma de bases inferior a 5,0meq/100g considerada muy baja a baja.
CIC efectiva	meq/100g	1,27	18,99		
Saturación aluminio	%	0,2	75,3		El 59% de los suelos presentaron una alta saturación de aluminio, con valores superiores a 10%.
Materia orgánica	%	3	21		El 50 % de los suelos presentaron valores considerados muy bajos a bajos en materia orgánica y el 50% restante se ubicaron en rangos medios a muy altos.
Cobre disponible	Ppm	0,04	2,88		
Hierro disponible	Ppm	6,2	208,3		
Magnesio disponible	Ppm	0,3	29,8		
Zinc disponible	Ppm	0,04	3,12		
pH (agua)		5,1	6,2		El 86 % de los suelos fueron clasificados en niveles medio a altos.

(*) La unidad de medida meq/100gr, actualmente se expresa en cmol^+/Kg .

En general, la adaptación natural de la murtilla a suelos de baja fertilidad, junto a su habilidad para competir con otras plantas, indicaría que podría constituirse en una alternativa interesante, no sólo para suelos degradados, sino también como una opción a utilizar en suelos destinados a la actividad frutícola del sur de Chile.

4.2. Regeneración, multiplicación y conservación del germoplasma colectado.

El porcentaje de enraizamiento promedio de las estacas de murtilla tratadas con distintos reguladores de crecimiento fue de 93,6%, valor considerado alto, independientemente del regulador y de la concentración utilizada. Un porcentaje de enraizamiento levemente superior (95%), se obtuvo con el ácido indolbutírico (IBA) en una concentración de 2500 ppm (**Cuadro 3**). Sin embargo y dado los buenos resultados obtenidos con el uso de enraizante comercial (92,7%), se optó por éste para la producción de plantas, básicamente por un tema de costo y eficiencia del producto. El enraizante comercial utilizado tiene entre sus ingredientes, ácido naftalenacético y un fungicida. Actualmente esta técnica es utilizada en forma operativa para la producción de plantas de murtilla en Chile (www.murtillachile.cl).

Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia de estacas de murtilla sometidas a diferentes tratamientos de enraizamiento y propagación.

	ANA 1000 (ppm)	ANA 2500 (ppm)	IBA 1000 (ppm)	IBA 2500 (ppm)	ENRAIZANTE COMERCIAL	TESTIGO
Promedio	92,8	95,0	94,3	93,4	92,7	88,3
Máximo	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Mínimo	0,0	75,0	64,3	25,0	42,9	38,5

4.3. Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de la murtilla.

El protocolo para el cultivo in vitro de murtilla fue desarrollado en INIA Carillanca, permitiendo concluir que:

1. Los resultados del establecimiento de explantos, etapa I y II demostraron que los medios nutritivos BTM (Broadleaved Tree Médium) y FOSSARD, fueron estadísticamente superiores para el establecimiento *in vitro* de los explantos, respecto a los medios LP1, ANDERSON, WPM, ER, MS, MS1/2. En los **cuadros 4 y 5** se presentan tres de los medios nutritivos evaluados que permitieron un mejor establecimiento *in vitro* de los explantos.

Cuadro 4. Efecto de tres medios de cultivo y del tipo de yemas de murtilla (*Ugni molinae*) sobre el porcentaje de supervivencia y número de brotes por explanto a los 45 días de establecido el cultivo *in vitro*. Etapa I

MEDIO NUTRITIVO	EXPLANTO	SOBREVIVENCIA (%)	NUMERO DE BROTES POR EXPLANTO
BTM	yema axilar	67,4 a	1,70 a
	yema apical	31,5 c	0,69 b
LP1	yema axilar	51,6 b	0,76 b
	yema apical	25,6 c	0,65 b
ANDERSON	yema axilar	33,7 c	0,27 b
	yema apical	22,2 c	0,01 b

Letras distintas indican diferencias significativas según test de Tukey.

Cuadro 5. Efecto de seis medios de cultivo sobre el porcentaje de supervivencia y número de brotes por explanto a los 45 días de establecido el cultivo *in vitro*. Etapa II.

MEDIO NUTRITIVO	SOBREVIVENCIA (%)	NUMERO DE BROTES POR EXPLANTO
BTM	60,7 a	1.31 a
FOSSARD	55,9 a	1.35 a
WPM	44,7 b	0.63 b
ER	47,7 b	0.63 b
MS	47,1b	0.62 b
MS/2	30,8 b	0.84 b

Letras distintas indican diferencias significativas según test de Tukey.

2. Los explantos presentan una alta tendencia a manifestar oxidación, que es posible evidenciar durante los primeros días de cultivo *in vitro*. La oxidación disminuye significativamente adicionando a los medios nutritivos PVP en dosis de 50mg/L en oscuridad, por un periodo de 15 días. Los resultados de la etapa I de este experimento indican que el PVP en dosis de 10mgL⁻¹ es el compuesto más eficiente para reducir la oxidación (20% de oxidación). De la etapa II, se concluye que al aumentar la dosis a 50mgL⁻¹, el efecto del PVP es superior (18%), sin embargo, no es significativamente distinto al de la dosis de 10mgL⁻¹ (22% de oxidación).

3. El explanto más adecuado para el establecimiento *in vitro* de la especie, son las yemas axilares; éstas presentan mayores aptitudes para el cultivo *in vitro* versus las yemas apicales.

4. Para la elongación de los brotes, el mayor incremento en altura se logró utilizando el medio nutritivo FOSSARD suplementado con 1mg/L de GA3 (ácido giberélico).

4.4. Caracterización de la colección de murtila

4.4.1. Caracterización de los frutos colectados.

El análisis de los frutos colectados determinó una alta variabilidad de las características estudiadas tales como: diámetro polar, diámetro ecuatorial, peso unitario, color del epicarpio y pulpa, número de semillas por fruto, contenido de sólidos solubles, contenidos de sacarosa y fructosa, pH, acidez titulable y ácido ascórbico.

En general en los frutales conocidos como “berries”, se busca obtener frutos de tamaño adecuado para su comercialización. En relación al diámetro ecuatorial del fruto, los resultados indican que el diámetro promedio, en las 100 entradas colectadas, fue de 0,9cm. El valor máximo obtenido se obtuvo con una entrada proveniente de la Región de Los Lagos, con un promedio de fruto de 1,3cm (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Diámetro ecuatorial, peso unitario del fruto y número de semillas por fruto de las entradas de murtila colectadas en Chile, entre la Región Del Maule y La Región de Los Lagos.

	Diámetro del fruto (cm) n=100	Peso fruto (g) N=100	Nº semillas por fruto n=100
Promedio	0,9	0,4	15,7
Valor máximo	1,3	1,0	35,2
Valor mínimo	0,7	0,2	4,1
DS	0,1	0,1	7,6

Este mayor tamaño del fruto podría atribuirse a una característica genética o bien a las condiciones climáticas de esa zona (alta pluviometría y libre de heladas gran parte del período de invierno). En general, los resultados indicarían que los frutos de mayor diámetro, provienen del sur del país, particularmente de Valdivia y Chiloé. En la **Figura 3A** se puede observar la distribución de frecuencia del diámetro ecuatorial del fruto de murtila. Un 64% de la población evaluada se concentró en el rango de 0,9-1,1cm y un 35% de ella presentó un diámetro de fruto en el rango de 0,7-0,8cm. Estos últimos provienen en su gran mayoría de la zona norte prospectada (Región del Maule). En relación al peso del fruto, la tendencia observada fue la misma que para el diámetro. Como es de esperar, los frutos de mayor peso también están relacionados con el mayor diámetro. Los resultados estarían indicando que el peso promedio de los frutos de murtila colectado fue de 0,4g siendo también la entrada de mayor diámetro, la que alcanzó el mayor peso unitario (1,0g) (**Cuadro 6**).

En la **Figura 3B** se observa la distribución de frecuencias por peso unitario del fruto, donde el 75% de las entradas se ubicaron en el rango de 0,3 a 0,6g. También se puede observar que el 1% de la población evaluada presentó un peso que fluctuó entre 0,9 y 1,0g.

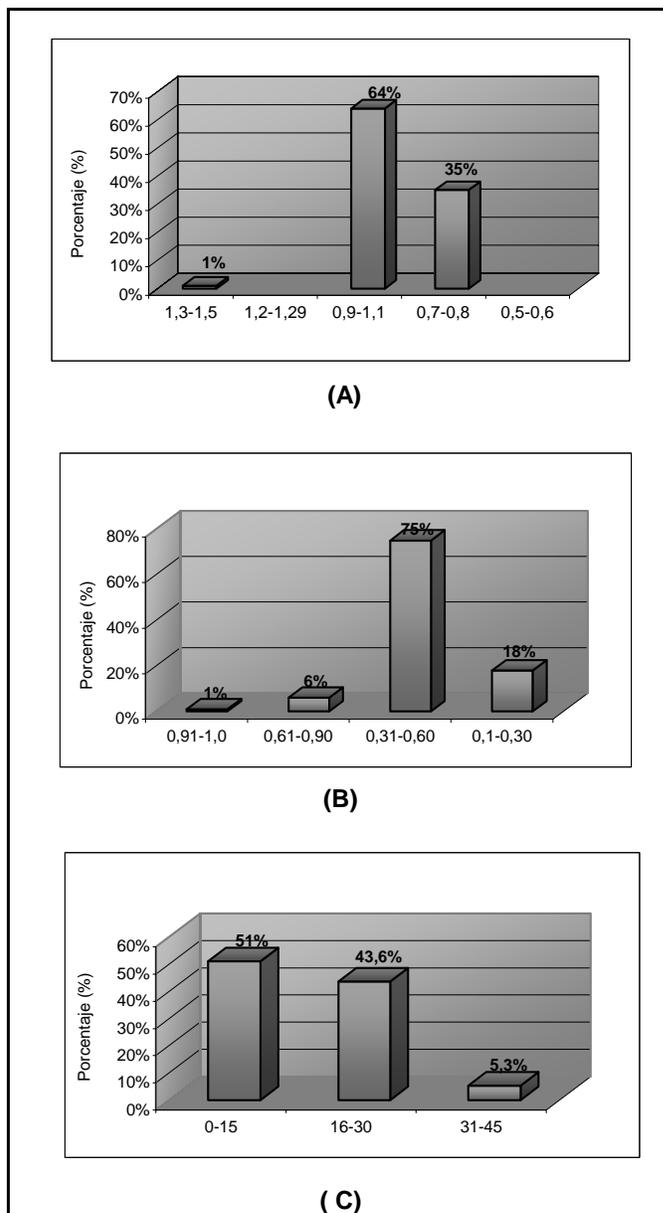


Figura 3. Gráfico de frecuencia. (A) diámetro ecuatorial del fruto (cm) (B) peso unitario del fruto (g) y (C) número de semillas por fruto

La murtila es una especie caracterizada por presentar un alto número de semillas por fruto, con un diámetro de semilla que fluctúa entre 1,5-2mm. En los materiales colectados el número promedio de semillas fue 15,7 (**Cuadro 6**). En el gráfico de frecuencias (**Figura 3C**) se observa que un 51% de la población evaluada se concentró en el rango de 0-15 semillas por fruto. Sin embargo, es posible identificar entradas que contienen hasta 35 semillas por fruto (5% de la población). Esta característica pudiera no ser deseable desde el punto de vista del consumo fresco de fruta. Sin embargo estudios realizados por Pesa y Caprile (1993), indican que la semilla de la murtila podría ser considerada una buena fuente de aceite comestible ya que presenta un alto grado de insaturación, un importante contenido de ácido linoleico y ausencia de ácido linolénico, lo que estaría indicando su potencial.

En relación a los análisis químicos de los frutos colectados, se observó que los contenidos de sólidos solubles varían en las diferentes entradas entre 6,5 y 23,0°Brix (**Cuadro 7**). En un gradiente latitudinal esta característica favorece a los frutos colectados en la zona norte del área prospectada, siendo los frutos de la Región de los Lagos, en la mayoría de los casos, aquellos con menores contenidos de sólidos solubles en los frutos debido, posiblemente, a una menor disponibilidad de energía radiante. Por otro lado, en el interior de la copa, en la zona en donde no

llegan directamente los rayos solares, la energía disponible presenta características espectrales diferentes de las que se encuentran en el exterior de la misma, lo cual debería evaluarse a futuro en investigaciones específicas. También es importante destacar que la calidad de la energía radiante disponible influye en el equilibrio hormonal y en la naturaleza y cantidad de los compuestos de síntesis.

Cuadro 7. Contenidos de sólidos solubles, pH, y acidez titulable de los frutos de murtilla entre la Región Del Maule y La Región de Los Lagos.

	Sólidos solubles (°Brix) n=99	pH n=92	Acidez titulable (meq NaOH/100g) n=100
Promedio	16,4	4,1	9,3
Valor máximo	23,0	5,9	32,9
Valor mínimo	6,5	3,2	2,0
DS	4,2	0,5	5,7

En el **cuadro 7** se observa que el pH de los frutos de murtilla fluctúa entre 3.2 y 5.9.

Los datos indican que la acidez titulable en los frutos colectados varió de 2,0 a 32,9 meq NaOH/100g de fruto fresco, siendo el valor promedio 9,3 meq NaOH/100g de fruto fresco para este parámetro (**Cuadro 7**). La acidez es un índice asociado a la madurez de los frutos y debe evaluarse en función de la relación entre contenidos de sólidos solubles y ácidos orgánicos totales. En el gráfico de frecuencia (**Figura 4B**) se observa que la mayoría de las entradas, un 52.2%, está en el rango de 4,1-5 y un 45% de ella en el rango de 3-4.

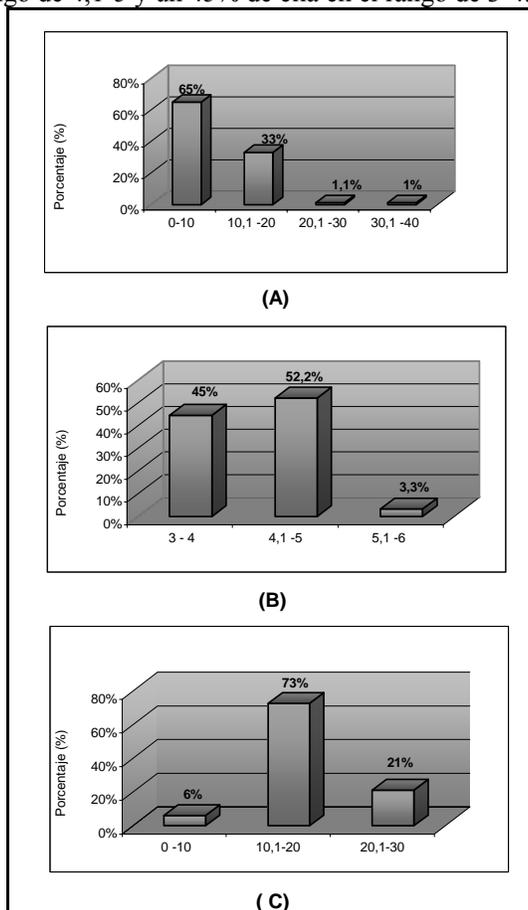


Figura 4. Gráfico de frecuencia. (A) acidez titulable (meq NaOH/100g) del fruto (B) pH del fruto y (C) contenidos sólidos solubles.

En cuanto al color de los frutos en un gradiente latitudinal, de norte a sur, se determinó que en la Región del Maule (zona norte prospectada), predominan los tonos rosado amarillentos, en la Región de la Araucanía, los frutos

variegados y rojos y en la Región de los Lagos (zona sur prospectada) destacan los frutos de color rojo intenso “tapado” (Seguel *et al.*, 1999). Esto último podría ser atribuido al diferencial térmico entre el día y la noche que intensifica el color (mayor producción de antocianos). Los antecedentes en relación a los materiales colectados indican que existe una alta variabilidad genética en la especie producto de la adaptación que han ido desarrollando los ecotipos en su hábitat natural. Esto permitiría suponer la factibilidad real de iniciar un programa de mejoramiento genético, que permita aprovechar la variabilidad genética disponible.

4.4.2. Caracterización morfoagronómica de las entradas disponibles.

En el Cuadro 8 se presentan los resultados de la caracterización morfoagronómica de las entradas que conforman la colección de murtilla evaluada en la temporada 1997-1998, en INIA Carillanca.

Al comparar algunos de los caracteres evaluados en los materiales colectados (Cuadro 6), versus las evaluaciones provenientes del jardín de caracterización (Cuadro 8), se observa que para el diámetro ecuatorial del fruto, los materiales colectados, en promedio, presentaron 0,9cm, valor que coincide con el promedio obtenido para este parámetro en la caracterización de los materiales realizada en INIA Carillanca. Lo anterior estaría indicando que, en general, el diámetro ecuatorial del fruto de murtilla no estaría relacionado con el sitio de origen de las entradas, sino más bien, con un componente genético o la interacción de ambos factores.

Por otra parte, se observaron diferencias en el promedio de semillas por fruto. Los resultados de la evaluación de este parámetro en los materiales colectados indicaron que éstos contienen en promedio 15,7 semillas (Cuadro 6), en cambio, en la caracterización de los materiales el número promedio de semillas fue mayor (19,8 semillas) (Cuadro 8).

En cuanto a los contenidos de sólidos solubles las caracterización de las entradas determinaron un promedio superior a lo obtenido de los frutos colectados (18,4 y 16,4°Brix, respectivamente).

Cuadro 8. Valores promedios obtenidos de la caracterización morfoagronómica de la colección de murtilla establecida en INIA Carillanca, Región de la Araucanía. Evaluación primera temporada. 1997-1998.

CÓDIGO	DESCRIPTOR	UNIDAD DE MEDIDA	PROMEDIO GRUPO R	PROMEDIO GRUPO B	PROMEDIO COLECCIÓN
Descriptores de planta					
AP	Altura de la planta	cm	40,6	41,8	41,2
DTP	Diámetro del tallo principal	mm	5,9	5,9	5,9
LTP	Largo del tallo principal	cm	46,4	47,3	46,9
NEN	Número de entrenudos	Nº	18,8	18,9	18,9
LH	Largo de la hoja	mm	18,1	17,7	17,9
AH	Ancho de la hoja	mm	9,3	9,5	9,4
Descriptores fenológicos					
INIF	Inicio de floración	Días	100,4	100,5	100,6
MAXF	Máxima floración	Días	153,2	153,2	153,2
TERF	Término de floración	Días	164,3	164,3	164,3
Descriptores flor					
FC	Porcentaje de flores cuajadas	%	42,5	43,1	42,8
LPF	Largo del pedúnculo floral	Mm	13,4	13,3	13,4
Descriptores fruto					
DPF	Diámetro polar del fruto	cm	0,8	0,8	0,8
DEF	Diámetro ecuatorial del fruto	cm	0,9	0,9	0,9
NSF	Número semillas por fruto	Nº	19,6	20,0	19,8
SS	Sólidos solubles fruto	°Brix	18,3	18,4	18,4
Evaluación rendimiento					
RFP	Rendimiento frutos por planta	g/planta	10,6	11,4	11

Los resultados del Análisis de Componente Principal (ACP) (Rodríguez, 2000) indican que la relación del rendimiento con las variables morfológicas y fenológicas fue distinta según el grupo de murtillas estudiado. En el Grupo R (entradas con fruto rojo), el rendimiento no se correlacionó con las características morfológicas, pero sí tuvo una relación inversa respecto a las fenológicas, es decir las entradas más tardías presentarían un menor rendimiento de frutos. En el Grupo B (entradas con frutos variegados), las entradas de mayor rendimiento se relacionaron con plantas de mayor altura y con hojas más grandes, no observándose relación con las características fenológicas.

De los resultados de la caracterización de la colección de murtilla, también se concluye que las entradas procedentes de la Región del Maule tuvieron un rendimiento más bajo que las provenientes de la Región de la Araucanía y de la Región de los Lagos. Estos resultados de alguna forma también coincidirían con las evaluaciones realizadas en los materiales colectados. Por ejemplo si se analiza el diámetro ecuatorial del fruto y su peso unitario, se observa que los frutos de mayor diámetro y peso unitario provienen de la zona sur prospectada. Esta información es valiosa si se quiere incrementar la variabilidad genética disponible para estos caracteres.

Los resultados de la caracterización de las entradas permitieron agrupar los materiales colectados en base a sus características y con ellos fue posible seleccionar genotipos superiores en cuanto a rendimiento y calidad de los frutos. Las entradas seleccionadas como superiores dentro del banco de germoplasma son aquellas que se consideraron para la etapa de evaluación agronómica.

4.4.3. Caracterización de las propiedades antioxidantes de la murtilla

Los resultados obtenidos en investigaciones realizadas en frutos de murtilla por Peña (2005) y Gaete (2005) han permitido concluir que:

1. Al igual que en otros frutales, las propiedades antioxidantes de los frutos de la murtilla estarían relacionados con el ecotipo y la localidad geográfica de la cual provienen.
2. Los extractos etanólicos de los frutos de murtilla presentan mayor actividad antioxidante comparados con la obtenida en los extractos acuosos.
3. Los frutos de murtilla presentarían una interesante actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos relativos a las propiedades antioxidantes de las hojas de la murtilla según Espinoza (2004) Gajardo (2005), Cárcamo (2005) y Rubilar *et al.* (2006), han permitido concluir que:

1. Existe actividad antioxidante en extractos acuosos, etanólicos y metanólicos y que ésta depende del ecotipo y del solvente utilizado en la extracción.
2. Existen diferencias en los componentes polifenólicos que son extraídos de las hojas por los distintos solventes, lo cual explicaría en parte las distintas respuestas en actividad antioxidante que se evidencia para un mismo ecotipo.

4.4.4. Caracterización molecular.

Los resultados de la caracterización molecular demostraron una alta heterogeneidad entre las entradas colectadas. Los coeficientes de similitud fluctúan entre 0,1-0,833 y entre 0,182-0,909 para Jaccard y Nei y Li respectivamente. Entre los partidores evaluados sólo dos fueron suficientes para discriminar 40 de las 45 entradas analizadas. De los resultados de la caracterización molecular se desprende que existe ausencia de homologías, observadas incluso entre entradas colectadas en un mismo sitio geográfico.

La heterogeneidad entre entradas puede ser atribuible a que la especie es de polinización cruzada (Wilckens *et al.*, 1991 I.) lo cual fue confirmado por Seguel *et al.* (1999), lo que explicaría la variabilidad genética observada. Por otra parte, Seguel *et al.* (1999), también señalan que *U. molinae* es una especie entomófila cuyo comportamiento es favorecido en un ambiente más benigno. Por lo anterior, la mayor divergencia genética debería encontrarse en entradas colectadas en áreas o ambientes que favorezcan la polinización entomófila, como lo observado en las entradas de murtilla provenientes de regiones más boreales (Seguel *et al.*, 2000).

4.5. Determinación del sistema reproductivo de la especie.

Los antecedentes reproductivos y fenológicos de la murtilla fueron determinados por Seguel *et al.* (1999). Observaciones realizadas en “murtales naturales” permitieron determinar que el período de floración, en la Región de la Araucanía, se inicia en la primera semana de diciembre, con un máximo de floración durante la primera

semana de enero, situación que varía de acuerdo a la zona geográfica. En el **Cuadro 9** se presentan los resultados de los estudios empleados para determinar el sistema reproductivo de *U. molinae*; el valor calculado para el índice de autoincompatibilidad es de 0,47. Del cuadro se deduce que la especie no es apomíctica y que por lo tanto requiere de un agente de polinización. Esto queda demostrado con la mayor formación de semillas en las pruebas genéticas C y N (polinización cruzada y natural, respectivamente).

Cuadro 9. Pruebas genéticas experimentales realizados en murtilla (*Ugni molinae*) para determinar el sistema reproductivo de la especie.

Pruebas Genéticas	N° de plantas tratadas	N° de flores tratadas	N° frutos formado	Porcentaje frutos formados	N° semillas	Promedio semillas /fruto	Promedio semillas /flor/cruzada
Autopolinización con vector (S)	12	85	4	4,7%	51	12,75	0,6
Polinización cruzada (C)	18	145	10	6,9%	184	18,4	1,26
Autopolinización sin vector (A)	26	363	11	3%	151	13,72	0,41
Apomixis (APO)	15	84	0	0%	0	0	0
Polinización natural (N)	33	708	538	76%	8586	15,96	12,12

Índice de autoincompatibilidad (I.A.I): 0,47

Sistema Reproductivo: COMPATIBLE

El bajo rendimiento de frutos y el número de semillas formadas (4,7% y 51 semillas respectivamente) en la autopolinización manual podría ser atribuible a la incipiente receptibilidad del estigma y/o a una mínima cantidad de primordios seminales maduros al momento de realizar las pruebas. En la polinización cruzada (C) se obtuvieron los valores más altos de semillas por flor cruzada (1,26), que comparados con la autopolinización manual y natural, indican que el polen mejor recibido es el de otro individuo, lo que significaría, que *U. molinae* es una especie predominantemente alógama.

Indudablemente el estudio de determinación del sistema reproductivo de la murtilla es la base para plantear un programa de mejoramiento genético de la especie, mediante cruzamientos controlados con el propósito de obtener material híbrido, aprovechando las características superiores de los progenitores seleccionados. Esta actividad se inició en INIA Carillanca, a partir de la temporada 2004-2005.

4.6. Evaluación Agronómica

4.6.1. Densidades de plantación.

Se evaluaron tres densidades de plantación: 0,60-0,90 y 1,20m sobre hilera y a 1,50m entre hileras (esta última sólo a nivel experimental). A la fecha los resultados disponibles aún no permiten emitir conclusiones al respecto ya que las plantas están iniciando su desarrollo vegetativo. Se ha observado que en las condiciones agroclimáticas de la cordillera de la costa el desarrollo de las plantas de murtilla ha sido muy superior al de otras localidades ubicadas en el llano central o en la precordillera de la Región de la Araucanía. Bajo estas condiciones, entre los genotipos evaluados se han identificado entradas que presentan un mayor desarrollo vegetativo y ya en la segunda temporada las plantas han alcanzado una altura promedio de 1,15m y un diámetro de copa que supera los 50cm. Estos resultados preliminares, indirectamente han permitido ir definiendo las zonas agroclimáticas que podrían ser más favorables para el cultivo de la murtilla en Chile.

4.6.2. Efecto del sombreado sobre el cultivo.

Es otro de los componentes del paquete agronómico que también se encuentra en proceso de evaluación. Los resultados disponibles a la fecha estarían indicando que en condiciones climáticas desfavorables para el desarrollo del cultivo (temperaturas bajo 0°C, viento, escasez hídrica), los tratamientos con sombreado o cubiertos presentarían un mayor rendimiento de fruto, un mayor diámetro de fruto y aparentemente no habría diferencias en los contenidos de sólidos solubles, respecto a los tratamientos sin cubrimiento.

4.6.3. Fertilidad.

Las observaciones iniciales indicarían que la murtilla crece en forma natural en suelos marginales y de baja fertilidad. Al respecto se consideró necesario investigar si esta especie es capaz de desarrollarse en suelos sin limitantes y con fertilización. Las observaciones realizadas en plantaciones experimentales indican que la especie se adapta, bajo condiciones de domesticación, tanto en suelos con bajos niveles de fertilidad y con limitaciones por acidez como en aquellos con niveles medios y altos de fertilidad, sin problemas de acidez. Se está evaluando el comportamiento de la murtilla en suelos con diferentes niveles de fósforo disponible, que varían entre niveles muy bajos (<5ppm) a muy altos (>21ppm), con diferentes niveles de nitrógeno disponible, que varían entre niveles muy bajos (<10ppm) a altos (>40 ppm) de este parámetro y en suelos con niveles bajos (<0,3cmol+/kg) a muy altos (>0.8cmol+/kg) de potasio intercambiable. Se observa también una buena adaptación de esta planta en suelos con niveles muy bajos y altos de calcio intercambiable, es decir valores inferiores a 2cmol+/kg y superiores a 9,1cmol+/kg, respectivamente, así como en suelos sin limitaciones de acidez y con niveles de saturación de aluminio inferiores a 2,5% y en condiciones de niveles altos de saturación de aluminio del suelo.

Respecto a la aplicación de fertilización NPK (en una sola dosis), cabe señalar que en la segunda temporada se aprecia un efecto positivo sobre el desarrollo vegetativo de la planta. Por lo mismo es importante generar información sobre rendimiento y calidad de fruto luego de la tercera temporada, es decir cosecha de fruto del año 2006 en adelante hasta estabilizar la producción, situación que se espera se produzca después del año 5 de establecida la plantación.

Los resultados actualmente disponibles en relación al desarrollo de la planta estarían indicando que, bajo condiciones de riego, la fertilización NPK condujo a una mayor altura de las plantas de murtillas que el tratamiento testigo sin fertilización (promedio obtenido de 28 observaciones).

4.6.4. Plagas y enfermedades.

En condición de cultivo han sido escasas las limitantes asociadas a plagas y no se han detectado problemas de enfermedades que requieran ser controladas. Según Andrade *et al.* (1984), en las plantas de murtilla desarrolladas en condición silvestre, se ha detectado un micoplasma (*Mycosphaerella*), que se manifiesta por manchas necróticas en las hojas y desarrollo de cuerpos frutales sobre ellas. Esta sintomatología no ha sido detectada en condición de cultivo en los sitios experimentales.

Respecto a las plagas, se han reportado problemas causados por *Copitarsia spp* y por *Callisphyrys macrocarpus* y *C. Vespa*. Durante la investigación se ha avanzado en la definición e identificación de los posibles invertebrados fitófagos, principalmente insectos, asociados a la murtilla que pudieran eventualmente afectar el cultivo. Al respecto Aguilera *et al.* (2005), señalan que, como resultado de las prospecciones realizadas se han determinado veintidós especies de invertebrados fitófagos, dieciocho corresponden a insectos, un ácaro y tres gastrópodos terrestres. Sin embargo a pesar del gran número de especies muestreadas no se ha evidenciado daños severos por causa de algunos de los agentes registrados a la fecha.

Se destacan dos casos observados, uno es la presencia en un sitio experimental de larvas de *Hylanmorpha elegans* (Buró.), atribuyéndose a éstas daños radiculares que provocaron pérdida de planta. Este ataque repentino se concentró en un ensayo experimental donde las plantas de murtillas eran evaluadas para el uso de cubiertas vegetales inertes, no así en ensayos sin cubiertas en donde no se manifestó este problema con igual intensidad. Otro insecto que se presentó en varias localidades en condiciones de cultivo, fue *Tettigades chilensis* (Am. y Serv.), ocasionando daños leves a graves, por efecto de oviposición en el tallo principal.

5. AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada por la Comisión Nacional Científica y Tecnológica (CONICYT) y de la Corporación de Fomento a la Producción (CORFO), CHILE.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, A.; Ellena, M.; Seguel, I.; Montenegro, A.; San Martín, J y Torralbo L. 2005. Primeras determinaciones de insectos y otros invertebrados fitófagos asociados a la murta (*Ugni molinae* Turcz.) (Myrtaceae,) en el Sur de Chile. IDESIA 23 N° 1: 7-11
- Aguirre, M.C.; Delporte, C.; Backhouse, N.; Erazo, S. y Negrete, R. 2005 a. Triperpenoides bioactivos de las hojas de *Ugni molinae* Turcz. “murtilla. Trabajo presentado en V jornadas de investigación en Ciencia y Tecnología. Universidad de Chile.
- Aguirre, M.C.; Delporte, C.; Backhouse, N.; Erazo, S. y Negrete R. 2005 b. Actividad antiinflamatoria tópica y antioxidante de las fracciones hexano y diclorometano de *Ugni olinae* Turcz. (“murtilla, murta”). Trabajo presentado al Congreso Internacional Farmaceutico. Santiago Chile.
- Anderson, W. 1975. Propagation of Rhododendrons by tissue cultura: Part 1. Development of a culture medium for multiplication of shorts. Proc. Inter. Plant Prop.Soc.25: 129-135
- Andrade, N; Medel, F.; Montealegre, J. 1984. Prospección del estado fitosanitario de arbustos frutales en la Región de los Lagos. Agro Sur 12 (1): 59 -64.
- Avello, M. y Pastene, E. 2005. Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz. (“murtilla”). BLACPMA. 4 (2):3339
- Cárcamo, L. 2005 Estudio del efecto de las condiciones de extracción de hoja de murtilla (*Ugni molinae* Turcz) del ecotipo Car 2 sobre características químicas y propiedad antioxidante. Trabajo para optar al Título de Ingeniero en Alimentos, Universidad de La Frontera. 98 pag.
- Cubillos, A. 1994. Recursos fitogenéticos de la biodiversidad chilena: Una proposición de priorización para su preservación. Simiente 64 (4):229 -235.
- Dillon, W. R. and Goldstein, M. 1984. Multivariate analysis: methods and applications. New York, University States of America, 587 p.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolations procedure for small quantities of fresh leaf tissue Phytochem. Bull.19:11- 19
- Economou, A. and Read, P.1984. *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas Hort. Science 19 (1): 60 – 61.
- Espinoza, K. 2004. Determinación de características polifenólicas y antioxidante de ecotipos de murtilla(*Ugni molinae* Turcz). Trabajo para optar al Título de Ingeniero en Alimentos, Universidad de La Frontera. 110 pag.
- Fossard, R. 1974. Tissue culture of Eucalyptus. Australian Forestry 37: 43 - 45.
- Gaete, L. 2005. Frutos de murta (*Ugni molinae* Turcz.) como fuente antioxidante y fibra. Universidad de la Frontera. Facultad de Ingeniería, Ciencia y Administración. Departamento de Ingeniería Química. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero en Alimentos. 112p.
- Fajardo, M. 2005. Estudio del efecto de las condiciones de extracción de hoja de murtilla(*Ugni molinae* Turcz) del ecotipo Car 1 en función de características químicas y propiedad antioxidante, Trabajo para optar al título de Ingeniero en Alimentos, Universidad de La Frontera. 125 pag.
- Jaccard, P. 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. Bull Soc Vaudoise Sci Nat 37:547-579.

- Kuppers, H. 1996. Atlas de colores. Editorial Blume. Barcelona, España. 1614p.
- Landrum, L.R. and Donoso, C. 1990. Notes on Economic Plants. *Economic Botany*. 44 (4): 536- 539.
- Letzkus, G. 1999. Establecimiento *in vitro* de la murtila (*Ugni molinae* Turcz.). Tesis para optar al grado académico de Licenciado en Ciencias Forestales y al título profesional de Ingeniero Forestal. Escuela de Ingeniería Forestal. Universidad de Temuco. 127 pag.
- Lloyd, G. and Mc. Crown, B. 1981. Woody Plant Medium. A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *Hort. Science* 16: (1): 453 p.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.
- Nei, M. and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5267-5273.
- Novoa, H.R. 1983. Antecedentes sobre establecimiento y producción de frutos de la especie *Ugni molinae* (Turcz.). Tesis Ingeniero Forestal. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 90 p.
- Peña, K. 2005. Estudio químico y de acción antioxidante de frutos de murta (*Ugni molinae* Turcz.) y propuesta de productos. Universidad de la Frontera. Facultad de Ingeniería, Ciencia y Administración. Departamento de Ingeniería Química. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero en Alimentos. 112p.
- Pessa, J.A. y Caprile, L.R. 1993. Análisis y composición de aceite en semilla de murtila (*Ugni molinae*). *Alimentos* 18(1):11-14.
- Quorin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus sp.* *Acta Hort.* 78:437- 442.
- Rodriguez, M. 2000. Análisis de la diversidad fenotípica de la murta (*Ugni molinae* Turcz.) através de métodos multivariados. Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Mención Mejoramiento Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Graduados Universidad Austral de Chile. 178 pag.
- Rubilar, M.; Pinelo, M.; Ihl, M.; Scheurmann, E.; Sineiro, J. and Nuñez, J. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz.) as a Source of antioxidant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1):59-64.
- Ruiz, T. and Arroyo, M. 1978. Plant reproductive ecology of secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10 (3): 221: 230.
- Seguel, I.; Riveros, M.; Lehnebach, C. y Torres, A. 1999. Antecedentes reproductivos y fenológicos de *Ugni molinae* (Turcz) (Myrtaceae). *Phyton* 65:13-21
- Seguel, I.; Peñalosa, E.; Gaete, N.; Montenegro, A. y Torres, A. 2000 “Colecta y caracterización molecular de germoplasma de murtila (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile”. *Agro Sur* 28(2):32-41.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A.Jr. 1965 Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.
- Sobrevila, C. and Arroyo, M.T.K. 1982. Breeding system in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Syst. Evolut.* 140: 19-37.
- Torres, A.; Seguel, I.; Contreras, G. y Castro, M. 1999. Caracterización físico química de frutos de murtila (*Ugni molinae* Turcz.)”. *Agricultura Técnica (Chile)* 59(4):260 -270. Urban, O. 1934. Botánica de las plantas endémicas de Chile. 291p

Vivanco, M. 1999. Análisis estadístico multivariable. Editorial universitaria. Universidad de Chile.233.

Wilckens, R; Venegas, F.; Hevia, F.; Tapia, M.; Araya, F. y Conejeros, S. 1991. Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) I. Obtención de extractos foliares no oxidados para separar electroforéticamente proteínas y enzimas en geles de poliacrilamida. *Agrociencia* 7(2):129 -134

Von Gadow, A.; Jourbert, E. and Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of roobos tea. *J.Agric.Food Chem.*, 45: 632-638.

MUPLICACIÓN Y CONSERVACION *IN VITRO* DE PASIFLORAS ANDINAS

Avila, T.; De la Barra, S.; Coca, N.; Guevara, N.; Céspedes, J. y L Guzmán, L.¹

1. RESUMEN

El Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, cuenta con una colección de pasifloras andinas de especies comestibles y parientes silvestres: *Passiflora mollissima*, *Passiflora ligularis*, *Passiflora pinnatistipula*, *Passiflora umbillicata*, *Passiflora amethystina*, *Passiflora naviculata*, *Passiflora mandonii*, *Passiflora morifolia*, *Passiflora tricuspis* y *Passiflora tarminiana*. La mayoría de las especies de pasifloras son recalcitrantes, por lo que el cultivo *in vitro* constituye una muy buena alternativa para su conservación *ex situ*. Los objetivos del estudio fueron: optimizar los medios de cultivo y las condiciones para el establecimiento, la micropropagación y la conservación de la colección de pasifloras. Se lograron establecer entradas de las especies: *P. mollissima*, *P. ligularis*, *P. pinnatistipula*, *P. amethystina*, *P. morifolia*, *P. tarminiana* y *P. tricuspis* con el medio de cultivo que contenía: sales minerales MS diluidas a la mitad de su concentración, vitaminas Gamborg, 5g de carbón activo, 200mg de caseína hidrolizada y 1mg de GA₃ y cultivando los embriones. Para la multiplicación, el medio con sales minerales MS en concentración completa más 0.5mg de GA₃ y 5g de carbón fue el más apto. En el caso de *P. ligularis*, se requirió modificar el medio de multiplicación adicionando 0,5-1mg de NAA, 0,5mg de BAP y 500mg de carbón activo y para *P. amethystina* 0.5mg de NAA y sin carbón activo. El medio de conservación con 20g de sorbitol, permitió retardar el crecimiento de las plántulas y obtener yemas viables en 19 entradas de las especies: *P. mollissima*, *P. pinnatistipula*, *P. morifolia* y *P. tarminiana*.

2. INTRODUCCIÓN

Bolivia es un importante centro de diversificación genética vegetal debido a sus particulares condiciones topográficas y climáticas. Esta diversidad genética, tanto de su flora natural, como de especies domesticadas y de los parientes silvestres de plantas cultivadas está expuesta al riesgo de erosión debido a diferentes factores como cambios ambientales de origen biótico y abiótico, explotación, introducción de nuevas especies y cambios en las costumbres alimenticias. Por esto, la conservación de los recursos genéticos es una actividad muy importante para garantizar la persistencia de los mismos.

El género *Passiflora* de la familia *Passifloraceae*, contiene más de 400 especies distribuidas en el continente americano. En Bolivia se han encontrado alrededor de 60 especies (Vásquez, 1998). A pesar de que muchas de estas especies son permanentemente utilizadas en el ámbito local, ninguna ha sido sometida a mejoramiento. Estas plantas poseen una diversidad genética única y características de rusticidad como resistencia o tolerancia a condiciones adversas de clima, suelo, enfermedades y plagas. Los frutos son consumidos localmente como frutas, bebidas y en postres (Guzmán, 1999).

El Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani (CIFP), en cooperación con el IPGRI, realizó en 1997 una colecta de pasifloras de frutos comestibles de las especies *Passiflora mollissima* (tumbo) y *Passiflora ligularis* (granadilla), además de material silvestre de las especies: *Passiflora pinnatistipula*, *Passiflora umbillicata*, *Passiflora amethystina*, *Passiflora naviculata*, *Passiflora mandonii* y *Passiflora morifolia*. Posteriormente, se incluyeron en la colección muestras de las especies *Passiflora tricuspis* y *Passiflora tarminiana*, a raíz de la propuesta de considerar a esta última como una nueva especie (Coppens d'Eeckenbrugge y colaboradores, 2001) ya que había sido considerada como *P. mollissima*.

Las muestras colectadas se conservaron en forma de semillas en el banco de germoplasma del CIFP en una cámara a 0°C y aquellas entradas que lograron aclimatarse a las condiciones de Pairumani, fueron también conservadas en campo. En el año 1997 se sembró la colección en invernadero germinando más

¹ Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani. Casilla 128, Cochabamba, Bolivia. email: fitogen@fundacionpatino.org del 80% y en el año 2002, germinó en invernadero solamente el 56% de la colección. La mayoría de las especies de esta familia botánica no toleran la desecación (Guzzo y colaboradores, 2003). Por este motivo se propuso la conservación *in vitro* como alternativa para mantener la colección de germoplasma.

El cultivo de tejidos vegetales permite la conservación de material en condiciones *in vitro* como una alternativa útil de conservación *ex situ* para aquellas especies de semillas recalcitrantes o intermedias y de reproducción vegetativa. Se la puede utilizar como un sustituto y/o como complemento de la conservación en campo, ya que ofrece mayor seguridad y fácil acceso e intercambio del germoplasma (Withers, 1993).

Algunas limitaciones de la conservación *in vitro* que restringen el acceso a este tipo de metodologías son el nivel tecnológico, el costo y la necesidad del desarrollo de protocolos particulares para cada especie e incluso para variedades dentro de una misma especie (Van der Hurk, 1999).

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue el ajustar el medio de cultivo y las condiciones para el establecimiento *in vitro* de la colección de pasifloras, a partir de las semillas conservadas en el banco de germoplasma del CIFP. Un segundo objetivo fue identificar el medio de cultivo más adecuado para la micropropagación de la colección de pasifloras a partir de las plántulas establecidas *in vitro*. El tercer objetivo fue estudiar el efecto del manitol y el sorbitol sobre la conservación *in vitro* de 36 entradas de la colección de pasifloras andinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Para el establecimiento se utilizaron semillas de 87 entradas de la colección de pasifloras conservadas en el banco de germoplasma del CIFP. Para la multiplicación se utilizaron explantes de las entradas que pudieron ser establecidas *in vitro*. Para el ensayo de conservación se utilizaron explantes de las especies que estaban siendo multiplicadas en el laboratorio durante varios subcultivos.

4.2. Desinfección de las semillas

Las semillas se desinfectaron de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Remojo de las semillas en el insecticida-acaricida Vertimax (1ml/litro de agua) durante 15 minutos, seguido de cinco enjuagues con agua destilada.
- b) En la cámara de flujo laminar, las semillas fueron sumergidas en hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos, luego se procedió a enjuagarlas cinco veces durante 3 minutos con agua destilada esterilizada en autoclave.

4.3. Establecimiento *in vitro*

4.3.1. Ensayo 1

Se realizó un primer ensayo exploratorio con la finalidad de evaluar un amplio rango de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de las pasifloras. En dicho ensayo se evaluaron 20 medios (**Tabla 1**) utilizando un diseño de bloques al azar con 10 repeticiones.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo para el establecimiento de pasifloras

Medio	Sales minerales	Caseína hidrolizada	Acido giberélico	Carbon activo
-------	-----------------	---------------------	------------------	---------------

E1	Sales MS	100mg	0	-
E2	Sales MS	100mg	0,5mg	-
E3	Sales MS	100mg	1mg	-
E4	Sales MS	200mg	0	-
E5	Sales MS	200mg	0,5mg	-
E6	Sales MS	200mg	1mg	-
E7	Sales MS	400mg	0	-
E8	Sales MS	400mg	0,5mg	-
E9	Sales MS	400mg	1mg	-
E10	Sales MS	200mg	0,5mg	5g
E11	Sales MS diluidas ½	100mg	0	-
E12	Sales MS diluidas ½	100mg	0,5mg	-
E13	Sales MS diluidas ½	100mg	1mg	-
E14	Sales MS diluidas ½	200mg	0	-
E15	Sales MS diluidas ½	200mg	0,5mg	-
E16	Sales MS diluidas ½	200mg	1mg	-
E17	Sales MS diluidas ½	400mg	0	-
E18	Sales MS diluidas ½	400mg	0,5mg	-
E19	Sales MS diluidas ½	400mg	1mg	-
E20	Sales MS diluidas ½	200mg	0,5mg	5g

Estos medios contenían además vitaminas de Gamborg, 20g de sacarosa y 2g de phytigel por litro. Para este ensayo se utilizaron semillas de una entrada elegida al azar, por cada especie. Se evaluaron 30 semillas por especie.

4.3.2. Ensayo 2

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo 1, se estableció un segundo ensayo con la finalidad de estimular la germinación, en el que se estudiaron los siguientes tratamientos:

- Semillas tratadas con GA₃. Luego de la desinfección, las semillas se dejaron en remojo en una solución a 1mg/ml de GA₃ durante 24 horas y posteriormente fueron introducidas al medio de establecimiento.
- Cultivo de embriones más el tejido de reserva.
- Cultivo de embriones (Mejía y colaboradores, 1994).
- Semillas escarificadas. Previa a la desinfección, las semillas fueron escarificadas con la ayuda de lijas para madera.
- Testigo, las semillas se introdujeron en el medio de establecimiento sin tratamiento alguno

Para el presente ensayo se utilizaron semillas de 87 entradas de las especies: *P. mollissima*, *P. ligularis*, *P. pinnatistipula*, *P. umbilicata*, *P. amethystina*, *P. naviculata*, *P. mandonii*, *P. morifolia*, *P. tricuspis* y *P. tarminiana*, conservadas en el banco de germoplasma. Se evaluaron 435 semillas por tratamiento.

El medio de cultivo utilizado para el ensayo fue el que presentó mejores resultados en el ensayo anterior y tenía la siguiente composición: sales minerales MS diluidas a la mitad, vitaminas de Gamborg, 20g de sacarosa, 5g de carbón activo, 200mg de caseína hidrolizada, 1mg de GA₃ y 2g de phytigel por litro.

En los ensayos de establecimiento se evaluaron las siguientes variables: contaminación, germinación, desarrollo de plántula con raíz y presencia de callo.

4.4. Multiplicación *in vitro* - Micropropagación

Para este ensayo se utilizaron plantas de las especies: *P. mollissima*, *P. ligularis*, *P. pinnatistipula*, *P. amethystina*, *P. morifolia* y *P. tarminiana*, establecidas *in vitro*. El número de esquejes utilizados fue de 50 por entrada. Se evaluaron seis medios de cultivo (Carnier y Carneiro, 1994) que tenían la siguiente composición (**Tabla 2**):

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo para la micropropagación de pasifloras

Medio	Sales minerales	Reguladores de crecimiento
M1	Sales MS	Sin reguladores
M2	Sales MS	GA ₃ 0,5mg
M3	Sales MS	BAP 0,6mg y NAA 0,3mg
M4	Sales MS diluidas ½	Sin reguladores
M5	Sales MS diluidas ½	GA ₃ 0,5mg
M6	Sales MS diluidas ½	BAP 0,6mg y NAA 0,3mg

NAA=Acido naftalen acético; BAP=Benzil aminopurina

Todos los medios contenían además compuestos orgánicos de Gamborg, 20g de sacarosa, 5g de carbón activo, 200mg de caseína hidrolizada y 2g de phytigel por litro.

En este ensayo se evaluaron las siguientes variables: brotación de la yema, altura de la plántula y factor de multiplicación, considerado como el número de explantes viables que se obtienen a partir de una planta. El tiempo de duración del ensayo fue de dos meses.

4.5. Conservación *in vitro*

El material vegetal utilizado fueron esquejes obtenidos de plantas que se hallaban varios ciclos en multiplicación de las especies: *P. mollissima*, *P. morifolia*, *P. pinnatistipula* y *P. tarminiana*. Se utilizaron 20 explantes por tratamiento.

Se estudió el efecto del sorbitol y el manitol, en concentraciones de: 20, 40 y 60g/l, sobre la conservación *in vitro* de 36 entradas de pasifloras de la colección.

El medio base estaba compuesto por sales minerales MS, vitaminas Gamborg, 200mg de caseína hidrolizada, 2g de carbón activo y 20g de sacarosa/litro. La concentración de reguladores de crecimiento utilizada para la conservación se determinó de acuerdo a los resultados de la multiplicación. Sin embargo en aquellas entradas que se multiplicaron bien en un medio sin reguladores de crecimiento, aunque no fuera el óptimo, no se utilizaron reguladores para la conservación a fin de evitar posibles cambios en el material genético de las pasifloras conservadas. Las plantas se mantuvieron nueve meses en los medios de cultivo, semanalmente se evaluaron el crecimiento y comportamiento de las mismas. Al finalizar este período se evaluó la viabilidad de las yemas en un medio de multiplicación.

Se utilizó un modelo estadístico de bloques al azar con 5 repeticiones.

5. RESULTADOS

5.1. Establecimiento *in vitro*

5.1.1. Ensayo 1

Una evaluación preliminar de los medios, a modo exploratorio, permitió observar diferencias entre los medios para el porcentaje de germinación de las semillas, que no fueron analizadas estadísticamente, pero sirvieron para orientar el diseño de los ensayos posteriores. Los medios de cultivo que contenían sales minerales diluidas a la mitad de la concentración dieron lugar a plantas germinadas, sin embargo solo el medio que contenía carbón activo dio lugar a plantas desarrolladas, en el resto las plantas germinaron y no crecieron. El medio de cultivo E20 permitió en las especies: *P. mollissima*, *P. ligularis*, *P. pinnatistipula*, *P. amethystina*, *P. morifolia* y *P. tarminiana*, que las semillas germinaran y se desarrollen plantas. Este medio contenía: sales minerales MS diluidas a la mitad

de la concentración, vitaminas Gamborg, 5g de carbón activo, 200mg de caseína hidrolizada, 1mg de GA₃, 20g de sacarosa y 2g de phytigel por litro.

En el medio mencionado, las semillas comenzaron a germinar a partir del quinto hasta el séptimo mes de puestas en cultivo. Debido a que las semillas tomaron mucho tiempo en germinar y a los bajos niveles de germinación, se consideró una posible dormancia de las mismas por lo que se planteó el segundo ensayo.

5.1.2. Ensayo 2

En la **Tabla 3** se observan los resultados de los cinco tratamientos.

Tabla 3. Resultados de los tratamientos evaluados para el establecimiento *in vitro* de pasifloras

Tratamiento	Contaminación en porcentaje	Germinación en porcentaje	Desarrollo planta c/raiz	Presencia de callo
Testigo	9.7	13.0	Si	No
Semillas tratadas con GA ₃	7.1	8.1	Si	No
Cultivo de embriones	7.1	41.7	Si	Si
Semillas escarificadas	23.9	1.4	Si	No
Cultivo de embriones con tejido de reserva	7.5	24.8	No	Si

El establecimiento de embriones con el tejido de reserva no dio lugar a ninguna plántula desarrollada, estos embriones germinaron y a partir del tejido de reserva se formó callo el cual se desarrolló rápidamente. Como puede observarse en la **Tabla 3**, las semillas escarificadas presentaron una mayor contaminación que fue ocasionada por bacterias, lo cual podría deberse a que las manipulaciones realizadas durante la escarificación difundieron el inóculo entre las muestras.

El cultivo de embriones permitió un mayor porcentaje de germinación (41,7%) comparado con el testigo (13%), lo cual muestra una dormancia que podría deberse a impermeabilidad y/o presencia de inhibidores de germinación en las cubiertas de la semilla. Los embriones comenzaron a germinar a partir de la primera semana de puestos en cultivo, siendo que las semillas tomaron más de cinco meses.

Solamente 70 entradas de las especies: *P. mollissima*, *P. ligularis*, *P. pinnatistipula*, *P. amethystina*, *P. morifolia* y *P. tarminiana*, pudieron ser establecidas *in vitro* (80.5%), las restantes presentaron problemas con la germinación, posiblemente como consecuencia de la conservación de las semillas en cámara fría durante varios años o debido a que los medios y condiciones utilizadas en el presente estudio no se adecuaron a los requerimientos de estas especies. Posteriormente se estableció *P. tricuspis*.

Se observó también una influencia de la especie, por ejemplo los embriones de tumbo (*P. mollissima*) germinaron a partir de la primera semana, pero los embriones de granadilla (*P. ligularis*) germinaron a partir de la quinta semana. Otro de los factores que influyó en la germinación de las semillas y embriones, fue la madurez de la semilla al momento de la colecta.

5.2. Micropropagación

En la **Tabla 4** se presentan los resultados de la multiplicación, los cuales fueron promediados a partir de las todas las entradas evaluadas.

Tabla 4. Resultados de los medios evaluados para micropropagación de pasifloras

Medio de cultivo	Brotación yemas expresada en porcentaje	Altura de las plántulas expresada en cm	Factor de multiplicación *
M1	100	4.0	7.8
M2	100	5.0	8.9
M3	100	2.0	3.6
M4	100	3.0	5.5
M5	90	1.0	2.3
M6	90	1.5	3.8

*Factor de multiplicación=número de yemas viables que son obtenidas a partir de cada planta.

Se observa en la **Tabla 4**, que los medios que contenían sales minerales MS completas mostraron mejores resultados, tanto en brotación de yemas como en la altura de la planta y en factor de multiplicación. El medio M2 que contenía 0.5mg de GA₃/l, se mostró como el más adecuado para la multiplicación *in vitro* de la mayoría de las especies estudiadas, seguido del medio M1 que no contenía reguladores de crecimiento en su composición. Los medios con sales minerales diluidas a la mitad, mostraron un crecimiento más lento y plantas delgadas y más débiles. El medio de cultivo M3 fue el que presentó una mayor cantidad de yemas muertas.

Durante los subcultivos que se realizaron en los medios M1 y M2, se observó que las especies *P. mollissima*, *P. morifolia* y *P. pinnatistipula* (**Foto 2**) fueron aquellas que respondieron mejor a los medios estudiados. Las especies *P. amethystina* y *P. ligularis* presentaron problemas para su multiplicación. *P. amethystina* presentaba plántulas delgadas y bajo factor de multiplicación y *P. ligularis* presentaba plántulas pequeñas con pocas yemas y además se defoliaban; por lo que se evaluaron diferentes complejos vitamínicos y concentraciones de reguladores de crecimiento. Los medios de cultivo optimizados para las especies que están siendo micropropagadas en el laboratorio se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Medio de cultivo para la micropropagación por especie

Especie	Medio de cultivo
<i>Passiflora mollissima</i>	M1 y M2
<i>Passiflora ligularis</i>	Medio base* + 0,5-1mg de NAA, 0,5mg de BAP y 500mg de carbón
<i>Passiflora tarminiana</i>	M1 y M2
<i>Passiflora amethystina</i>	Medio base* + 0,5 mg de NAA, sin carbón activo
<i>Passiflora pinnatistipula</i>	M2
<i>Passiflora morifolia</i>	M1
<i>Passiflora tricuspis</i>	M1

*El medio base esta compuesto por: sales minerales MS, compuestos orgánicos de Gamborg, 20g de sacarosa, 200mg de caseína hidrolizada y 2g de phytigel por litro.

Plantas *in vitro* provenientes de diferentes medios y genotipos, fueron plantadas en tierra estéril y aclimatadas en una estructura de plástico que las cubría completamente. Luego de tres semanas en estas condiciones, fueron transplantadas a condiciones de invernadero.



Foto 1. Colección de pasifloras establecidas *in vitro*



Foto 2. Multiplicación de *P. pinnatistipula*

5.3. Conservación *in vitro*

Luego de nueve meses de cultivo, se observó que el medio adicionado con 20g de sorbitol fue el que mejor permitió retardar el crecimiento de las plantas, las cuales presentaban entrenudos cortos y yemas numerosas (**Fotos 3 y 4**). Al finalizar el ensayo, las yemas provenientes de este medio fueron viables en un medio de multiplicación. Estas características fueron observadas en alrededor del 50% de las entradas estudiadas, las entradas restantes no llegaron viables al final de los nueve meses. En *P. tarminiana*, las plantas se conservaron verdes y con yemas viables hasta alrededor del sexto mes de conservación, a partir de cuando fueron muriéndose. En vista de que estas entradas no respondieron a los tratamientos estudiados, actualmente se está realizando un ensayo disminuyendo las concentraciones de manitol y sorbitol a 5, 10 y 15 g/l.

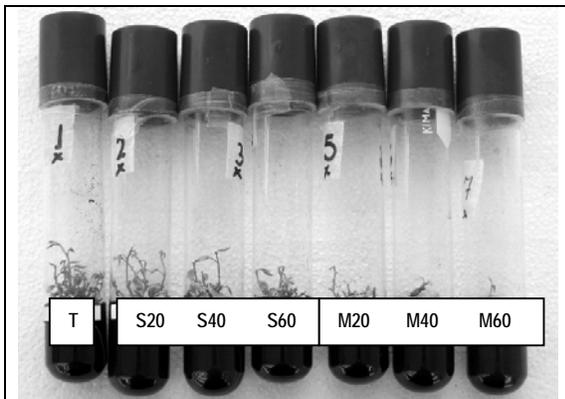


Foto 3. Entrada 014 (*P. pinnatistipula*)
S=sorbitol en concentraciones de 20, 40 y 60g
M=manitol en concentraciones de 20, 40 y 60g

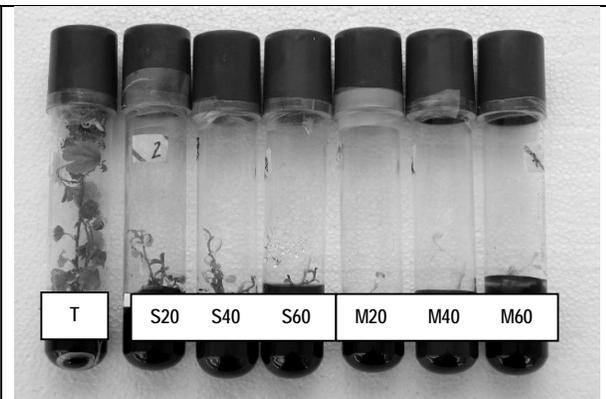


Foto 4. Entrada 034 (*P. mollissima*)
S=sorbitol en concentraciones de 20, 40 y 60g
M=manitol en concentraciones de 20, 40 y 60g

En la **tabla 6** se muestran algunas características presentadas por las cuatro especies estudiadas luego de nueve meses de cultivo.

Tabla 6. Conservación de las especies estudiadas

Especie	Observaciones
<i>Passiflora mollissima</i>	El medio que permitió retardar el crecimiento de los explantes manteniéndolos viables, fue el que contenía 20g/l de sorbitol. En las tres concentraciones con manitol, alrededor de la 4 ^{ta} semana de iniciado el tratamiento, las plantas comenzaron a secarse y necrosarse, perdiéndose todo material cultivado en estos medios.
<i>Passiflora tarminiana</i>	En el medio con 20g de sorbitol los explantes presentaron yemas viables hasta el 6 ^{to} mes de evaluación y luego fueron muriendo. En manitol todos los explantes se oxidaron a partir de la 4 ^{ta} semana de cultivo.
<i>Passiflora pinnatistipula</i>	Los tres tratamientos con sorbitol presentaron yemas viables hasta el 9 ^{no} mes de evaluación. En los tratamientos con manitol, las plantas formaron callo y se pusieron vidriosas. Se rescataron algunas yemas, las cuales no brotaron en la etapa de multiplicación posterior a la conservación.
<i>Passiflora morifolia</i>	Se presentaron yemas viables en todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, las plantas cultivadas en manitol presentaron yemas muy pequeñas y vidriosas.

6. CONCLUSIONES

- Para el establecimiento *in vitro* de las especies de pasifloras estudiadas, se obtuvieron mejores resultados con el medio de cultivo que contenía: sales minerales MS diluidas a la mitad de su concentración, vitaminas Gamborg, 5g de carbón activo, 200mg de caseína hidrolizada y 1mg de GA₃ por litro.
- El cultivo de embriones permitió un mayor porcentaje de germinación en las especies estudiadas, por lo que la dormancia podría deberse a impermeabilidad y/o presencia de inhibidores de germinación en las cubiertas; sin embargo se requieren mayores estudios en este punto.
- Los medios y las condiciones estudiadas permitieron establecer *in vitro* 70 entradas de las especies: *P. mollissima*, *P. ligularis*, *P. pinnatistipula*, *P. amethystina*, *P. morifolia*, *P. tarminiana* y posteriormente la especie *P. tricuspis*.
- El medio de cultivo que presentó mejores resultados para la micropropagación de las pasifloras establecidas, fue el que contenía sales minerales MS en concentración completa adicionado con 0.5mg de GA₃ y 5g de carbón activo por litro. Sin embargo para la especie *P. ligularis* se realizó una modificación al medio adicionando por litro 0,5-1mg de NAA, 0,5mg de BAP y 500mg de carbón activo y en el caso de *P. amethystina*, la adición de 0.5mg de NAA y la eliminación del carbón del medio.
- Se cuenta con un protocolo de conservación *in vitro* para 19 entradas de la colección, de las especies: *P. mollissima*, *P. pinnatistipula*, *P. tarminiana* y *P. morifolia*, donde la adición de 20g de sorbitol al medio de cultivo, permitió retardar el crecimiento de las plántulas y al final de nueve meses de conservación, se obtuvieron yemas viables que dieron lugar a plantas en un medio de multiplicación.
- El presente trabajo ha mostrado que el establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de las especies estudiadas, están influenciados por la especie, siendo *P. mollissima* y *P. morifolia* las que mejor se adaptaron al cultivo de tejidos y *P. ligularis* aquella que mostró mas problemas, especialmente para la micropropagación.
- La conservación *in vitro* ha sido incluida en la estrategia de conservación de la colección de pasifloras del CIFP conjuntamente con la conservación *in vivo* en jardines.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avila, T.; Guzmán, L. y de la Barra, S. 2004. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de la colección de pasifloras de altura. Memorias del XI Congreso Internacional de Cultivos Andinos. Cochabamba, Bolivia.

Alvarez de la Roche, E. 1993. Comparación de material parental y micropropagado de granadilla *Passiflora ligularis* por medio de electroforegramas de proteínas totales y esterasa. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.

Carnier, M. y Carneiro, M.L. 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *In*: Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:211-217.

Coca, N.; Avila, T. y Guzman, L. 2005. Conservación *in vitro* de pasifloras andinas. Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, Montevideo, Uruguay.

Coppens D'eeckenbrugge, G.; Barney, V.; Jorgensen, P. y Macdougall, J. 2001. *Passiflora tarminiana*, a new cultivated species of *Passiflora* subgenus *Tacsonia*. *In*: Novon 11(1):8-15.

Guzmán, L. 1999. Colecta de Passifloras en Bolivia. Memorias de la 2^{da} Reunión Boliviana sobre Recursos Fitogenéticos de Cultivos Nativos. Editado por la Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia.

Guzzo, F.; Ceoldo, S.; Andereetta, F.; Marconi, A.M. y Levi, M. 2003. Strategies for the identification of bioactive molecules in *Pasiflora ssp.* Proceedings of the XLVII Italian Society of Agricultural Genetics-SIGA Annual Congress, Verona, Italia.

Ibisch, P. y Merida, G. 2003. Biodiversidad: La riqueza de Bolivia, estado de conocimiento y conservación. Editorial FAN, Bolivia.

Mejía, A.; Muñoz, C.; Jacobsen, H.; Roca, W. and Singh, S. 1994. Interspecific hybridization between common bean and tepary bean: increased hybrid embryo growth, fertility and efficiency of hybridization through recurrent and congruity backcrossing. *In*: Theor. Appl. Genet. 88:324-331.

Ovalle, R. 1995. Organogénesis *in vitro* de *Passiflora mollisima* y *P. ligularis* a partir de discos de hoja. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

Van Der Hurk, A. 1999. Complementariedad entre la conservación *ex situ* y la *in situ*. Memorias de la 2^{da} Reunión Boliviana sobre Recursos Fitogenéticos de Cultivos Nativos. Editado por la Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia.

Vasquez. 1998. Las especies de *Passiflora* subgénero Granadilla serie *Laurifoliae* (*Passifloraceae*) en Bolivia. Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica 2(1): 36-45.

Withers, L.A. 1993. New technologies for the conservation of plant genetic resources. International Crop Science. Crop Science Society of America. Madison, USA.

CONSERVACION DE SEMILLAS EN AMBIENTES NATURALES

Rosso, B.S.¹; Ferrer, M.E.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura requiere de cultivos de plantas uniformes y como práctica común las mismas variedades son sembradas en gran escala. Por ese motivo mucha de la diversidad genética de los cultivos se ha perdido.

Los numerosos bancos de germoplasma establecidos a nivel mundial tienen un rol fundamental en conservar semilla de poblaciones de plantas que de otra manera hubieran desaparecido.

La conservación de recursos genéticos es una actividad fundamental de los bancos de germoplasma que tiene como finalidad disponer de los mismos durante largos períodos.

La conservación de recursos genéticos en forma de semilla se realiza normalmente en cámaras a temperaturas inferiores a los 10°C hasta los -20°C, ya sea para conservación a mediano o largo plazo. Esto requiere de importantes inversiones en construcciones, aislamiento térmico, mantenimiento y energía. Una posibilidad de conservación poco explorada es utilizar ambientes naturales de bajas temperaturas, alternativa que puede resultar en una importante reducción de costos de mantenimiento de las colecciones. Este tipo de conservación se está poniendo en práctica en los bancos nórdicos utilizando una cueva en una montaña en un sitio de hielos permanentes en Svalbard, Noruega (Evjen, 2006).

Con el objetivo de investigar sistemas de almacenamiento destinados a la conservación económica de los recursos genéticos vegetales, el Banco de Germoplasma de la EEA Pergamino de INTA, estableció en 1983 ensayos con semilla de diferentes especies en tres sitios naturales, dos de ellos ubicados en bases militares-científicas de la Antártida Argentina y en la EEA INTA Abra Pampa en la región de la Puna en la provincia de Jujuy.

Palabras claves: conservación, ambientes naturales, semilla, germinación

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies utilizadas, características de los sitios de conservación y períodos de monitoreo del ensayo se presentan en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Sitios, condiciones, especies y períodos de monitoreo.

	Sitio	T°C promedio	Especies	Períodos de monitoreo (años)
1	Abra Pampa (Pcia.Jujuy, Argentina)	9,5	Trigo, Maíz, Soja	2 7 10 20
2	Base Belgrano II (Antártida Argentina)	-18	Maíz, Soja	2 4 20
3	Base Jubany (Antártica Argentina)	-2	Maíz, Soja	2 4 10

¹ Estación Experimental Agropecuaria-INTA, 2700-Pergamino, Argentina brosso@pergamino.inta.gov.ar

Se guardaron 8 repeticiones de 100 semillas para cada fecha de extracción por cada especie en cada sitio de conservación.

En la Antártida las bolsas fueron ubicadas en una caja de aluminio y colocadas en una cueva en el hielo continental con la participación del Instituto Antártico Argentino y la colaboración de la Fuerza Aérea Argentina. Las temperaturas en la Antártida son estables sobre el hielo, no obstante se presenta cierta oscilación entre verano e invierno. En Abra Pampa las cajas con las muestras estaban acondicionadas dentro de un galpón cerrado por lo que la alternancia fue menor que en condiciones externas que oscilaron entre 1,9°C y 13°C de promedio para los meses de julio y enero que son los meses más frío y más cálido, respectivamente.

Las semillas utilizadas fueron deshidratadas previamente en un medio con sílica gel hasta llegar a una humedad inferior al 6%, colocadas en envases impermeables de polietileno+aluminio+papel y selladas herméticamente. Se realizó el poder germinativo (PG) inicial y luego el monitoreo a distintos intervalos de tiempo (**Cuadro 1**). Los análisis de germinación se realizaron de acuerdo a reglas ISTA. En la extracción final de los sitios 1 y 2 se hicieron determinaciones del contenido de humedad de la semilla siguiendo las recomendaciones ISTA. En la Base Jubany (sitio 3), se dio por finalizado el ensayo a los 10 años debido a las grietas provocadas por el deshielo.

3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Luego del período de conservación que osciló entre 10 y 20 años, en los 3 sitios la viabilidad superaba el 50% dependiendo de la especie y condiciones de conservación.

En Abra Pampa los resultados fueron diferentes según la especie considerada (**Figura 1**). El trigo mantuvo un PG superior al 80% luego de 20 años de conservación con un contenido de humedad de semilla (C.H.S.) de 5,7%. En maíz el PG fue de 67% con 5,8% de C.H.S., y en soja el PG descendió al 57% con un 5,4% de C.H.S. La temperatura de este sitio es similar a las que se utilizan en un Banco.

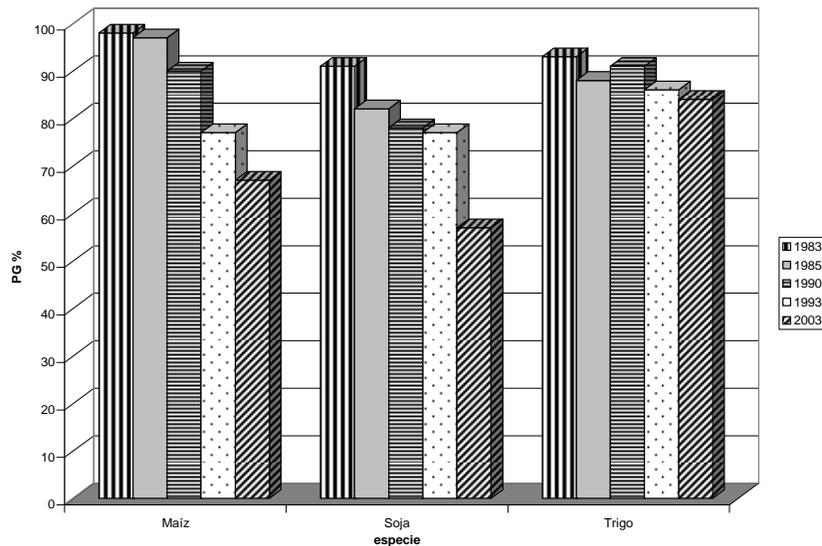


Figura 1. Germinación de las especies conservadas en Abra Pampa en diferentes intervalos de monitoreo.

En la Base Belgrano II, luego de 20 años de conservación tanto el maíz como la soja conservaban un PG similar al inicial que era superior al 90% (**Figura 2**), con un C.H.S. de 4,7% en maíz y 5,5% en soja.

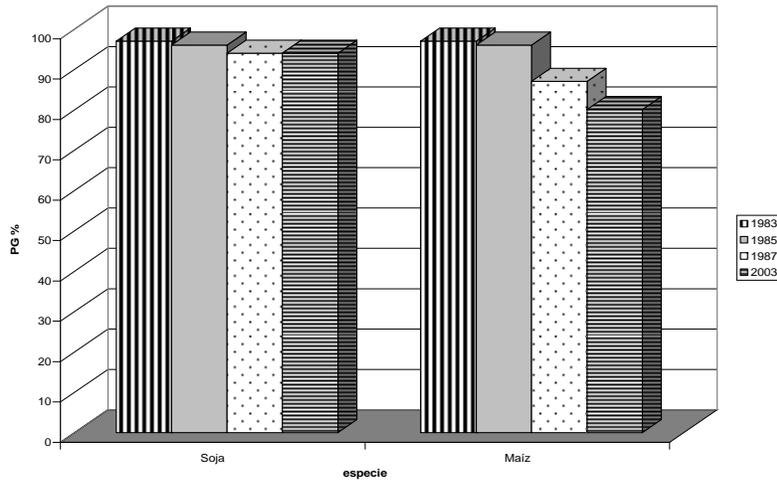


Figura 2. Germinación de maíz y soja conservados en la Base Belgrano II (Antártida Argentina) en distintos intervalos de monitoreo.

En la Base Jubany (**Figura 3**) las extracciones se hicieron a los 2, 4 y 10 años. Luego de ese tiempo de conservación la semilla de maíz germinaba en un 90% y la de soja un 83 %.

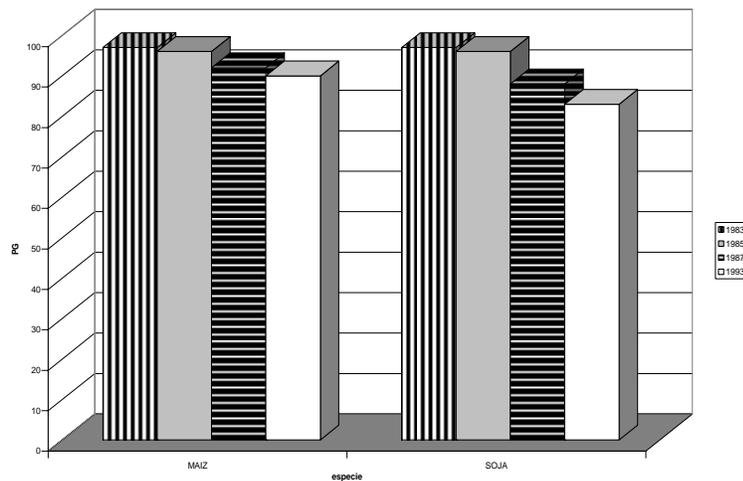


Figura 3. Germinación de maíz y soja conservados en la Base Jubany (Antártida Argentina) en distintos intervalos de monitoreo.

Las diferencias en longevidad de semilla entre especies se evidenciaron en las condiciones de Abra Pampa. Como fue sugerido por Spetch y otros (1998), a temperaturas inferiores a 0°C y con germinación inicial superior al 90% no serían necesarios monitoreos frecuentes en maíz y de acuerdo a esta evaluación lo mismo ocurriría en soja.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en estas evaluaciones son alentadores para la conservación de duplicados de semilla para conservación a largo plazo en estos sitios naturales considerando la economía realizada en energía y en

mantenimiento de instalaciones. Sin embargo se presentan inconvenientes para la accesibilidad a las muestras por la distancia a los sitios de conservación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Evjen, G.H. 2006. Seeds of the world to be conserved on Svalbard. Disponible en [http://\(www.odin.dep.no/lmd/english/news\)](http://www.odin.dep.no/lmd/english/news).

ISTA. 1993. International Seed Testing Association, Seed Sci. & Technol., 21, Supplement.

Specht, C.; Freytag, E.; Hammer, U.K and Börner, A. 1998. Survey of seed germinability after long-term storage in the Gatersleben genebank (part 2). Plant Genetic Resources Newsletter. N° 115:39-43.(www.odin.dep.no/lmd/english/news). Seeds of the world to be conserved on Svalbard, 30/05/06.

Comunicaciones

CULTIVO *IN SITU* DE PLANTAS MEDICINALES NATIVAS EN CHILE – UN NUEVO ENFOQUE PARA LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES DE TRADICIONAL RECOLECCIÓN

Vogel, H.¹;González, B.; San Martín, J.; Doll, U.; Razmilic, I.; Villalobos, P.

1. RESUMEN

El aumento de la demanda de plantas medicinales ha intensificado la explotación silvestre de plantas nativas y endémicas con prácticas de recolección no sustentables, las que, en algunos casos, las exponen al peligro de extinción. El cultivo *in situ* de las especies medicinales permitiría mantener la biodiversidad y variabilidad genética existente, al producir las plantas nativas en forma sustentable, en su hábitat natural. Ello frecuentemente se asocia a su efectividad medicinal, además de satisfacer la demanda de especies medicinales nativas, mejorar la calidad del producto seleccionando las partes vegetales que efectivamente se usan en la medicina, logrando obtener mayores precios y mantener la fuente de ingreso actual y futura para los recolectores. En proyectos en curso se busca estudiar la situación actual en el caso específico de la planta medicinal chilena bailahuén (*Haplopappus* sp.), con la finalidad de promover su aprovechamiento sustentable. Se está estudiando el mercado de la especie, identificando y caracterizando las poblaciones naturales existentes, además de estudiar la propagación *in situ* y *ex situ*, y capacitar y sensibilizar a recolectores junto a sus familias en el uso sostenible de los mismos.

Palabras claves: Recolección sustentable, plantas medicinales, bailahuén, cultivo *in situ*

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Situación actual de la recolección silvestre

Chile es un país rico en especies vegetales endémicas que durante siglos han sido utilizadas por los pueblos indígenas para fines medicinales. Algunas de ellas se conocen y exportan a todo el mundo, como son el caso del quillay y el boldo, mientras que otras sólo son utilizadas a nivel nacional. Su explotación se realiza a partir de plantas silvestres, actividad que amenaza la variabilidad natural e incluso puede mermar la existencia del recurso genético.

En el pasado, el abastecimiento de plantas medicinales se basó en la cosecha de plantas silvestres que crecen en su hábitat natural, lo que significaba la explotación de pequeñas cantidades de material vegetal sin afectar la existencia de las poblaciones naturales. El aumento de la población humana y la expansión del comercio, a través de canales nacionales e internacionales, han transformado esta práctica en una actividad que disminuye e incluso puede destruir las poblaciones naturales de especies medicinales nativas. En la recolección silvestre intensiva, además de disminuir la variabilidad genética, existe el peligro de afectar la calidad del material cosechado (Schneider, 1998).

2.2. Valorización económica de los bienes del ecosistema

En la sociedad actual, suele ser el mercado el que determina el valor de una gran cantidad de bienes y servicios y el que organiza en consecuencia su proceso de producción y distribución. Los ecosistemas, en este sentido, proporcionan una serie de funciones y bienes que, aunque poseen un valor indudable, carecen de precio al quedar enmarcadas bajo el concepto de externalidad, bien público o recurso común de libre acceso.

¹ Universidad de Talca, 2 Norte 685, Casilla 747, Talca, CHILE; hvogel@utalca.cl

La ausencia de precio se traduce en que, en una economía de mercado no intervenida, se tratan los bienes entregados por la naturaleza como carentes de valor, con la degradación ambiental correspondiente. Para evitar este deterioro, se ha visto la necesidad de determinar el valor económico de los bienes producidos por los ecosistemas y, de esa forma, poder comparar las ventajas y los inconvenientes de cualquier actividad económica que, produciendo un aumento de bienestar de la sociedad, provoca también un impacto ambiental negativo sobre ellas.

La explotación de las plantas medicinales nativas chilenas no es la excepción a esta regla, sino por el contrario, se observa, de manera habitual, como éstas son utilizadas de manera indiscriminada, lo que impide el uso sostenible del material vegetal. Por otra parte, el escaso valor monetario de la transacción en la comercialización del producto, hace que su explotación desincentive la conservación del recurso. De allí la importancia de poder analizar y describir las condiciones del mercado y la comercialización de las plantas medicinales nativas. Esto permitiría conocer los canales de comercialización, sus márgenes y el impacto económico en el grupo familiar que se dedica a la explotación de las especies.

2.3. Cultivo *in situ*

En Chile la regulación de la recolección de plantas silvestres es deficitaria. A esto se suma la inexistencia de registros de recolección y de un control de la extracción de material vegetal. Con la finalidad de conservar la variabilidad genética de las plantas medicinales nativas. El presente proyecto pretende estudiar la posibilidad del cultivo *in situ* de dos especies de uso medicinal de las Regiones VI y VII, creando así una base para extrapolar el modelo a otras especies vegetales y a otras regiones.

El cultivo *in situ* de las especies medicinales permitiría:

- Mantener la variabilidad genética existente, al producir las plantas nativas en forma sustentable.
- Producir las plantas en su hábitat natural, lo que frecuentemente se asocia a su efectividad medicinal.
- Satisfacer la demanda de especies medicinales nativas.
- Mejorar la calidad del producto (al poder seleccionar las partes vegetales que efectivamente se usan en la medicina) y con ello obtener mayores precios.
- Mantener la fuente de ingreso actual y futura para los recolectores.

2.4. El Caso de Bailahuén

El bailahuén goza de gran popularidad en la medicina herbácea de Chile debido a sus propiedades coleréticas y colagogas (Muñoz *et al.*, 2001). La hierba se ingiere como estimulante de digestión, en casos de indigestión o trastornos hepáticos. El nombre bailahuén generalmente es asignado a la especie botánica *Haplopappus baylahuen*, (Montes *et al.*, 1984) de la familia Asteraceae, que habita la alta Cordillera entre las Regiones III y IV. Sin embargo, en estudios recientes (Vogel *et al.*, 2005a) fue posible establecer que según la región, se comercializan diferentes especies bajo la denominación de bailahuén, entre ellas *H. multifolius*, *H. remyanus* y *H. taeda*. Esta última especie corresponde al bailahuén recolectado en las VI y VII regiones. El mismo estudio mostró que esta especie presenta una mayor actividad antioxidante que *H. baylahuen*, además de perfiles químicos diferentes.

La recolección silvestre de esta especie, realizada en pequeña y gran escala, ha disminuido la población natural a tal punto, que actualmente sólo crece en lugares de difícil acceso de la alta Cordillera. Su regeneración natural es fuertemente restringida debido al pastoreo. A pesar de que la mayoría de las semillas son vanas, estudios de propagación han mostrado que las semillas viables germinan sin mayor dificultad (Vogel *et al.*, 2005b). También se ha observado que al cosechar gran parte de la planta, ésta termina por secarse. Aunque se logró exitosamente su cultivo *ex situ* en la VII Región, la recolección silvestre seguirá siendo, al menos en el corto plazo, la principal fuente de bailahuén. Esto debido a que el recolector considera gratuitos los recursos naturales, al no pagar por ellos.

En ensayos de domesticación se determinó la forma de propagación del bailahuén y la respuesta de las diferentes especies a condiciones de cultivo (Vogel *et al.*, 2005b). Sin embargo, las plantas que crecen en su hábitat natural exudan más resina que las plantas cultivadas *ex situ*.

2.5. Domesticación

La domesticación de especies medicinales silvestres busca seleccionar el o los genotipos superiores, para cultivarlos en condiciones ambientales apropiadas. De esta manera, se dispone de un material genético de alta calidad y homogeneidad, según las exigencias de la industria farmacéutica. Su cultivo reduce además la presión sobre las poblaciones naturales existentes y permite producir las cantidades de materia prima demandadas, sin afectar la composición genética de las poblaciones silvestres y evitando la intervención de los ecosistemas.

En contraposición, la domesticación y el cultivo ofrecen una materia prima de mayor costo que la procedente de recolección silvestre, cuya producción no implica costos de plantación, ni de manejo del material vegetal. Por ello, la recolección de plantas silvestres con fines comerciales seguirá siendo también en el futuro una alternativa de producción para la población rural, que vive utilizando y comercializando estos recursos.

2.6. Proyecciones

Se sugiere como estrategia de conservación de la variabilidad genética, la producción sustentable de los recursos genéticos *in situ*, cultivando y manejando las plantas silvestres en su hábitat natural o en las cercanías del mismo (Proyecto FIA-PI-C-2004-1-A-94). Para conservar la distribución geográfica natural de diferentes ecotipos o especies, el material genético solamente debe ser cultivado en los mismos sitios de origen.

Junto con la conservación de las especies que tradicionalmente han sido usadas con fines medicinales, también se lograría salvaguardar el conocimiento sobre el uso tradicional de estas plantas.

Cabe mencionar que la producción *in situ* no satisfecerá plenamente las exigencias de la industria farmacéutica que requiere material vegetal de alta homogeneidad. En este caso será importante establecer cultivos de material genético seleccionado, paralelamente a la explotación del recurso silvestre.

3. METODOLOGÍA

3.1. Objetivos

El proyecto FIA-PI-C-2004-1-A-94 en conjunto con el proyecto MHS-P-0422 buscan estudiar la situación actual y aumentar la sustentabilidad de la recolecta de bailahuén. Para ello se pretende estudiar y analizar el mercado de bailahuén; identificar y caracterizar las poblaciones silvestres; establecer métodos de propagación; mantener o aumentar las poblaciones naturales; identificar y cuantificar los marcadores y compuestos químicos; capacitar a recolectores y sus familias; sensibilizar la población y elaborar recomendaciones para la producción sustentable del recurso genético.

3.2. Asociaciones

Para lograr un mayor impacto se buscó la asociación con actores relacionados a la recolección silvestre. Así se obtuvo el apoyo de instituciones públicas como SAG (Servicio Agrícola y Ganadero) y CONAMA (Comisión Nacional del Medio Ambiente) de la VII Región, escuelas agrícolas de sectores rurales, una empresa exportadora y una empresa minera dueña de terrenos en los que habita la especie objetivo.

3.3. Estudio de mercado

En una primera etapa de diagnóstico inicial, se recolectará información y se entrevistarán distintos agentes de la cadena comercial. Estos datos se analizarán estableciendo canales y márgenes, oportunidades del mercado, así como nuevas alternativas de comercialización. Finalmente se desarrollará un plan de mercadotecnia.

Para calcular la rentabilidad económica de la utilización y producción *in situ* de plantas medicinales nativas, se realizará una encuesta económico-productiva a diversos recolectores. En base a los datos obtenidos se estimarán los costos directos y el ingreso bruto de la explotación, para calcular el margen bruto. Finalmente, se realizará una evaluación económica del cultivo *in situ*.

3.4. Estudio y caracterización de poblaciones silvestres

La ubicación de las poblaciones naturales de *H. baylahuen*, *H. multifolius* y *H. taeda*, se realizó en base a registros históricos de los herbarios más importantes de Chile (Universidad de Concepción y Museo Nacional de Historia Natural en Santiago). A esto se sumó la información obtenida de recolectores y lugareños que ayudó a complementar los datos históricos. Actualmente, existe un grado de avance importante en el estudio de poblaciones naturales de las tres especies. Sin embargo, los datos deben ser complementados durante la próxima temporada.

Las poblaciones en estudio serán identificadas taxonómicamente y muestreadas para su análisis químico y para la elaboración de estándares. Se estimará la densidad de población, su extensión y se registrará la vegetación acompañante. Se analizará la geografía del terreno, el suelo y se registrarán datos climáticos de la zona. Además se coleccionarán semillas para los estudios de propagación.

3.5. Monitoreo de poblaciones naturales

Las poblaciones se observarán en su medio natural en parcelas permanentes que concentran el mayor número de individuos. En las parcelas se identificarán 10 individuos al azar, registrando en primavera, verano y principios de otoño el desarrollo de las diferentes fenofases y se registrarán datos de ramificación, número de vástagos, número de hojas, longitud de cinco vástagos por planta, número de flores y, en lo posible, rendimiento de frutos o semillas. El número de individuos iniciales se utilizará para determinar la respuesta a la práctica extractiva de recolección y crecimiento y/o persistencia de la población, en base al número de individuos contabilizados al tercer año.

3.6. Ensayos de propagación por semilla (*H. taeda*)

Para la especie *H. taeda* se iniciarán los primeros ensayos de cultivo *in situ*. Para ello se determinarán las condiciones que aseguren el mayor porcentaje de germinación.

En primer lugar, las semillas se someterán a germinación espontánea *ex situ*. Una vez establecida la metodología, se evaluará la germinación de semillas *in situ* en parcelas que corresponden al hábitat específico de la especie. Para estos ensayos se elegirán preferentemente parcelas vigiladas por lugareños y protegidas del pastoreo. Se evaluarán cubiertas de protección contra condiciones climáticas adversas y herbívoros y dos épocas de siembra: otoño y primavera. Una siembra otoñal podría ser beneficiosa si las especies requieren de frío para germinar, mientras que las bajas temperaturas podrían perjudicar el desarrollo de las plántulas.

4. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero de la Universidad de Talca, la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y la Manfred-Hermesen-Stiftung, Bremen (Alemania).

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Montes, M. y Wilkomirsky, T. 1987. Medicina Tradicional Chilena. Editorial de la Universidad de Concepción: 74.

Muñoz, O.; Montes, M. y Wilkomirsky, T. 2001. Plantas medicinales de uso en Chile-Química y farmacología. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.

Schneider, E. 1998. Kultur am Wildstandort-eine Möglichkeit zum Schutz wildwachsender Arzneipflanzen. Drogenreport 20: 20-22.

Vogel, H.; González, M.; Faini, F.; Razmilic, I.; Rodríguez, J.; San Martín, J. and Urbina, F. 2005a. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus*-species known as bailahuén. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 97-100.

Vogel, H.; Razmilic, I.; San Martín, J.; Doll, U. y González, B. 2005b. *Plantas medicinales chilenas-Experiencias de domesticación y cultivo de boldo, matico, bailahuén, canelo, peumo y maqui*. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. 192 p.

REPATRIACIÓN Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE GERMOPLASMA DE MANI (*Arachis hypogaea* L.) EN PARAGUAY.

Paniagua, M.S.¹; Bogado, E.A.²

1. RESUMEN

El Paraguay integra el centro de origen y diversidad del maní cultivado (*Arachis hypogaea* L.). Por ello, en los años 1994 y 1996, se realizaron dos misiones de colecta en varios departamentos, en ambas regiones del País (Oriental y Occidental). El resultado de estas colectas fue la obtención de 87 entradas de variedades nativas de maní que fueron conservadas en el Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA), de Capitán Miranda.

Ante el riesgo de la pérdida total de la colección en el año 2002 fue suscrito un acuerdo con el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), con el objetivo de regenerar y caracterizar morfológicamente todas las muestras, conjuntamente con las repatriadas del Banco de Germoplasma de USDA. La otra medida tomada para salvaguardar la colección consistió en depositar un duplicado de seguridad de toda la colección en el Banco de Germoplasma de USDA.

La caracterización taxonómica de especies y variedades botánicas de *Arachis hypogaea* se basó en la metodología empleada por Krapovickas y Pietrarelli*, en trabajos de caracterización de los maníes nativos de Ecuador, Bolivia y Perú. Utilizándose también otras características típicas de las razas, tales como color de la semilla, forma de vaina, aspecto de planta, etc. Los datos de caracterización fueron tomados conforme al manual United State Peanut Descriptors, (Roy, N., Pittman, *ed.*1995). El estudio tuvo por objetivos a) el documentar la información de pasaporte y caracterización agromorfológica de los materiales y b) obtener un stock de semilla con alta viabilidad y suficiente cantidad para su preservación *ex situ* en el CRIA y el envío de un duplicado de seguridad en el Banco de Germoplasma de USDA.

Palabras Claves: Maní, germoplasma, caracterización, preservación, viabilidad.

2. INTRODUCCIÓN

El Paraguay forma parte del centro de diversidad genética de maní cultivado, *Arachis hypogaea* L., junto a otros países de la región, como Argentina, Brasil y Bolivia. Es un cultivo muy difundido y apreciado entre los agricultores que practican la agricultura de subsistencia, por razones culturales, por su amplia adaptación a las condiciones edafo-climatológicas y por su alto valor nutricional en la dieta básica de la alimentación. A pesar de las razones mencionadas precedentemente, la introducción de germoplasmas foráneo está causando el desplazamiento y consecuente pérdida de muchos de estos materiales nativos.

Ello motivó a que en el año 1994 y 1996, en el marco de una actividad conjunta, expertos japoneses y técnicos paraguayos desarrollaron un proyecto de colecta de 88 entradas de maní de diferentes regiones del país, (Paniagua *et al.*, 1994), las cuales fueron almacenadas en el Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA), para su preservación. En el año 2002 fue suscrito un acuerdo entre el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) y el CRIA, para la regeneración y la caracterización de todos estos materiales y otros que fueron repatriados del banco de germoplasma de los Estados Unidos de América.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad de regeneración y caracterización de la colección de maní se desarrolló en la parcela experimental del CRIA, ubicado en Capitán Miranda a una Latitud de 27°17' Sur, Longitud 55° 49' Oeste y Altitud de 200msnm. La precipitación media anual en esta localidad es de 1706,7mm y el clima es Subtropical.

¹Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA), Capitán Miranda Ruta VI- Km. 16 cria@cria.org.py

² Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA), Capitán Miranda Ruta VI-Km. 16 egon38@gmail.com

* Metodología sugerida por el Dr. David Williams del USDA, para el trabajo de caracterización Taxonómica de Maní, realizada en el CRIA en el año 2002.

El suelo es de origen básaltico, corresponde al orden de los alfisoles y de textura franco-arcillosa y arcillosa con buena estructuración que favorece una buena aireación y capacidad de retención de agua. Posee un pH levemente ácido a neutro y buena provisión e bases intercambiables.

Para la caracterización se sembraron 110 entradas de los cuales 87 corresponden a los colectados en el país en los años 1994/96 y 23 a los repatriados del banco de maní del USDA, (Griffin, Georgia, EEUU). La caracterización taxonómica de especies y variedades botánicas de *Arachis hypogaea* se basó en la metodología empleada por Krapovickas y Pietrarelli en trabajos de caracterización de los maníes nativos de Ecuador, Bolivia y Perú, (Krapovickas y Gregory, 1994), utilizándose también otras características típicas de las razas, tales como color de la semilla, forma de vaina, aspecto de planta, etc.

La siembra se realizó los días 13 y 14 de noviembre del 2002, empezando por la subespecie *hypogaea*, seguido por las subespecies *fastigiata* y *vulgaris*, de modo de facilitar la comparación entre materiales semejantes, así como la detección de materiales únicos en el momento de observar las plantas y aplicar los descriptores.

El tamaño de cada parcela fue de 4 surcos, de 5m de largo. La distancia entre surcos fue 0,90m de modo a reducir los posibles cruzamientos entre accesiones y permitir un buen desarrollo de las plantas para su caracterización morfológica. La densidad de siembra para las accesiones correspondientes a la subespecie *hypogaea* fue de 6 semillas por metro lineal ($6 \times 5 \times 4 = 120$ semillas) y para las subespecies *fastigiata* y *vulgaris* 12 semillas por metro lineal ($12 \times 5 \times 4 = 240$ semillas).

Debido a las fuertes lluvias ocurridas posterior a la siembra un total de 28 entradas fueron resembradas. Respecto a las prácticas culturales se realizaron tres carpidas con aporques y tres aplicaciones de insecticidas para controlar el ataque de insectos dentro de la parcela. La cosecha se realizó cuando las vainas alcanzaron la madurez fisiológica, en forma manual en el período del 25/03/03 al 02/05/03. Se cosecharon las cuatro hileras y no las dos centrales como estaba previsto, debido a que algunas accesiones tuvieron pocas plantas establecidas y se vio que la presencia de insectos polinizadores (abejas) fue nulo. Una vez arrancadas las vainas de la planta y depositadas en una bandeja se procedió al lavado de las mismas de modo de eliminar la tierra y cuerpos extraños que pudieran contener. Finalizado los estudios de caracterización de las vainas y semillas todas las accesiones fueron almacenadas en bolsitas de tela, en forma duplicada, una que se envió al banco de germoplasma de USDA y otra que permanece en el CRIA, para su preservación.

Para la caracterización de los materiales fue utilizado el manual del USDA, United States Peanut Descriptors, 1995. Los descriptores utilizados fueron: altura del eje central., longitud y ancho del folíolo del eje central, longitud y ancho del folíolo de la rama lateral, longitud y ancho del fruto (vainas) y longitud y ancho de la semilla.

4. RESULTADOS

En el **cuadro 1** se presenta el stock de semilla de germoplasma de maní, con alta viabilidad y en cantidades suficientes, para su preservación *ex situ* en el banco de germoplasma de CRIA y un duplicado de seguridad conservado en el USDA. Se dispone de los materiales y la documentación correspondiente para su utilización y aprovechamiento en el país.

CUADRO 1. Accesiones de maní regeneradas en el Paraguay.2002/03

ACCESIONES	Enviado a USDA kg en el 2003	Disponible en CRIA kg en el 2005 (1)
PY94- 128	0,950	0,99
PY96- 2	0,950	0,155
PY96- 9	0,900	0,195
PY96- 12	1,000	0,295
PY96- 27	0,950	0,300
PY96- 29	0,900	0,299
US- 341103	0,800	0,186
US- 162882	0,800	0,207
US- 162883	1,000	0,495
PY94- 140	1,000	0,360
PY96- 57	0,950	0,296
PY96- 19	0,900	0,186
PY94- 120	-----	0,20
PY94- 106	0,800	0,294
US- 119877	0,800	0,162
US- 337372	1,000	0,645
US- 337376	0,900	0,246
PY94- 22	0,900	0,173
PY94- 24	0,900	0,224
PY94- 27	0,950	0,376
PY94- 31	0,400	0,152
PY94- 36	0,900	0,99
PY94- 39	0,800	0,120
PY94- 49	NO GERMINO	-----
PY94- 105	0,950	0,210
PY94- 107	0,850	0,217
PY94- 108	0,750	0,128
PY94- 118	0,750	0,88
PY94- 119	0,850	0,136
PY94- 138	0,950	0,683
PY94- 141	0,800	0,177
PY94- 145	0,800	0,260
PY94- 149	0,950	0,156
PY94- 151	0,700	0,194
PY94- 156	0,900	0,175
PY94- 163	0,950	0,764
PY94- 168	0,900	NO GERMINO
PY96- 41	0,400	0,139
PY96- 42	0,500	0,268
PY96- 58	0,950	0,164
PY96- 49	0,950	0,348
US- 261940	1,000	0,782
US- 262024	1,000	0,434
PY94- 1	0,950	0,252
PY94- 4	1,000	0,416
PY94- 8	0,900	0,176
PY94- 11	1,000	0,354
PY94- 12	1,000	0,150
PY94- 35	NO GERMINO	----
PY94- 42	0,950	0,389
PY94- 43	0,400	0,62
PY94- 45	0,900	0,200
PY94- 110	NO GERMINO	-----
PY94- 123	0,800	0,167
PY94- 129	0,850	0,145
PY96- 32	1,000	0,205
PY96- 35	0,900	0,198
PY96- 37	0,950	0,364
PY96- 39	0,850	0,235
PY96- 63	1,000	0,262
US- 261943	1,000	0,176

US- 261995	0,500	0,175
US- 261970	0,900	0,128
PY94- 109	0,650	0,376
PY94- 113	1,100	0,153
PY94- 114	0,600	0,144
PY94- 166	1,000	0,416
PY96- 22	0,850	0,179
PY96- 52	-----	0,276
US- 261955	1,100	0,303
US- 262013	0,800	0,142
US- 261934	0,850	0,190
US- 261949	0,900	0,220
PY94- 15	0,950	0,252
PY94- 18	1,100	0,92
PY94- 20	0,900	0,186
PY94- 44	0,650	0,176
PY94- 155	0,600	0,153
PY94- 159	0,600	0,94
PY94- 122	0,600	0,176
PY96- 23	-----	0,239
PY96- 44	0,400	0,211
PY96- 47	0,850	0,267
PY96- 55	1,000	0,119
US- 121493	0,900	0,90
US- 261977	0,450	0,64
PY94- 25	0,400	0,87
PY94- 154	0,700	0,94
PY94- 167	0,650	0,181
US- 261952	0,700	0,241
US- 261966	0,950	0,252
US- 261964	0,750	0,156
US- 261965	0,800	0,205
PY94- 104	0,450	0,148
PY94- 111	0,800	0,178
PY94- 112	0,750	0,151
PY94- 115	1,000	0,292
PY94- 116	0,850	0,199
PY94- 117	0,450	0,111
PY94- 121	0,950	0,199
PY94- 124	0,950	0,296
PY94- 125	1,000	0,249
PY94- 126	0,950	0,390
PY94- 127	0,850	0,239
PY94- 130	0,900	0,265
PY94- 131	0,500	0,178
PY94- 132	0,850	0,198
PY94- 133	-----	0,228
US- 119922	0,500	0,158
US- 261935	0,800	0,177
TOTAL	85,55	32,35

(1) semilla disponible antes de la cosecha de año 2006.

(2) (*)Observación: todas las accesiones se encuentran en etapa de rejuvenecimiento de semilla a nivel de campo (ciclo 2005/06 del cultivo de mani).La sección leguminosas de consumo del CRIA actualmente tiene sembrado, toda la colección (un total de 137 materiales). Forma de siembra: 3 hileras de 2m de largo.

La siembra se realizó en el mes de noviembre de 2005 y la cosecha se realizará de abril a junio del 2006.

El promedio de disponibilidad de semilla de la colección de mani del CRIA; cosechada en el 2006 será de 1 kg con cáscara por cada accesión.

En los **cuadros 2 y 3** se detalla la caracterización agromorfológica y datos de pasaporte de los materiales regenerados.

Numero de la colección	Subespecie y variedad	Habito de crecimiento	Tamaño de la planta	Tallo principal 60 a los 90 días	Tallo principal tomado a la cosecha	Flores sobre el eje principal	Color de la hoja	Pigmentación del tallo	Madurez	Forma de la vaina	Construcción de la vaina	Reticulación de la vaina	Número de semillas por vaina	Peso de la vaina	Tipo de vaina	Patrón del color de la semilla	Color de la semilla	Peso de la semilla	Altura de eje central	Longitud de foliolo del eje central	Ancho de foliolo del eje central	Longitud de la rama lateral	Ancho de foliolo de la rama lateral	Longitud de la vaina	Ancho de la vaina	Longitud de la semilla	Ancho de la semilla
PY 94- 42	Fastigiata	4	3	1	1	2	3	1 - 2	134	2	1	2	3 - 2 - 1 - 4	87.81		2	5	32.16	61.01	7.9	4.0	7.4	4.2	2.4	1.1	1.2	0.8
PY 94- 43	Fastigiata	4	3	2	1	2	3	2	134	2	1	2	4 - 3 - 2 - 1	232.41		2	5	49.32	45.62	9.4	4.7	8.6	4.3	4.0	1.4	1.5	0.9
PY 94- 45	Fastigiata	4	4	3	3	2	3	2	134	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	201.26		2	5	52.64	69.32	9.3	4.4	8.1	4.3	3.7	1.4	1.6	0.9
PY 94- 110																											
PY 94- 123	Fastigiata	4	3	3	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	163.49		2	5 - 2	42.08	64.73	8.4	4.1	7.2	3.9	3.3	1.3	1.5	0.8
PY 94- 129	Fastigiata	5	3	3	3	2	2	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	236.21		2	5	54.14	68.02	7.9	3.7	7.3	3.7	3.4	1.5	1.5	0.9
PY 96- 32	Fastigiata	4	4	3	3	2	2	2	137	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	217.37		2	5	49.86	69.21	8.9	4.0	7.5	3.9	3.5	1.5	1.5	0.9
PY 96- 35	Fastigiata	4	4	3	3	2	2	2	137	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	245.47		2	5	56.76	72.25	7.9	3.8	7.6	3.6	3.9	1.6	1.5	1.0
PY 96- 37	Fastigiata	4	4	2	2	2	3	2	137	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	174.89		2	4	40.99	65.23	8.1	3.8	7.5	3.7	3.7	1.3	1.4	0.8
PY 96- 39	Fastigiata	5	4	1	3	2	2	2	137	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	209.13		2	5	53.26	66.33	9.3	4.2	8.1	4.0	4.1	1.5	1.5	0.9
PY 96- 63	Fastigiata	4	3	2	2	2	2	2	137	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	245.79		2	2 - 4	60.44	64.05	7.6	3.5	7.2	3.5	4.1	1.6	1.7	1.0
US- 261943	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	1	137	1	2	2	2 - 1	94.11		2	5	35.52	55.72	8.1	3.9	7.8	4.1	2.6	1.1	1.4	0.7
US- 261995	Fastigiata	5	4	1	3	2	2	1 - 2	137	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	138.86		2	5	36.32	62.70	8.2	3.9	7.7	3.8	3.2	1.1	1.4	0.8
US- 261970	Fastigiata	4	4	2	3	2	3	2	137	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	154.73		2	6 - 7	39.32	70.22	9.0	4.0	8.4	3.9	3.5	1.3	1.4	0.9
PY 94- 109	Vulgaris	1 - 4	2	1 - 3	3	1 - 2	2	1 - 2	137	1	1	2	2 - 1	92.72		2	2	48.88	27.52	6.5	3.3	6.0	3.2	2.6	1.1	1.4	0.9
PY 94- 113	Fastigiata	4	4	2	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	210.14		2	2 - 4	57.55	67.01	9.3	4.4	8.5	4.1	4.0	1.4	1.7	0.9
PY 94- 114	Fastigiata	4	4	1	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	164.05		2	2 - 4	40.91	54.06	8.1	4.1	7.6	4.2	3.4	1.3	1.5	0.8
PY 94- 166	Fastigiata	4	4	3	3	2	2	2	137	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	166.31		2	2	41.32	69.41	8.6	3.8	7.3	3.5	3.3	1.2	1.4	0.8
PY 96- 22	Fastigiata	5	3	1	1	2	2	1	137	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	153.42		2	2 - 4	42.64	58.20	8.5	4.0	7.6	4.1	3.9	1.3	1.3	0.8
PY 96- 52	Hypogaea	1	1	2	1	1	3	2	168	4	2	2	2 - 1	274.87		2	2	107.44	24.05	7.3	3.5	5.9	3.7	3.4	1.4	1.8	1.2
US- 261955	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	1	135	1	2	2	2 - 1	95.78		2	2	35.36	46.91	7.6	4.1	6.7	3.7	2.5	1.0	1.3	0.8
US- 262013	Fastigiata	4	4	2	3	2	2	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	137.11		2	2	34.23	50.22	9.7	4.8	8.7	4.7	3.4	1.1	1.4	0.8
US- 261934	Fastigiata	5	4	2	3	2	2	2	139	2	1	2	3 - 2 - 1	100.03		2	2	31.44	63.10	8.9	4.2	7.8	3.9	2.7	1.1	1.3	0.8
US- 261949	Vulgaris	4	3	1	3	2	2	1	139	1	2	2	2 - 1	140.91		2	2	51.76	51.02	9.1	4.7	8.2	4.4	2.9	1.2	1.5	0.9
PY 94- 15	Vulgaris	4	4	2	3	2	2	1	137	1	1	2	2 - 1	91.86		2	2	36.16	59.11	8.6	4.4	7.5	3.9	2.4	1.1	1.3	0.8
PY 94- 18	Fastigiata	4	4	3	3	2	3	2	137	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	221.63		2	2	53.30	68.43	9.2	4.2	8.0	3.8	3.6	1.6	1.5	0.9
PY 94- 20	Fastigiata	4	4	3	3	2	3	2	137	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	205.65		2	2	52.27	71.83	10.3	5.0	9.2	4.4	3.8	1.6	1.5	0.9
PY 94- 44	Fastigiata	4	4	3	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	255.69		2	2 - 3	57.14	65.90	9.6	4.3	9.1	4.3	3.9	1.6	1.5	0.9
PY 94- 155	Fastigiata	5	3	2	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 2 - 1 - 4	154.02		2	4 - 2	41.40	55.31	8.7	4.0	7.9	3.8	3.2	1.2	1.5	0.8
PY 94- 159	Fastigiata	4	4	1	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	183.45		2	2	44.42	59.62	9.3	4.4	8.6	4.2	3.5	1.3	1.5	0.9
PY 94- 122	Vulgaris	4	3	2	3	2	3	1 - 2	139	1	2	2	2 - 1 - 3	127.65		2	4	47.46	61.31	8.7	4.4	8.0	4.2	2.7	1.2	1.4	0.9
PY 96- 23	Fastigiata	4	3	1	1	2	3	2	135	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	140.05		2	4	42.26	55.40	8.5	4.3	8.1	4.3	3.3	1.5	1.5	0.8
PY 96- 44	Hypogaea	1	1	1	1	1	3	2	171	4	2	3	2 - 1 - 3	278.83		2	2	94.12	22.52	6.7	3.4	5.3	3.6	3.6	1.4	1.8	1.1
PY 96- 47	Hypogaea	1	1	1	1	1	3	2	171	4	2	3	2 - 1 - 3	271.14		2	4	93.76	28.13	8.6	3.7	6.3	3.6	3.7	1.5	1.8	1.1
PY 96- 55	Fastigiata	4	4	3	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 4 - 1	200.01		2	4	48.51	69.31	9.1	4.4	8.4	4.0	3.5	1.5	1.4	0.9
US- 121493	Fastigiata	5	4	3	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	160.12		2	4	39.15	58.88	8.2	3.8	7.1	3.6	3.4	1.3	1.3	0.8
US- 261977	Fastigiata	4	4	3	3	2	3	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4	149.10		2	4	39.99	59.11	9.3	4.3	7.4	3.7	3.4	1.3	1.3	0.8
PY 94- 25	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	1	139	1	2	2	2 - 1	90.92		2	5	36.82	49.75	8.9	4.2	7.3	3.8	2.3	1.1	1.2	0.8
PY 94- 154	Vulgaris	5	3	1	3	2	2	1	139	1	2	2	2 - 1	95.24		2	6	35.46	54.82	9.2	4.7	8.0	4.5	2.5	1.0	1.3	0.9
PY 94- 167	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	1	139	1	2	2	2 - 1	92.61		2	6	36.00	53.16	8.5	3.9	7.3	3.9	2.7	1.1	1.3	0.8
US- 261952	Fastigiata	5	4	3	3	2	2	2	139	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	122.30		2	5	36.68	58.83	8.5	4.1	7.7	4.1	3.1	1.1	1.4	0.8
US- 261966	Vulgaris	5	3	3	3	2	2	1	139	1	2	2	2 - 1	81.21		2	5	32.96	50.22	8.8	4.3	7.4	4.0	2.5	0.9	1.3	0.7
US- 261964	Fastigiata	5	3	1	1	2	2	2	135	2	1	2	3 - 4 - 2 - 1	107.15		2	5	31.12	49.41	8.1	3.8	7.0	3.2	3.3	1.1	1.2	0.8
US- 261965	Vulgaris	4	3	3	3	2	4	1	139	1	2	2	2 - 1	105.70		2	5	39.80	77.90	9.8	4.8	8.5	4.5	2.4	1.1	1.3	0.8
PY 94- 104	Vulgaris	5	3	2	3	2	2	1	139	1	2	2	2 - 1	110.01		2	2	40.18	47.42	8.5	4.4	7.3	4.2	2.5	1.1	1.3	0.9
PY 94- 111	Vulgaris	5	3	2	3	2	2	1	139	1	2	2	2 - 1	107.09		2	2	39.12	54.66	8.1	4.3	7.1	4.0	2.6	1.1	1.2	0.8
PY 94- 112	Vulgaris	5	3	1	3	2	2	1	140	1	2	2	2 - 1	94.96		2	2	38.88	53.35	8.2	4.2	7.1	3.9	2.6	1.1	1.3	0.8
PY 94- 115	Vulgaris	5	4	1	3	2	2	1	135	1	2	2	2 - 1	141.46		2	2	51.86	63.92	8.9	4.6	7.9	4.2	2.9	1.3	1.4	0.9

Numero de la colección	Subespecie y variedad	Habito de crecimiento	Tamaño de la planta	Tallo principal 60 a los 90 días	Tallo principal tomado a la cosecha	Flores sobre el eje principal	Color de la hoja	Pigmentación del tallo	Madurez	Forma de la vaina	Constricción de la vaina	Reticulación de la vaina	Número de semillas par vaina	Peso de la vaina	Tipo de vaina	Patrón del color de la semilla	Color de la semilla	Peso de la semilla	Altura de eje central	Longitud de foliolo del eje central	Ancho de foliolo del eje central	Longitud de la rama lateral	Ancho de foliolo de la rama lateral	Longitud de la vaina	Ancho de la vaina	Longitud de la semilla	Ancho de la semilla
PY 94- 116	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	1	140	1	2	2	2 - 1	105.76		2	2	41.20	59.61	8.3	4.2	7.2	3.9	2.5	1.1	1.3	0.9
PY 94- 117	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	1	140	1	2	2	2 - 1	92.48		2	2	34.94	51.80	8.6	4.5	7.0	3.9	2.2	1.1	1.2	0.9
PY 94- 121	Vulgaris	4	4	2	3	2	2	1	135	1	2	2	2 - 1	102.14		2	2	38.56	59.86	8.5	4.2	7.5	4.1	2.3	1.2	1.3	0.9
PY 94- 124	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	1	135	1	2	2	2 - 1	101.52		2	2	41.02	55.61	8.3	4.2	7.5	4.0	2.7	1.2	1.4	0.9
PY 94- 125	Vulgaris	4	4	2	3	2	2	1	135	1	2	2	2 - 1	107.28		2	2	42.48	64.01	8.9	4.7	7.9	4.1	2.4	1.1	1.3	0.8
PY 94- 126	Vulgaris	4	4	1	3	2	2	2	135	1	2	2	2 - 1	110.33		2	2	40.26	63.40	8.3	4.2	7.7	4.2	2.5	1.1	1.4	0.8
PY 94- 127	Vulgaris	4	4	1	3	2	2	2	135	1	2	2	2 - 1	101.73		2	2	39.31	53.91	8.4	4.2	7.9	4.2	2.5	1.1	1.4	0.9
PY 94- 130	Vulgaris	4	4	1	3	2	2	2	135	1	2	2	2 - 1	104.19		2	2	40.28	53.22	8.4	4.3	7.8	4.2	2.6	1.1	1.3	0.9
PY 94- 131	Vulgaris	4	3	1	3	2	2	2	135	1	2	2	2 - 1	96.78		2	2 - 5	39.96	47.93	8.3	4.2	7.6	3.7	2.5	1.1	1.4	0.9
PY 94- 132	Vulgaris	5	3	1	1	2	2	2	140	1	2	2	2 - 1	97.56		2	2	40.18	50.00	8.0	4.1	7.9	3.8	2.5	1.1	1.4	0.8
PY 94- 133	Vulgaris	5	3	1	3	2	2	2	140	1	2	2	2 - 1	140.01		2	2	57.59	49.66	8.6	4.4	8.4	4.5	3.1	1.5	1.6	0.9
US- 119922	Fastigiata	5	4	1	3	2	3	2	135	2	1	2	3 - 2 - 4 - 1	124.46		2	2	40.64	54.08	9.6	4.5	9.0	4.6	2.5	1.1	1.4	0.8
US- 261935	Fastigiata	5	3	1	1	2	2	2	135	2	1	2	3 - 2 - 1 - 4	97.27		2	2	32.22	55.71	8.2	3.6	7.1	3.4	3.1	1.1	1.3	0.8

Cuadro3. Datos de pasaporte de los materiales regenerados.

Collector ID	Date	Taxon	Local Name (Accession Name)	Improvement Status	Form Received	Source Type	Country	State	Locality
PY94-1	28. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi' i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Itapúa	Palmito
PY94-4	28. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi hu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Itapúa	Palmito
PY94-8	28. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi hu guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Itapúa	Taruma
PY94-11	28. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi mbocaja	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Itapúa	Taruma
PY94-12	28. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Itapúa	San Roque González
PY94-15	28. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi moroti	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Itapúa	San Roque González
PY94-18	04. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Antejo
PY94-20	04. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Ka' a Karapa
PY94-22	04. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	San Francisco
PY94-24	04. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Colonia Jerovia
PY94-25	04. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Colonia Jerovia
PY94-27	04. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Nu Pyahu
PY94-31	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Caazapá
PY94-35	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toranzo II / Tava'i
PY94-36	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toranzo II / Tava'i
PY94-39	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toranzo II - 1a Linea Tava'i
PY94-42	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toranzo I / Tava'i
PY94-43	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toranzo I / Tava'i
PY94-44	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi moroti guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toranzo I / Tava'i
PY94-45	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toro Blanco Guasu
PY94-49	05. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caazapá	Toro Blanco' i
PY94-137	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Y'aka San Jose de los Arroyos
PY94-138	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Hector L. Vega Ybycui
PY94-140	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Hector L. Vega Ybycui
PY94-141	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Hector L. Vega Ybycui
PY94-145	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Hector L. Vega Ybycui
PY94-149	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Colonia Solano Escobar / Ybytymi
PY94-151	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Colonia Solano Escobar / La Colmena
PY94-154	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi hu'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Costa Báez Ka' a guy/ Acahay
PY94-155	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta'i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Costa Báez Ka' a guy/ Acahay
PY94-156	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Costa Báez Ka' a guy/ Acahay
PY94-159	07. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Minas Cué / Ybycui
PY94-163	08. Abr	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Paraguarí	Boquerón / Mbuyapey
PY94-104	06. Abr	Arachis hypogaea	711	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-105	06. Abr	Arachis hypogaea	Tatú IAC Campinas	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-106	06. Abr	Arachis hypogaea	717	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-107	06. Abr	Arachis hypogaea	708	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-108	06. Abr	Arachis hypogaea	HP 13 mM EPACE -- Goia	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-109	06. Abr	Arachis hypogaea	713	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-110	06. Abr	Arachis hypogaea	Ticao IAPAR Paraná	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-111	06. Abr	Arachis hypogaea	828	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-112	06. Abr	Arachis hypogaea	709	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-113	06. Abr	Arachis hypogaea	I 38 / 85 Chapeco Santa Catalina	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-114	06. Abr	Arachis hypogaea	Tatu' i IAC	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-115	06. Abr	Arachis hypogaea	830	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-116	06. Abr	Arachis hypogaea	810	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-117	06. Abr	Arachis hypogaea	826	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré

Collector ID	Latitude minutes	Longitude degrees	Longitude minutes	Description	Cooperator 1	Cooperator 2	Cooperator 3	Cooperator 4
PY94-1		55° 35' W		Seeds purple, more than two per pod.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-4		55° 35' W		Seeds purple, two to three per pod.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-8		56° 00' W		Seeds purple, three to four per pod.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-11		56° 00' W		Seeds purple, usually three per pod.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-12		56° 00' W		Seeds purple, usually three per pod.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-15		56° 00' W		Seeds cream colored, three to four per pod.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-18		56° 00' W		Seeds cream colored.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-20		56° 12' W		Mixture; some seeds cream.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-22		56° 12' W		Mixture; some seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-24		56° 12' W		Seeds red, three to four per pod.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-25		56° 12' W		Seeds black, small.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-27		55° 55' W		Mixture; some seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-31		56° 20' W		Mixture; some seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-35		55° 28' W		Mixture; some seeds black.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-36		55° 28' W		Mixture; some seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-39		55° 28' W		Mixture; some seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-42		55° 28' W		Seeds dark purple.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-43		55° 28' W		Seeds dark purple, large.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-44		55° 28' W		Mixture, seeds large, some seeds cream.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-45		55° 45' W		Seeds light purple, large.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-49		55° 45' W		Mixture; some seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-137		56° 41' W		Mixture; some seeds purple.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-138		56° 05' W		Seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-140		56° 05' W		Seeds light and dark purple, large.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-141		56° 05' W		Seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-145		56° 05' W		Seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-149		57° 02' W		Seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-151		57° 02' W		Seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-154		57° 07' W		Mixture; seeds dark purple.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-155		57° 07' W		Very mixed; seeds cream colored.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-156		57° 07' W		Mixture; seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-159		56° 59' W		Mixture; seeds cream colored.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-163		56° 41' W		Seeds red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-104		56° 35' W		Seeds light yellow rose(pink)	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-105		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-106		56° 35' W		Seeds light yellow rose(pink)	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-107		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-108		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-109		56° 35' W		Seeds light yellow rose(pink)	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-110		56° 35' W		Seeds dark purple	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-111		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-112		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-113		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-114		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-115		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-116		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-117		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka

Collector ID	Date	Taxon	Local Name (Accession Name)	Improvement Status	Form Received	Source Type	Country	State	Locality
PY94-118	06. Abr	Arachis hypogaea	705	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-119	06. Abr	Arachis hypogaea	Colorado	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-120	06. Abr	Arachis hypogaea	827	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-121	06. Abr	Arachis hypogaea	813	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-122	06. Abr	Arachis hypogaea	825	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-123	06. Abr	Arachis hypogaea	Negro Grande	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-124	06. Abr	Arachis hypogaea	Híbrido	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-125	06. Abr	Arachis hypogaea	870	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-126	06. Abr	Arachis hypogaea	702	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-127	06. Abr	Arachis hypogaea	806	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-128	06. Abr	Arachis hypogaea	712	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-129	06. Abr	Arachis hypogaea	Manteca	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-130	06. Abr	Arachis hypogaea	704	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-131	06. Abr	Arachis hypogaea	Español	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-132	06. Abr	Arachis hypogaea	Africano	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-133	06. Abr	Arachis hypogaea	820	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-166	06. Abr	Arachis hypogaea	Blanco Grande	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-167	06. Abr	Arachis hypogaea	Negrito	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré
PY94-168	06. Abr	Arachis hypogaea	710	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	San Pedro	Campo Experimental Choré

Collector ID	Latitude minutes	Longitude degrees	Longitude minutes	Description	Cooperator 1	Cooperator 2	Cooperator 3	Cooperator 4
PY94-118		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-119		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-120		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-121		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-122		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-123		56° 35' W		Seeds dark purple.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-124		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-125		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-126		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-127		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-128		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-129		56° 35' W		Seeds dark purple.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-130		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-131		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-132		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-133		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-166		56° 35' W		Seeds yellowish rose	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-167		56° 35' W		Seeds dark purple	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka
PY94-168		56° 35' W		Seeds dark red.	Paniagua, Manuel S.	Nakanishi, Tateo	Barboza, Victoriano	Komeichi, Michitaka

Collector ID	Date	Taxon	Local Name	Improvement Status	Form Received	Source Type	Country	State	Locality
PY96-2	06. Mar	Arachis hypogaea	makua	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Pte. Hayes	Samaria, 35 Km from Filadelfia. S. E.
PY96-9	07. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Pte. Hayes	Nueva Esperanza, 52 km from Filadelfia. S.E.
PY96-12	07. Mar	Arachis hypogaea	Smitcay	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Pte. Hayes	Betania, 35 Km from Filadelfia. S. E.
PY96-19	09. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Concepción	Lemo, 30 Km from Concepción. E.
PY96-22	09. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi moroti	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Concepción	Peguajo Loma, 35 km from Concepcion. E.
PY96-27	09. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi pyta' i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Concepción	Naranjaty, 60 Km. from Concepción. E.
PY96-29	09. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi pyta' i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Concepción	Laguna Mbojapy, 70 Km From Concepción. E.
PY96-32	11. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi hu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Guairá	Arroyo Guasu, 40 Km from Villarrica. E.
PY96-35	11. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi hu guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Guairá	Potrero del Carmen, 45 Km from Villarrica. E.
PY96-37	11. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Guairá	Sudetia, 50 km from Villarrica. E.
PY96-39	11. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi hu guasu	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Guairá	Sudetia, 50 km from Villarrica. E.
PY96-41	11. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Guairá	Campo Alegre, 70 Km from Villarrica. E.
PY96-44	11. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi ayaca	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Guairá	Cuarta Linea Sta. Maria, 70 Km from Villarrica. E.
PY96-47	12. Mar	Arachis hypogaea	Mnduvi aba	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Maitei, 55 km from Cnel. Oviedo, E.
PY96-49	12. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi pyta' i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Maitei, 55 km from Cnel. Oviedo, E.
PY96-52	12. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi aba moroti	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Guayaquicua, 58 Km from Cnel. Oviedo. E.
PY96-55	12. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi pyta' i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Juquyry, 68 Km from Cnel. Oviedo. E.
PY96-57	12. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi hu' i	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Carpa cue, San Joaquin, 115 km from Cnel. Oviedo. E.
PY96-58	12. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Carpa cue, San Joaquin, 115 km from Cnel. Oviedo. E.
PY96-63	12. Mar	Arachis hypogaea	Manduvi tres meses	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Caaguazú	Tacuapí i, 100 Km from Cnel. Oviedo. E.
PY96-42	11. Mar	Arachis hypogaea	Mnduvi pyta	Landrace	Seed	Collected	Paraguay	Guairá	Cuarta Linea Sta. Maria, Guairá, E.

Collector ID	Latitude degrees	Latitude minute	Longitude deg	Longitude	Description	General Narrati	Cooperator 1	Cooperator 2	Cooperator 3	Cooperator 4
PY96-2		22° 35' S	59° 40' W		Seeds small, red, mixed with light and dark purple.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-9		22° 35' S	59° 40' W		Seeds medium, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-12		22° 35' S	59° 40' W		Seeds small, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-19		23° 26' S	57° 26' W		Seeds medium, dark purple.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-22		23° 26' S	57° 26' W		Seeds medium, light pink.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-27		23° 26' S	57° 26' W		Seeds small, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-29		23° 26' S	57° 26' W		Seeds medium, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-32		25° 43' S	56° 15' W		Seeds medium, dark purple.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-35		25° 43' S	56° 15' W		Seeds medium, dark and light purple.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-37		25° 43' S	56° 15' W		Seeds medium, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-39		25° 43' S	56° 15' W		Seeds medium, dark purple.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-41		25° 43' S	56° 15' W		Seeds medium, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-44		25° 43' S	56° 15' W		Seeds large, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-47		25° 26' S	56° 26' W		Seeds large, dark red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-49		25° 26' S	56° 26' W		Seeds mixed, red and pink.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-52		25° 15' S	56° 01' W		Seeds large, light pink.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-55		24° 59' S	56° 00' W		Seeds medium, red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-57		24° 59' S	56° 00' W		Seeds medium, dark purple.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-58		24° 59' S	56° 00' W		Seeds medium, mixture red, pink, and purple.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-63		24° 59' S	56° 00' W		Seeds large, mixture light pink and red.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.
PY96-42		25° 43' S	56° 15' W		Seeds medium, mixture red and pink.		Paniagua, M.S.	Minami, Makoto.	Altamirano, G.	Shinada, Yuji.

5. RECOMENDACIONES

Repetir el mismo trabajo durante otro ciclo, para validar los resultados y para obtener mayor volumen de semillas principalmente de aquellas accesiones en las que no se obtuvo suficiente.

Multiplificar algunas de las accesiones y poner a disposición de los agricultores para su uso.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Krapovickas, A. y Gregory, W.C. 1994. Taxonomía del género *Arachis* (*Leguminosae*). *Bonplandia* 8:1-186.

Paniagua, M.S.; Nakanishi, T.; Barboza, V. y Komeichi, M. 1994. Exploración y colección de leguminosas alimenticias en los departamentos de Itapúa, San Pedro, Caaguazú y Paraguarí. Centro Regional de Investigación Agrícola: Proyecto de Fortalecimiento de la Producción de Granos Principales en el Paraguay (CRIA / JICA), Capitán Miranda. CRIA - Publicación Miscelánea N° 1.

United State Peanut Descriptor. 1995. Roy N. Pittman, (ed). ARS-132. 18 pp. USDA-ARS, Griffin, Georgia, USA.

Williams, D.E. (2003). Diversidad Genética de Maní. Evolución, diversificación y caracterización. Pucallpa, Perú.

CRIOCONSERVACIÓN DE VARIEDADES NATIVAS DE PAPA

Ariana Digilio¹

1. RESUMEN

La escasa mano de obra, el espacio reducido, el bajo costo de mantenimiento, la gran disponibilidad de protocolos y la posibilidad de regenerar plantas normales sin variación genética, hacen de la criopreservación una técnica promisoriosa para el mantenimiento de germoplasma de papa a largo plazo.

Palabras claves: conservación de germoplasma, *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum*, *in vitro*, vitrificación.

2. ANTECEDENTES

Solanum tuberosum L. es la principal especie de papa cultivada tetraploide ($2n=4x=48$), dentro de la cual se reconocen dos subespecies: *andigenum* y *tuberosum*. Existen otras 6 especies cultivadas y más de 200 silvestres, todas ellas pertenecientes a la familia *Solanaceae*, sección *Petota*.

Solanum tuberosum ssp. *andigenum* Juz. & Buk. (adg), es una subespecie adaptada a días cortos, conocida comúnmente como ‘papa andina’ o ‘andigena’. Se halla ampliamente distribuida en Sudamérica desde los Andes venezolanos incluyendo, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia hasta el noroeste argentino (Hawkes, 1990)). Se la puede encontrar cultivada en los valles andinos de las provincias de Salta y Jujuy y también en la provincia de Catamarca, desde los 1900 a 4200m.s.n.m., correspondiente a las regiones fitogeográficas de la Puna y Prepuna.

‘Andigena’ es una raza local (landrace), variedad tradicional o variedad nativa, ya que ha sido seleccionada directamente por los agricultores en sistemas de agricultura tradicional, no influenciados por técnicas modernas de mejoramiento genético. Estas razas locales de papa se caracterizan por presentar variedades, que además de estar adaptadas a las condiciones locales, se diferencian entre sí por el porte de la planta y el color de las flores, pero principalmente por las características de los tubérculos, como ser la profundidad y distribución de sus ojos, la forma, el color de la piel y de la carne (**Figura 1**). Además poseen resistencia a diversos factores bióticos, como por ejemplo resistencia fúngica a *Phytophthora infestans*, resistencia bacteriana a *Erwinia carotovora* y resistencia a los virus PVX y PVY y a factores abióticos como las heladas. Estas razas también han sido utilizadas para introducir resistencia al nemátodo del nudo y poseen excelentes características asociadas a la calidad del tubérculo, pudiendo encontrarse en ellas porcentajes de materia seca, almidón y proteínas significativamente superiores a los valores obtenidos en variedades comerciales.

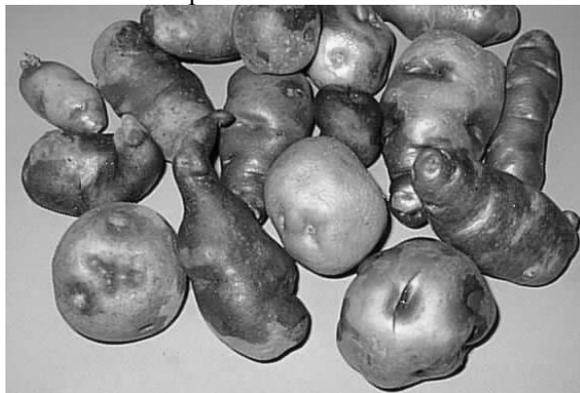


Figura 1. Tubérculos de variedades andinas.

¹INTA Balcarce, CC 276 (7620) Balcarce, Buenos Aires.E-mail: ariana_digilio@yahoo.com.ar

Se ha detectado erosión genética en las variedades andinas en el noroeste argentino. Una de las causas de la pérdida de estos materiales son las plagas y enfermedades, principalmente las virósicas. Como consecuencia de ello, los productores obtienen bajos rendimientos en sus cultivos y en algunas oportunidades recurren a material libre de virus de Bolivia produciendo así el reemplazo de variedades locales. Otras causas que han contribuido a la pérdida de la diversidad de dichas papas son: el desplazamiento de la mismas por otros cultivos; la escasa posibilidad de uso de pesticidas para combatir las plagas y enfermedades; la migración de los habitantes de los valles andinos hacia los centros urbanos en busca de mejores condiciones de vida y la baja probabilidad de obtener semilla sana de sus variedades (Clausen *et al.*, 2005). Todo esto hace necesario conservar estos recursos genéticos así como utilizarlos racionalmente ya que constituyen una valiosa fuente de información genética, otorgándole a los mismos valor económico y/o utilitario tanto actual como futuro y que sin duda contribuirán a la seguridad alimentaria mundial.

En el banco de germoplasma de la EEA Balcarce, se mantiene una colección que incluye especies silvestres y cultivares nativos de papa, con los objetivos, entre otros, de su almacenamiento a largo plazo. La conservación *ex situ*, es decir fuera de su hábitat natural, se realiza principalmente mediante semilla sexual para especies silvestres de papa. En el caso de los materiales cultivados, se conservan tubérculos y/o plántulas *in vitro* (**Figura 2**). Ésta última técnica se realiza incorporando tejido meristemático (explanto) a un medio de cultivo con retardantes osmóticos que limitan el crecimiento, y controlando las condiciones del ambiente como la luz y la temperatura. Para el mantenimiento de una colección *in vitro* se deben realizar repiques frecuentes, cada 12-24 meses, con el riesgo de ocurrencia de variación somaclonal y/o pérdidas por contaminación microbiana. Además requiere de la disponibilidad de un cuarto de cultivo y mano de obra permanente para el mantenimiento continuo de la colección. Esta modalidad de conservación ha sido diseñada para la conservación por un período limitado de tiempo, que generalmente no supera los dos años.

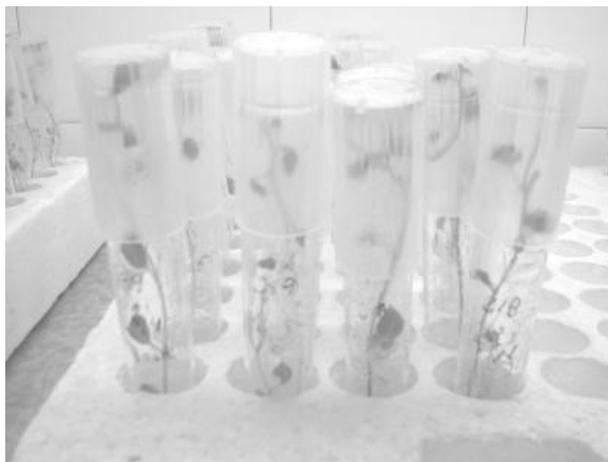


Figura 2. Plántulas de papa en cultivo *in vitro*.

La crioconservación es la única técnica hasta ahora desarrollada que permite el almacenamiento por tiempo indefinido, a ultra baja temperatura (-196°C), generalmente en nitrógeno líquido (N_2L). Bajo esta modalidad, el material conservado no sufre alteraciones genéticas ya que a esa temperatura los procesos metabólicos y las divisiones celulares no se producen. Además permite conservar germoplasma en un espacio reducido constituido por el tamaño del tanque de almacenamiento y con bajos costos de mantenimiento. Esta técnica ha sido aplicada en muchas especies para la conservación de polen, ápices, suspensiones celulares, embriones cigóticos y somáticos. En general estos tejidos contienen agua a nivel celular y resultan sensiblemente dañados cuando son sometidos a bajas temperaturas, ya que se produce la formación de cristales de hielo que pueden dañar las membranas y componentes celulares. Por lo tanto se debe deshidratar la célula artificialmente para protegerla del daño provocado por la cristalización del agua.

3. TÉCNICAS DE CRIOCONSERVACIÓN

En distintas especies tuberosas de papa se han implementado diferentes procedimientos de crioconservación, tales como el enfriamiento lento, la encapsulación-deshidratación, la gota y la vitrificación (Engelmann, 2000).

El primero se basa en la deshidratación de las células inducidas por freezado, es decir, el tejido es sometido a un proceso de enfriamiento en el cual la temperatura se disminuye gradualmente a una tasa de 0,5-4°C por minuto hasta alcanzar -40°C y luego se introduce directamente en N₂L alcanzando los -196°C. Durante el descenso térmico lento, tanto la célula como el medio extracelular se enfrían, formándose cristales de hielo sólo extracelularmente ya que la membrana celular actúa como una barrera física que bloquea la formación de hielo en el citoplasma. Esto provoca un desequilibrio en el potencial químico de la célula con lo cual se facilita el flujo de agua hacia el medio extracelular y se produce un incremento en la concentración intracelular. De esta manera la solución intracelular se encuentra lo suficientemente concentrada como para inducir el descenso térmico rápido del tejido al ser introducido en N₂L. El descenso térmico debe ser adecuado ya que sino se corre el riesgo de exponer la célula a elevadas concentraciones intracelulares, siendo éstas perjudiciales para la misma. Las muestras deben ser descongeladas rápidamente para evitar la recrystalización del tejido. Generalmente el material vegetal es previamente protegido con sustancias crioprotectoras que ayudan a mantener la integridad de la membrana celular y/o incrementan el potencial osmótico del medio externo. Para llevar a cabo este procedimiento se necesita contar con un equipo programable de descenso térmico o con un freezer que permita llevar la temperatura a -40°C. Los mejores resultados obtenidos con esta metodología corresponden a aquellos probados en sistemas celulares uniformes como cultivos de protoplastos, callos y suspensiones celulares, resultando difícil de aplicar a unidades más complejas que involucren desuniformidad en el tamaño y tipo de célula como por ejemplo yemas apicales o embriones somáticos.

Las otras tres técnicas de crioconservación se basan en el principio de vitrificación, es decir el proceso por el cual una solución acuosa pasa de un estado líquido a un estado amorfo vítreo evitando así la formación de cristales de hielo. Esto se logra deshidratando las células en medios concentrados de crioprotectores y/o desecadas al aire previa introducción en N₂L. La masa amorfa vítrea es viscosa y tiene menor presión de vapor que el hielo, por lo que se evita mayores deshidrataciones de la célula.

En el método de encapsulación-deshidratación los explantos son encapsulados en una solución de alginato de calcio y luego se someten a un pretratamiento en medio enriquecido con sacarosa por un período de tiempo variable y finalmente son desecados hasta un 20% de su peso (base peso húmedo). La deshidratación se realiza exponiendo las cápsulas a la corriente de aire de una cámara de flujo o mediante sílica gel. Finalmente las cápsulas se colocan directamente en N₂L.

El método de la gota consiste en incubar los meristemas apicales (2-3mm) extraídos de plántulas *in vitro* en un medio constituido por sales, vitaminas, sacarosa y hormonas. Luego se los traslada a una solución crioprotectora de constitución idéntica al medio anterior con el agregado de dimetil sulfóxido al 10% por un período corto. Sobre papelitos de aluminio se colocan gotas de 2,5µl c/u de solución crioprotectora y al finalizar el tiempo de crioprotección se deposita un meristema en cada gota. Luego ese papel se introduce directamente en N₂L y finalmente es llevado a un criovial previamente enfriado. El método de la gota ha sido probado en meristemas apicales de plántulas conservadas *in vitro*, lográndose incorporar 219 variedades y más de 200 genotipos antiguos de papa en crioconservación.

El protocolo de vitrificación es uno de los más sencillos desarrollados hasta ahora. Esta técnica involucra el pretratamiento de los explantos en soluciones crioprotectoras, su posterior deshidratación mediante soluciones altamente concentradas y su inmediata inmersión en N₂L. El Centro Internacional de la Papa en Perú junto con la Universidad de Cornell en Estados Unidos (Golmirzaie, 2000), desarrollaron un protocolo de vitrificación para meristemas apicales y axilares de plántulas *in vitro* de adg, obteniendo un 40% de supervivencia en yemas apicales.

3.1. Ajuste e implementación de la técnica de vitrificación en el banco BAL

Con el objetivo de implementar la conservación a largo plazo de germoplasma de papa cultivada, en el laboratorio del Banco de Germoplasma de INTA Balcarce (BAL), se iniciaron ensayos preliminares poniendo a punto la técnica de vitrificación mencionada anteriormente para distintas variedades andinas de la Argentina (Digilio, 2004). Para ello se utilizaron yemas de plántulas *in vitro* de 1,5 a 2mm de longitud de las variedades ‘Chaqueña’, ‘Chaqueña overa’, ‘Tuni’, ‘Chacarera’, ‘Blanca’ y ‘Waich’a’. También se decidió probar con yemas apicales de brotes de tubérculos de las variedades ‘Tuni’, ‘Collareja’, ‘Chacarera’ y ‘Allo’. En este procedimiento las yemas apicales luego de ser extraídas se colocaron en medio de precultivo I (0,09M de sacarosa) durante 24 hs (**Figura 3**). Al día siguiente se transfirieron a medio de precultivo II (0,6M de sacarosa) durante 5hs. Al finalizar la incubación, las yemas se colocaron sobre papel de filtro y posteriormente se trasladaron a una caja de Petri con solución de deshidratación compuesta por glicol de etileno, sorbitol y albúmina de suero bovino (50:15:6% p/v) durante 50 minutos (Steponkus *et al.*, 1992). Posteriormente las yemas se introdujeron en una pajuela con solución de vitrificación, la que fue introducida en un criovial con N₂L. Al cabo de unos días se procedió a recalentar, liberando las yemas en solución de descongelamiento realizando enjuagues sucesivos de 5 y 25 minutos. Finalmente las yemas se colocaron en medio de postcultivo bajo condiciones de oscuridad y a 20-22°C durante dos días, luego se transfirieron a medio de micropropagación bajo condiciones normales de luz y temperatura.

Como variables se consideraron la supervivencia, determinando el número de yemas que permanecieron verdes como signo de vitalidad sobre el número total de yemas tratadas y la regeneración, es decir, el número de yemas que brotaron sobre el número total de yemas tratadas. Estas variables fueron medidas en las yemas controles, es decir aquellas que sufrieron todo el proceso sin haber sido introducidas en N₂L y también en las tratadas, es decir aquellas que sí fueron introducidas en N₂L.

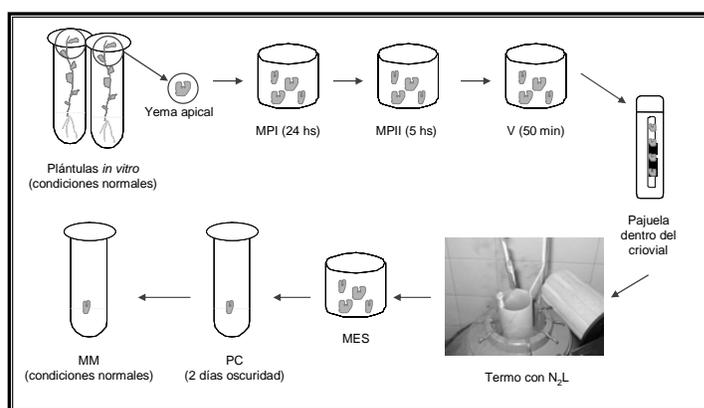


Figura 3. Protocolo de crioconservación utilizado en los ensayos. (MPI: medio de precultivo I; MPIO: medio de precultivo II; V: solución de deshidratación; MES: solución de vitrificación; PC: medio de postcultivo; MM: medio de micropropagación).

4. RESULTADOS

Se observaron respuestas variables a lo largo del proceso de vitrificación empleado. Algunos genotipos no soportaron las altas concentraciones de sacarosa en los medios de precultivo mostrando bajos porcentajes de supervivencia; otros genotipos habrían sido deshidratados excesivamente y en cambio otros escasamente, esto indicaría que un mismo tiempo de deshidratación no es adecuado para todos los genotipos debiendo probarse diferentes tiempos para cada uno de ellos. Esto indicaría que estandarizar un protocolo para la totalidad de los materiales a crioconservar no sería lo más apropiado. Los tratamientos crioconservados difirieron estadísticamente de los controles y solamente 'Chaqueña' mostró un 4,5% de regeneración postcrioconservación.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo permitió identificar los problemas más importantes a considerar en la implementación de la crioconservación como otra alternativa para la conservación de papas andinas. Actualmente, se está ensayando un protocolo de vitrificación basado en la técnica de la gota para la implementación del criobanco. Esta nueva alternativa ha sido empleada en el género *Solanum* con éxito y a simple vista resulta ser de aplicación más efectiva a la hora de crioconservar un gran número de entradas. Si bien se deben realizar otros ensayos para confirmar sus ventajas respecto de los materiales nativos de papa conservados en el banco BAL, los resultados hasta ahora obtenidos en yemas apicales de plántulas *in vitro* parecen ser promisorios respecto de la metodología probada inicialmente.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clausen, A.M.; Colavita, M.; Butzonitch, I. and Carranza, A.V. 2005. Genetic Resources and Crop Evolution. 52: 1099-1109.
- Digilio, A. 2004. Crioconservación de variedades nativas de *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* Juz.& Bukasov. Tesis de posgrado, Fac. Ciencias Agrarias, UNMdP.
- Engelmann, F. 2000. *En*: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and application. Engelmann, F y Takagi, H. (eds). pp 8-20.
- Golmirzaie, A.M. and Panta, A. 2000. *En*: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and application. Engelmann, F and Takagi, H. (eds). pp 250-254.
- Hawkes, J.G. 1990. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, London. 259p.
- Steponkus, P.L.; Langis, R. and Fujikama, S. 1992. *In*: Advances in Low-Temperature Biology. Steponkus, P.L. (ed). Vol.1: 1-61.

CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA, MOLECULAR Y DE LA CALIDAD NUTRICIONAL, DE UNA COLECCIÓN DE FESTUCA ALTA (*Festuca arundinacea* Schreb.) DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE PERGAMINO, ARGENTINA

Rosso, B.S.¹, Rimieri, P.¹, Carrete, J.¹, Cattoni, M.I.¹, Biagoli, C.², Cuyeu, A.R.², Pagano, E.M.², Ríos, R.D.²

1. RESUMEN

La festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) es la gramínea forrajera perenne más difundida en las pasturas cultivadas de la región templada húmeda y sub húmeda. Presenta muchas características agronómicas favorables y a la vez, algunos aspectos limitantes, como son su calidad nutricional intermedia, con grandes variaciones estacionales y algunos aspectos sanitarios que afectan tanto su producción de forraje como semilla. En el Banco de Germoplasma de la EEA-INTA Pergamino se dispone de una colección mundial de festuca alta obtenida mediante introducciones y colectas de poblaciones sin mejora genética. Sobre este germoplasma, se realizaron evaluaciones de las características agronómicas y de calidad nutricional, y se comenzó a aplicar la técnica de marcadores moleculares para su caracterización. Los resultados obtenidos permiten ampliar el conocimiento de esta colección para su utilización en programas de mejoramiento de la calidad forrajera de festuca alta, pudiéndose seleccionar poblaciones que combinan características superiores para los atributos evaluados.

Palabras claves: *Festuca arundinacea*, germoplasma, características agronómicas, calidad de forraje, marcadores moleculares

2. INTRODUCCIÓN

La festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) es una especie nativa de Europa y Asia que tiene una amplia adaptación geográfica. En Argentina es la gramínea forrajera perenne más sembrada de las pasturas cultivadas de la región templada húmeda y subhúmeda (Maddaloni y Ferrari, 2001). La producción total y estacional de forraje de esta especie es diferente según se consideren materiales provenientes del norte de Europa, mediterráneos o intermedios entre estos dos (Bertín, 1988).

La amplia distribución geográfica de esta especie es consecuencia de su excelente adaptabilidad general, conferida por características agronómicas favorables tales como resistencia al pastoreo y tolerancia a estrés biótico y abiótico. Su calidad nutricional es intermedia, aunque con grandes variaciones en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca del forraje a lo largo del año (Carrete, 1999).

Las introducciones de germoplasma de festuca alta en Argentina en la década del '40, han sido la base para la obtención de la variedad nacional El Palenque MAG (tipo norte de Europa) y para la comercialización de variedades de otros orígenes, ninguno tan bien adaptado como el tipo *Palenque*. En el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino están representados los diferentes tipos forrajeros de festuca alta que se cultivan en el mundo.

Fueron introducidas poblaciones desde diferentes Instituciones y también se han colectado poblaciones naturalizadas de la región pampeana (Rosso, 2005); estas últimas del tipo *Palenque* o Kentucky 31. Se realizaron evaluaciones morfo-agronómicas que permiten ampliar el conocimiento de esta colección para su utilización en programas de mejoramiento de la calidad forrajera de festuca alta.

¹ EEA-INTA, c.c. 31, Pergamino-2700, Argentina broso@pergamino.inta.gov.ar

² Instituto de Genética "Edwald A. Favret", CICVyA, INTA. C.C. 25-1712. Castelar, Argentina

Se empezó a aplicar la técnica de marcadores moleculares para la caracterización de la variabilidad genética de caracteres que no está influenciada por el ambiente. La biotecnología de gramíneas forrajeras es un área en incipiente desarrollo que está generando nuevas herramientas para el mejoramiento genético de estas especies (Wang *et al.*, 2001).

2.1. Características generales de la colección

Se dispone de 500 entradas en la colección del Banco Activo, con sus respectivos duplicados en Banco Base para su conservación a largo plazo. Con respecto al origen geográfico de la colección el 32% corresponde a Francia, el 17% a España, 5% Argentina, 5% Marruecos y el resto a diferentes países (Argelia, Australia, EE.UU., Holanda, Irán, Israel, Italia, Japón, Reino Unido, Rusia, Túnez, Turquía, Yugoslavia).

2.2. Actividades realizadas

Con el objetivo de incrementar la variabilidad de esta especie se realizaron introducciones y colectas de poblaciones sin mejora genética y se evaluaron por atributos morfoagronómicos y de calidad nutricional. También se efectuaron las primeras caracterizaciones moleculares y desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* de algunas entradas seleccionadas en ensayos previos.

2.1.1. Evaluaciones realizadas

1- Se realizó un ensayo de evaluación de 350 poblaciones seleccionadas por datos de pasaporte de acuerdo a sus orígenes geográficos tomados de una colección original de 500 entradas, utilizándose 20 plantas por entrada y evaluándose los siguientes atributos:

- número de macollos
- vigor invernal y primaveral (1=bajo, 5=alto)
- hábito de crecimiento en estado vegetativo (1=postrado, 9=erecto)
- días a floración desde el 1 de Septiembre
- inflorescencias/planta (n°)
- semillas/inflorescencia (g)
- persistencia (% de sobrevivencia al 3^{er} año)
- susceptibilidad a roya del tallo (*Puccinia graminis* Pers.) (1=susceptible,4=tolerante)

Con la información obtenida se realizó el agrupamiento de las entradas utilizando el método Ward del paquete estadístico SAS (2000). Los valores de cada atributo fueron estandarizados. Se formaron 7 grupos (Rosso *et al.*, 2001).

Las principales características asociadas con cada grupo estuvieron relacionadas con la producción de semilla, el vigor y la tolerancia a roya. Uno de los grupos mostró características agronómicas consideradas de importancia en los cultivares comerciales (tolerancia a roya del tallo, vigor invernal, producción de semilla, persistencia). (**Cuadro 1**).

La mayoría de las poblaciones que la integraron eran originarias de la región Mediterránea.

Cuadro 1. Agrupamiento de las 350 poblaciones de acuerdo a sus características distintivas.

Agrupamiento	Características
1	floración tardía, tolerante a roya del tallo, baja producción de semilla, bajo vigor primaveral e invernal, baja persistencia, baja capacidad de macollaje
2	floración tardía, susceptible a roya del tallo, baja producción de semilla, bajo vigor invernal
3	tolerante a roya del tallo, alto vigor invernal, alta producción de semilla, alta persistencia
4	floración temprana, susceptible a roya del tallo, bajo vigor invernal, alta capacidad de macollaje, rendimiento de semilla intermedio
5	floración temprana, bajo vigor invernal, susceptible a roya del tallo, baja persistencia
6	tolerante a roya del tallo, muy macolladores, baja producción de semilla, precocidad intermedia
7	vigor invernal intermedio, floración temprana, hábito de crecimiento erecto

El 21% de las poblaciones de la colección evaluada, se comportaron como tolerantes a roya de la hoja (*Puccinia graminis*) en condiciones de campo. Los mayores niveles de tolerancia a esta enfermedad se encontraron en poblaciones de Marruecos, Israel y Argelia (**Figura 1**).

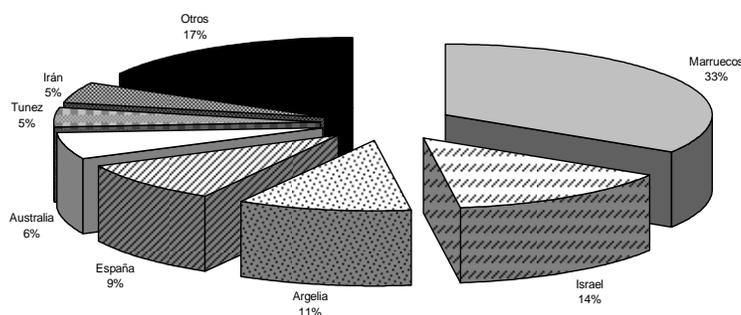


Figura 1. Origen de los materiales tolerantes a roya.

Entre los materiales con mayor número de macollos al estado vegetativo y producción de semilla se destacaron los de Argentina y Francia.

2- En otro ensayo, se comparó la producción estimada de forraje estacional y total en escala de 1-9, utilizada de acuerdo al Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos para la caracterización preliminar de gramíneas forrajeras (IBPGR, 1985).

Las poblaciones evaluadas fueron 14 poblaciones naturalizadas colectadas en diferentes localidades de las Provincias de Buenos Aires (BA), Córdoba (CO), Santa Fe (SF) y La Pampa (LP) y dos cultivares argentinos (Palenque Plus INTA y Flexible) junto a poblaciones introducidas de Israel, Argelia, Marruecos, Túnez y España. Los resultados obtenidos, (**Figura 2**), reflejan diferencias contrastantes entre las poblaciones argentinas, tanto naturalizadas como mejoradas y algunas introducidas de la zona mediterránea. Estas últimas muestran un notorio reposo estival y una mayor producción estimada durante el invierno. Entre las poblaciones y cultivares nacionales se observó un patrón similar de producción estacional a las entradas tipo norte de Europa, lo cual se atribuye a la historia de las introducciones de cultivares en el país.

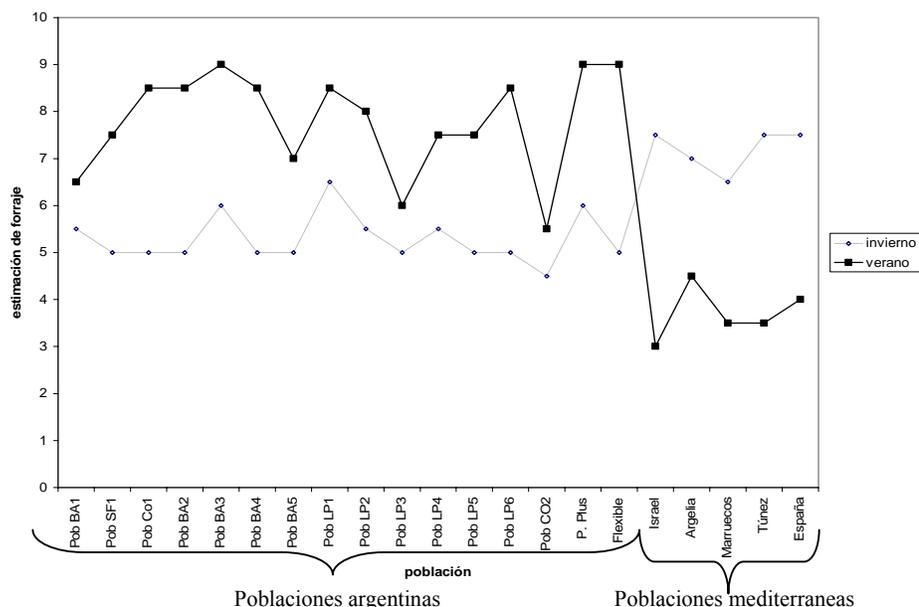


Figura 2. Producción estimada de forraje estival e invernal en distintos tipos de poblaciones de festuca alta, de Argentina y mediterráneas. Estimación de forraje: 1-escaso, 9-abundante.

3- Se ha evaluado la calidad nutricional del forraje de 36 poblaciones sin mejora genética originarias de: Argentina, Italia, Marruecos, España, EE.UU., Túnez, Rusia, Polonia, Israel, Argelia, Inglaterra, Yugoslavia, Francia, Afganistán. Estas poblaciones fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas sobre la colección original. Como testigo se utilizaron los cultivares Palenque Plus INTA y Quantum. Algunos resultados indican una gran heterogeneidad de las poblaciones, fuente de variabilidad para el mejoramiento genético. En el parámetro fibra total (FDN) hay 10% de diferencia entre las poblaciones extremas, con diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.01$) entre los cuartiles superior e inferior. Algo similar ocurre para FDA (Fibra detergente ácido). Con respecto a digestibilidad en comienzos de floración, la variabilidad fue aún mayor con valores extremos de 52% y 77%, pero debido a la variabilidad entre repeticiones y a variaciones en el método de digestibilidad *in vitro*, no se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas. Se han encontrado además diferentes combinaciones entre los parámetros de calidad, la producción total de materia seca y los porcentajes de materia seca (MS).

Catorce de las poblaciones se destacaron por su bajo contenido de fibra y su alta digestibilidad. En el **Cuadro 2** se presentan las combinaciones de las distintas variables, considerando las poblaciones con diferencias significativas en productividad.

Cuadro 2: Poblaciones de alta productividad con diferencias significativas, origen de las mismas y parámetros de calidad

Identificación	ORIGEN	% FDA	% FDN	PPST (g/parcela)	% MS
00549	Argentina	33,62	57,95	1567,2	27,9
00070	Rusia	36,67	61,77	1404,5	28,16
00018	Marruecos	35,21	57,69	1571,2	31,06
00383	Argelia	32,38	55,84	1705,7	34,5
00017	Argelia	33,72	56,01	1408,9	34,2
00113	Francia	33,98	57,46	1609,7	32,1
00122	Francia	32,43	55,88	1495,7	30,66
00169	Francia	34,47	58,45	1557,9	30,26
00554	Argentina	32,65	56,78	1561,6	27,63
00358	Marruecos	35,67	60,01	1616,5	33,33
Palenque Plus	Argentina	32,75	56,66	1608,7	29,13

% FDA: fibra detergente ácido expresado en porcentaje
 % FDN: fibra detergente neutro (fibra total) expresado en porcentaje
 PPST: producción por parcela expresada en gramos de MS
 % MS: porcentaje de materia seca

En el **Cuadro 3**, en forma similar, se presentan para las variables FDN y FDA.

Cuadro 3: Poblaciones de bajo y alto contenido de fibra (FDN y FDA), productividad y origen de las mismas.

BAJO % FDN y % FDA

Identificación	ORIGEN	% FDA	% FDN	PPST (g/parcela)	% MS
00383	Argelia	32,38	55,84	1705,7	34,50
00385	Israel	32,45	54,14	1284,9	31,90
00410	Túnez	31,60	54,46	1100,5	30,23
00017	Argelia	33,72	56,01	1408,9	34,20
00034	Italia	31,82	55,55	1067,8	28,00
00066	Yugoslavia	31,70	54,24	1183,1	26,80
00082	Francia	32,08	54,36	909,8	26,56
00122	Francia	32,43	55,88	1495,7	30,66
00591	España	31,11	54,47	1028,4	30,23
Quantum	Australia	31,58	54,79	1278,5	26,10
00547	Argentina	30,62	54,50	1330,1	28,90

ALTO % FDN y % FDA

Identificación	ORIGEN	% FDA	% FDN	PPST (g/parcela)	% MS
00507	Marruecos	37,91	63,73	1164,1	32,63
00070	Rusia	36,67	61,77	1404,5	28,16
00017	Argelia	38,14	62,28	1200,0	30,0
00198	Francia	36,34	61,87	1371,5	29,4

% FDA: fibra detergente ácido expresado en porcentaje
 % FDN: fibra detergente neutro (fibra total) expresado en porcentaje
 PPST: producción por parcela expresada en gramos de MS
 % MS: porcentaje de materia seca

4. Marcadores moleculares: Se puso a punto en festuca alta el protocolo de extracción de ADN y de marcadores moleculares basados en microsatélites (SSR) (Holton, 2001), detectados en geles de poliacrilamida con tinción de bromuro de etidio. Se comenzó a trabajar con “bulks” de ADN provenientes de cinco poblaciones originarias de Argentina (Palenque plus INTA), Reino Unido (UK), Nueva Zelanda, Japón y Rusia. Estas poblaciones fueron analizadas en primera instancia con 10 “primers” SSR de *Lolium perenne* y luego se ajustó la técnica de PCR con 30 “primers” de festuca. Entre ellos 7 “primers” SSR de *Lolium* y 20 “primers” SSR de festuca dieron buena amplificación y polimorfismo entre las poblaciones. Posteriormente se trabajó con ADN proveniente de 20 plantas individuales de cada población observándose un importante nivel de variabilidad intrapoblacional (**Figura 3 A y B**).

En las **figuras 3A y 3B**, se presentan a modo de ejemplo dos fotografías de geles de poliacrilamida mostrando las variaciones inter (A) e intra población (B):



Figura 3. A: Poblaciones, **B:** Plantas individuales de una población del Reino Unido.

6. Cultivo *in vitro*. En el Instituto de Genética “Edwald A. Favret”, para conocer la respuesta al cultivo *in vitro*, como etapa previa para desarrollar y aplicar un protocolo de transformación (transgénesis) en festuca alta., se desarrolló un protocolo de cultivo *in vitro*, basado en el uso de embriones maduros como explantes (Foster y Spangerberg, 1999). Se utilizó el cultivar Palenque Plus INTA y se obtuvieron buenos porcentajes de inducción y regeneración de callos (95% y 57% respectivamente), para su aplicación como parte del protocolo de transformación (**Figuras 4 y 5**).

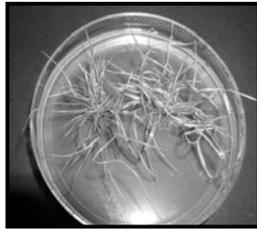


Figura 4. Callos de Festuca alta cv Palenque Plus INTA regenerados.



Figura 5. Planta regenerada *in vitro* de Festuca alta cv Palenque Plus INTA.

2.1.2. Actividades a realizar asociadas al cultivo *in vitro*

Considerando que la respuesta *in vitro* es fuertemente afectada por el genotipo donante del explante, en futuros estudios se evaluará la respuesta *in vitro* de materiales pertenecientes al Banco de Germoplasma Pergamino con el objetivo de identificar genotipos con alta eficiencia de regeneración *in vitro*.

3. CONCLUSIONES

Considerando las evaluaciones realizadas sobre características agronómicas, sanitarias, moleculares y de la calidad nutricional, se seleccionaron entradas que presentan diferentes combinaciones de esos atributos que posibilitan su empleo en mejoramiento genético.

Se puso a punto el protocolo de extracción de ADN y de marcadores moleculares microsatélites (SSR) para festuca alta y se determinó una alta variabilidad inter e intrapoblacional con esa técnica.

Se desarrolló el protocolo del cultivo *in vitro* basado en el uso de embriones maduros como explantes.

Se detectaron poblaciones con buenos porcentajes de inducción y regeneración de callos para su aplicación al protocolo de transformación.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertín O.D. 1988. Características agronómicas de los principales grupos de cultivares de festuca alta. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Carpeta sobre forrajeras y producción bovina. Inf. General n° 145. 3 p.

Carrete J. 1999. Calidad del forraje en gramíneas perennes templadas. *En*: Jornada a campo, novedades en forrajeras: Producción, calidad y mejoramiento, INTA EEA Pergamino.

Forster, J. and Spangenberg, G. 1999. Forage and turf-grass biotechnology: principles, methods and prospects. pp. 191-237. *In*: Genetic Engineering . Vol 21.Ed. Setlow, J, Kluwer Academi Publishers.

Holton, T.A. 2001. Plant genotyping by análisis of microsateclites. *In*: Plant Genotyping, The DNA fingerprinting of plants. Ed. Henry, R.J., Lismore, Australia. CAB International.

Internacional Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), 1985. Descriptor list for forage grasses. Ed.: Tyler, B.F.; Hayes, J.D.; Ellis Davies, W. Roma, pp 29.

Maddaloni, J. y Ferrari, L. 2001. Festuca alta. *In*: Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. Eds. Maddaloni, J. y Ferrari, L. INTA, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Pp 165-182.

Rosso, B. 2005. La colección de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) del Banco Activo Pergamino, Argentina. V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Montevideo, Uruguay. pp 86

Rosso, B.; Pagano, E. y Rimieri, P. 2001. Evaluation and utilization of the tall fescue germplasm collection at Pergamino INTA, Argentina. *In*: Proceedings of the XIX International Grassland Congress, Brasil, pp. 504.

Wang, Z.; Hopkins, A. y Mian, M. 2001. Forage and turf-grass biotechnology. Critical Reviews in Plant Sciences 20:573-619.

COMMUNICATION: OCCURRENCE OF RUST (*Puccinia arachidis* Speg.) IN *Arachis glabrata* Benth. AND *Arachis pseudovillosa* (Chodat & Hassl.) Krapov. & W.C.Greg. (LEGUMINOSAE)

Ramos, V.R.¹; Valls, J.F.M.²

1. ABSTRACT

Rust caused by *Puccinia arachidis* is one of the major groundnut foliar diseases, determining yield losses around 10% in USA and more than 50% in the semi-arid tropics. Foliar diseases can be controlled by some fungicides, but this control method is expensive and not always affordable to small-scale farmers. The importance of the *Arachis* wild species germplasm rescue and characterization is based on its potential to provide useful genes for cultivated groundnut breeding, mainly concerning disease resistance, as the genetic basis of *Arachis hypogaea* is narrow. ICRISAT researchers observed that *A. glabrata* accessions available in their collection were immune to rust in inoculation tests. This observation has led many scientists to develop techniques to try to transfer this possible resistance to *A. hypogaea*. Aiming to characterize a broader spectrum of *A. glabrata* germplasm, including the allied *A. pseudovillosa*, concerning the natural incidence of rust, direct inspections were made in the material available at EMBRAPA/CENARGEN's greenhouse and herbarium. In 198 herbarium specimens evaluated, 41 (20.7%) showed rust symptoms. In 84 live plants, 12 (14.3%) showed rust symptoms.

Key-words: *Arachis glabrata*, rust, *Puccinia arachidis*, groundnut, foliar disease.

2. RESUMO

Ocorrência de ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.) em *Arachis glabrata* Benth. e *Arachis pseudovillosa* (Chodat & Hassl.) Krapov. & W.C.Greg. (Leguminosae).

A ferrugem causada por *Puccinia arachidis* é uma das principais doenças foliares do amendoim, provocando perdas de produção ao redor de 10% nos EUA e mais de 50% nos trópicos semi-áridos. As doenças foliares podem ser controladas por alguns fungicidas, mas este método de controle é oneroso e nem sempre acessível aos pequenos agricultores. A importância do resgate e caracterização de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis* reside em seu potencial de fornecimento de genes úteis para o melhoramento do amendoim cultivado, principalmente no que diz respeito à resistência a doenças, em que a base genética de *A. hypogaea* é muito estreita. Pesquisadores do ICRISAT observaram que acessos de *A. glabrata* disponíveis em sua coleção se apresentavam imunes à ferrugem em testes de inoculação. Esta observação tem levado muitos cientistas a desenvolverem técnicas que permitam a transferência dessa possível resistência a *A. hypogaea*. Com o objetivo de caracterizar amplamente o germoplasma de *A. glabrata*, e da espécie afim *A. pseudovillosa*, em relação à ocorrência natural de ferrugem, foram feitas inspeções diretas do material disponível em telado e no herbário da EMBRAPA/CENARGEN. Em 198 exsicatas de herbário avaliadas, 41 (20,7%) apresentaram sintomas de ferrugem. Em 84 plantas em cultivo no telado, 12 (14,3%) apresentaram sintomas da doença.

¹Pós-graduação em Genética/UNESP-Botucatu/EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900, Brasília, DF, e-mail: valeria@cenargen.embrapa.br

² EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 770-900, Brasília, DF, e-mail: valls@cenargen.embrapa.br
Corresponding author.

Rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. is a foliar disease of groundnut, that in combination with early leaf spot (*Cercospora arachidicola* Hori) and late leaf spot (*Cercosporidium personatum* (Berk and Curt.) Deighton, is responsible for significant crop losses worldwide.

Losses around 10% are recorded in USA. In the semi-arid tropics, where chemical protection is rarely used, losses over 50% are common (Subrahmanyam *et al.*, 1983, 1989). Although these foliar diseases can be controlled by fungicides, this is considered a costly control method, not always affordable to small-scale farmers. For this reason, the identification of sources of genetic resistance is highly important.

The reaction of cultivars, species and improved lines of groundnut in relation to *P. arachidis* has been studied since 1941, under natural infection conditions or under artificial inoculations in laboratory or greenhouse, but few sources of resistance were detected. Within *Arachis hypogaea* L., only 3 genotypes with physiological resistance to rust were recorded in Brazil: Tarapoto (PI 259747, PI 314879, PI 350680, PI 381622 and PI 405132), Israel line 136 (PI 298115 and PI 315608) and DHT 200 (PI 314817) (Moraes and Savy Filho, 1983).

The greatest importance of wild *Arachis* species germplasm rescue and characterization is based on its potential to provide useful genes for cultivated groundnut breeding (STALKER and MOSS, 1987; STALKER, 1992), mainly concerning disease resistance, since the genetic basis of *A. hypogaea* is narrow, as far as such characters are concerned (Subrahmanyam *et al.*, 1985).

Utilizing the Detached Leaf Technique, described by Subrahmanyam *et al.* (1983), ICRISAT researchers observed that accessions of *A. glabrata*, a perennial rhizomatous tetraploid, available in their collection, were immune in rust inoculation tests (Subrahmanyam *et al.*, 1983). This observation has led many scientists to develop techniques for the transfer of this possible genetic resistance to *A. hypogaea*. However, in the frequent germplasm collection expeditions in Brazil, and during years of observations of cultivated plants of *A. glabrata*, in Distrito Federal, Brazil, rust presence has been detected in a significant number of accessions of the available germplasm.

Charchar and Pizarro (1995), studying the major fungi associated to foliar diseases in accessions of wild *Arachis* with potential forage use, verified that rust was associated to 23 accessions of *A. glabrata*, in a high frequency.

Aiming to characterize a broader spectrum of *A. glabrata* germplasm, concerning the natural incidence of rust, direct inspections were made starting August 1996 to detect rust symptoms in accessions of *A. glabrata* and also of *A. pseudovillosa* (Chodat and Hassl.) Krapov and Greg W.C., an allied perennial rhizomatous tetraploid, available at EMBRAPA/CENARGEN's greenhouse and herbarium.

Of 198 distinct herbarium specimens evaluated, 41 (20.7%) showed rust symptoms. In 84 potted plants, each representing an individual accession, 12 (14.3%) showed rust symptoms.

Tables 1 and 2 list the accessions studied and indicate those found to present rust symptoms in the greenhouse and herbarium, respectively.

Rust symptoms in *A. glabrata* are illustrated in **Figure 1**.



Figure 1. Rust pustules on abaxial surface of *Arachis glabrata* leaves.

The natural area of occurrence of the germplasm analyzed in Brazil and location of representative accessions with rust incidence are presented in **Figure 2**.

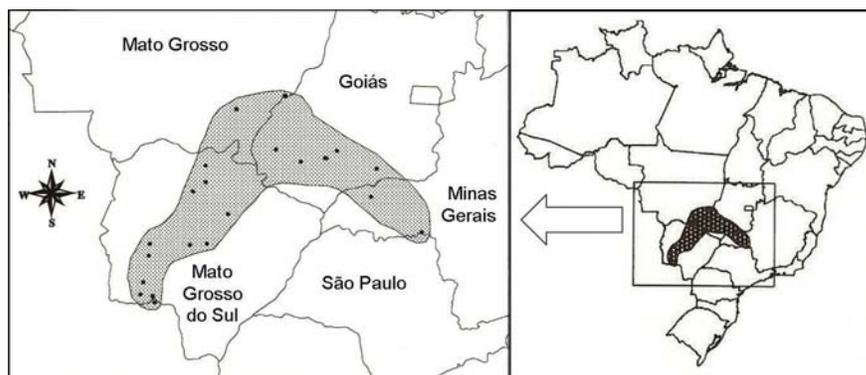


Figure 2. Natural area of occurrence of *Arachis glabrata* in Brazil and location of representative accessions with rust incidence.

Immunity reaction detected in ICRISAT's experiments might be related to lack of variability of the tested pathogen. We do expect a greater natural variability in the pathogen in the natural area of occurrence of the whole genus *Arachis*.

Severe infestations of rust in *A. glabrata* have been observed by the second author in field plots and ornamental lawns, in Brazil. Defoliation caused by rust is followed by regrowth, many times absolutely free of visible rust symptoms, in this perennial species. Losses in forage production have not yet been evaluated. *Arachis glabrata* has already conquered a place in forage production in the southern USA and is eventually used for lawns in South America. Its area of cultivation in the US has shown increases of 40% per year (French *et al.*, 1994), after release of the cultivars Florigraze and Arbrook. Florigraze arose as a hybrid seedling, germinating close to a plot of PI 118457, which has been considered its female progenitor (PrineE, 1964, Prine *et al.*, 1981). PI 118457 was collected by W. Archer and A. Gehrt in Campo Grande, MS, Brazil, and its voucher specimen shows rust pustules as noted in Subrahmanyam *et al.* (1983). Living plants of cultivars Florigraze and Arbrook available at EMBRAPA/CENARGEN genebank have not shown rust symptoms. Furthermore, reaction of *A. hypogaea* accessions to local rust strains from *A. glabrata* is still unknown. However, this investigation needs to proceed, since the establishment of permanent pastures of *A. glabrata* close to

groundnut fields may represent a risk, as the pastures could maintain a constant source of the pathogen for reinfestation of the crop.

The observations of this paper emphasize the necessity of a more precise characterization of *A. glabrata* germplasm concerning rust occurrence, before attempting its incorporation to breeding programs.

TABLE 1. Rust incidence in live plants of *Arachis glabrata* and *A. pseudovillosa* grown in the EMBRAPA/CENARGEN greenhouse.

A. glabrata	Accession code (BRA-)	Rust Incidente	Country/ State
Bz s/n°	034053	-	BRA/SP
CIAT 9081=cv Florigraze	011819	-	USA/FL
CIAT 9100	037044	-	USA/FL
cv. Arbrook	011878	-	USA/FL
cv. Florigraze	011819	-	USA/FL
Es 1	020583	-	BRA/MS
Es 2	020591	-	BRA/MS
GKP 9592=CIAT 9085	026853	-	PRY
GKP 9827=CIAT 9073	012360	-	BRA/MS
GKP 9882	016845	-	BRA/MS
GPSv 2355	033332	+	BRA/MT
Nc 911	029254	-	BRA/MS
Nc 912	029262	-	BRA/MS
Rv s/n°	034061	+	BRA/GO
Sk 858	031119	-	BRA/MG
SvPzHn 3771	035581	-	PRY
SvPzHn 3772	035599	-	PRY
SvPzHn 3774	035602	-	PRY
SvPzHn 3778	035645	-	PRY
SvPzHn 3782	035688	-	PRY
SvPzHn 3783	035696	-	PRY
SvPzHn 3785	035718	-	PRY
SvPzHn 3787	035726	-	PRY
SvPzHn 3790	035734	-	PRY
SvPzHn 3791	035742	-	PRY
SvPzHn 3793	035769	-	PRY
SvPzHn 3796	035777	-	PRY
SvPzHn 3797	035785	-	PRY
SvPzHn 3798	035793	-	PRY
SvPzHn 3799	035807	-	PRY
SvPzHn 3801	035823	-	PRY
SvPzHn 3802	035831	+	PRY
SvPzHn 3803	035840	+	PRY
SvPzHn 3805	035858	+	PRY
SvPzHn 3810	035912	-	PRY
SvPzHn 3811	035921	-	PRY
SvPzHn 3814	035947	-	PRY
SvPzHn 3816	035955	-	PRY
SvPzHn 3800	035815	-	PRY

A. glabrata	Accession code (BRA-)	Rust incidence	Country/ State
V 7516	020575	+	BRA/MS
VeSv 70	029271	-	BRA/TO
Vi 290	015636	+	PRY
VMPzW 13951	034461	-	BRA/GO
VMPzW 13964	034495	-	BRA/MS
VMPzW 13971	034533	-	BRA/MS
VMPzW 13976	034541	-	BRA/MS
VMPzW 13977	034550	-	BRA/MS
VMPzW 13979	034576	-	BRA/MS
VMPzW 13983	034592	-	BRA/MS
VMPzW 14000	034657	-	BRA/MS
VMPzW 14001	034665	-	BRA/MS
VMPzW 14012	034690	-	BRA/MS
VMPzW 14013	034703	-	BRA/MS
VMPzW 14018	034746	-	BRA/MS
VMPzW 14019	034754	-	BRA/MS
VMPzW 14046	034878	-	BRA/MS
VMPzW 14061	034924	-	BRA/MS
VMSv 7300	016292	+	BRA/MG
VQFdSv 11922	029386	-	BRA/MS
VR 7530	020559	-	BRA/GO
VR 7537	020567	-	BRA/MG
VRcW 13652	033561	+	BRA/GO
VRGeSv 7642	017531	-	BRA/MS
VRGeSv 7647	017566	-	BRA/MS
VRGeSv 7678	017639	-	BRA/MS
VRGeSv 7687	017680	-	BRA/MS
VRGeSv 7710	017761	-	BRA/MS
VSGr 6306	012866	+	BRA/GO
VSGr 6436	012874	-	BRA/MT
VSGr 6442	012882	-	BRA/MT
VSGr 6443	012891	-	BRA/MT
VSPmW 13798	033901	-	BRA/MT
VSPmWiSv 13273	030864	-	BRA/MG
VSSi 5115	012076	-	BRA/GO
VSSi 5153	012084	+	BRA/GO
VSSi 5162	012092	+	BRA/GO
VSSiGdW 7745	018082	-	BRA/GO
VW 5916	012157	-	BRA/MG
VW 5922	012165	-	BRA/MG

A. pseudovillosa	Accession code (BRA-)	Rust Incidente	Country/ State
VMPzW 14064	034932	-	BRA/MS
VRcSgSv 13593	032883	-	BRA/MS
VRcSgSv 13599	032905	-	BRA/MS
VRGeSv 7695	017701	-	BRA/MS
VSW 9932	022934	-	BRA/MS

Table 2. Rust incidence in *Arachis glabrata* and *A. pseudovillosa* in the EMBRAPA/CENARGEN herbarium specimens.

<i>A. glabrata</i>	Rust Incidete	Country/ State	<i>A. glabrata</i>	Rust incidence	Country/ State
A 720	+	BRA/MT	VMPzW 13971	+	BRA/MS
A 721	-	BRA/MT	VMPzW 13976	-	BRA/MS
Arbo <i>et al.</i> 1871	-	PRY	VMPzW 13977	-	BRA/MS
Arbo <i>et al.</i> 1796	-	PRY	VMPzW 13979	+	BRA/MS
Arbo <i>et al.</i> 1875	-	PRY	VMPzW 13981	+	BRA/MS
AW 3583	-	BRA/MT	VMPzW 13982	-	BRA/MS
AW 3584	-	BRA/MT	VMPzW 13983	+	BRA/MS
Bz s/n ^o	-	BRA/SP	VMPzW 14000	-	BRA/MS
Cabral, Ferr., C�ac. 286	-	ARG	VMPzW 14001	-	BRA/MS
Co 8131	-	BRA/MG	VMPzW 14002	+	BRA/MS
G 30020	-	BRA/GO	VMPzW 14011	-	BRA/MS
G 30021	-	BRA/MT	VMPzW 14012	-	BRA/MS
GKP 9806	-	BRA/MT	VMPzW 14013	-	BRA/MS
HLKHe 552	+	BRA/MT	VMPzW 14018	-	BRA/MS
HLKHe 553	-	BRA/MT	VMPzW 14019	-	BRA/MS
HLKHe 560	+	BRA/MT	VMPzW 14046	-	BRA/MS
HLKHe 563	+	BRA/MT	VMPzW 14061	-	BRA/MS
Huidobro 4872	-	ARG	VMPzW 14062	-	BRA/MS
Ibarropa 4229	-	ARG	VMSv 7300	-	BRA/MG
Jt 3	-	BRA/GO	VMSv 7302	+	BRA/MG
K 12690	-	ARG	VMSv 7305	-	BRA/SP
K 15523	-	BRA/MT	Vn <i>et al.</i> 217	-	PRY
K 15879	-	BRA/MT	VPoPeJAr 8554	-	BRA/MS
K 15881	-	ARG	VPzRcSgSv 13484	+	BRA/GO
K 15883	-	ARG	VPzRcSgSv 13485	+	BRA/GO
K 18317	-	ARG	VPzRcSgSv 13488	-	BRA/GO
K 29625	-	BRA/MT	VPzRcSgSv 13498	-	BRA/MS
K 29928	-	BRA/MT	VPzRcSgSv 13503	-	BRA/MS
K 30131	+	BRA/MT	VPzRcSgSv 13504	-	BRA/MS
K 30146	-	BRA/MT	VPzRcSgSv 13533	-	BRA/MS
K 7934	-	ARG	VPzRcSgSv 13534	+	BRA/MS
K 21347	-	ARG	VPzRcSgSv 13537	-	BRA/MS
KC 11609	-	ARG	VPzRcSgSv 13538	+	BRA/MS
KC 11813	-	ARG	VPzRcSgSv 13540	-	BRA/MS
KC 11851	-	ARG	VPzRcSgSv 13541	-	BRA/MS
KC 13735	-	ARG	VPzRcSgSv 13542	-	BRA/MS
KC 34365	-	BRA/MT	VPzRcSgSv 13544	-	BRA/MS
KC 34593	-	BRA/MS	VQFdSv 11736	-	BRA/SP
KC 35244	+	ARG	VQFdSv 11922	-	BRA/MS
KC 35245	-	ARG	VQFdSv 11923	-	BRA/MS
KC 35249	-	BRA/SP	VR 7530	+	BRA/GO
KC 42750	-	BRA/SP	VR 7537	-	BRA/MG
KC 42754	-	BRA/MG	VRcSgSv 13552	+	BRA/MS
KC 42769	-	BRA/MG	VRcSgSv 13587	-	BRA/MS
KG 30027	+	BRA/MT	VRcSgSv 13605	-	BRA/MS
KG 30044	-	ARG	VRcSgSv 13617	-	BRA/MS
KG 30120	+	PRY	VRcW 13652	-	BRA/GO
KGPSc 30111	-	PRY	VRGeSv 7540	-	BRA/GO
KGPSc 30112	-	PRY	VRGeSv 7541	-	BRA/GO
KGPSc 30132 ^a	+	BRA/MT	VRGeSv 7542	+	BRA/GO
KGPSc 30132 ^b	+	BRA/MT	VRGeSv 7543	-	BRA/GO
KHe 14425	-	BRA/MT	VRGeSv 7549	+	BRA/GO
KHe 14443	-	BRA/MT	VRGeSv 7554	+	BRA/MS
KP 30047	-	ARG	VRGeSv 7580	+	BRA/MS
LJ 2445	-	BRA/MS	VRGeSv 7623	-	BRA/MS
Montes 12603	-	PRY	VRGeSv 7624	-	BRA/MS
Montes 1367	-	ARG	VRGeSv 7625	-	BRA/MS
Montes 191	-	ARG	VRGeSv 7634	-	BRA/MS
Mroginski 400	-	ARG	VRGeSv 7641	-	BRA/MS
Mroginski 50	-	ARG	VRGeSv 7642	-	BRA/MS
Sc 15351	-	PRY	VRGeSv 7648	-	BRA/MS
Sc 19826	-	ARG	VRGeSv 7658	+	BRA/MS
Sc 21386	-	PRY	VRGeSv 7673	-	BRA/MS
Sc 21506	-	PRY	VRGeSv 7678	-	BRA/MS
Sc and Bordas 20475	-	PRY	VRGeSv 7679	-	BRA/MS
Sc and Bordas 20599	-	PRY	VRGeSv 7680	-	BRA/MS
Schulz 18384	-	ARG	VRGeSv 7686	-	BRA/MS
Schwarz 1348	-	ARG	VRGeSv 7688	-	BRA/MS
Schwarz 5045	-	ARG	VRGeSv 7698	-	BRA/MS

Schwarz 6456	-	ARG	VRGeSv 7713	-	BRA/MS
Schwarz 9973	-	ARG	VRGeSv 7720	-	BRA/MS
Schwindt 275	-	ARG	VRsV 7719	-	BRA/GO
Shep.,Andr.,Mont. 4103	-	BRA/MG	VS 7727	-	BRA/MG
V 10392	-	BRA/MS	VS 7728	+	BRA/GO
V 10415	+	BRA/MS	VSGr 6442	-	BRA/MT
V 10430	-	BRA/MS	VSGr 6443	-	BRA/MT
V 12486	+	BRA/MT	VSGr 6450	-	BRA/GO
V 12576	-	BRA/MT	VSPmSv 13683	+	BRA/MT
V 12591	-	BRA/MT	VSPmSv 13692	-	BRA/MT
V 12606	+	BRA/MT	VSPmSv 13695	-	BRA/MT
V 13667	-	BRA/MT	VSPmW 13798	+	BRA/MT
V 13671	+	BRA/MT	VSPmWiSv 13273	-	BRA/MG
V 13680	+	BRA/MT	VSSi 5115	-	BRA/GO
V 13799	-	BRA/MT	VSSi 5153	-	BRA/GO
V 9002	-	BRA/MT	VSSv 5153	-	BRA/GO
V 9920	-	BRA/MS	VSStGdW 7745	+	BRA/GO
VApW 13936	+	BRA/GO	VSStGdW 7760	+	BRA/GO
Vi 291	-	PRY	VSStGdW 7761	-	BRA/MT
Vi 292	-	PRY	VW 5916	+	BRA/MG
VMPzW 13951	-	BRA/GO	VW 5922	-	BRA/GO
VMPzW 13964	+	BRA/MS	VW 5924	+	BRA/GO
VMPzW 13966	-	BRA/MS			

<i>A. glabrata var hagenbeckii</i>	Rust incidence	Country/ State
K 29615	-	ARG
KC 11483	-	PRY
Sc & Bordas 21285	-	PRY

<i>A. pseudovillosa</i>	Rust incidence	Country/ State
HlKHe 575	+	BRA/MT
KC 34334	-	BRA/MS
VMPzW 14064	-	BRA/MS
VPoPeJar 8729	-	BRA/MS
VQFdSv 11884	-	BRA/MS
VQFdSv 11886	-	BRA/MS
VQFdSv 11917	-	BRA/MS
VRcSgSv 13593	-	BRA/MS
VRGeSv 7695	-	BRA/MS
VRGeSv 7701	-	BRA/MS
VRGeSv 7706	-	BRA/MS
VSW 9932	-	BRA/MS

Collectors names: A=Allem, A.C.; Bz=Bertoza,M.R.; C=Cristóbal, C.L.; Co=Coradin, L.; Es=Santos, E.; Fd= França Dantas, M.S.; G=Gregory, W.C.; Gd=Godoy, I.J.; Ge=Gerin, M.A.N.; Gr= Gripp, A.; H=Hammons, R.O.; He=Hemsey, V.; Hn=Heyn, R.; J=Jank, L.; Jt=Trovo, J.B.F.; K=Krapovickas, A.; L=Langford, W.R.; Ll=Lleras, E.; M=Moss, J.P.; Nc=Costa, N.M.S.; P=Pietrarelly, J.; Pe=Penteado, M.I.O.; Pm=Pittman, R.N.; Po=Pott, A.; Pz=Pizarro, E.A.; Q=Quarin, C.L.; R=Rao, V.R.; Rc=Oliveira, R.C.; Rv=Vieira, R.F.; S= Simpson, C.E.; Sc=Schinini, A.; Sg=Singh, A.K.; Si=Silva, J.C.S.; Ss=Sano, S.M.; St=Stalker, H.T.; Sv=Silva, G.P.; V=Valls, J.F.M.; Ve=Veiga, R.F.A.; Vi=Vieira, J.G.A.; Vn=Vanni, R.O.; W=Werneck, W.L.; Wi=Williams, D.E.

3. REFERENCES.

Charchar, M.J.; D' avila and Pizarro, E.A. 1995. Doenças fúngicas em *Arachis* forrageiro no Cerrado, Brasil. *Pasturas tropicales*, 17(2):42-43.

French, E.C.; Prine, G.M.; Ocumpaugh, W.R. and Rice, R.W. 1994. Regional Experience with Forage *Arachis* in the United States. In: Kerridge, P.C.; Hardy, B.(Eds.) *Biology and Agronomy of forage Arachis* . Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colômbia. pp169-186.

Moraes, S.A. and Savy Filho, A. 1993 Reações de seis cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

a *Puccinia arachidis* Speg. Summa Phytopathologica, 9:140-153.

Pine, G.M. 1964. Forage possibilities in the genus *Arachis*. Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.24:187-196.

Prine, G.M.; Dunavin, L.S.; Moore, J.E. and Roush, R.D. 1981. "Florigraze" rhizome peanut: A perennial forage legume. Institute of Food and Agricultural Sciences. Circular S-275. Fla. Agr. Exp. Sta. Circ. S-275. 22p.

Stalker, H.T. and Moss, J.P. 1987. Speciation, cytogenetics and utilization of *Arachis* species. Advances in Agronomy, 41: 1-40.

Stalker, H.T. 1992. Utilizing *Arachis* germplasm resources. In: Nigan, S.N.(Ed.). Groundnut A global perspective. Patancheru, ICRISAT, pp. 281-295.

Subrahmanyam, P.; Moss, J.P. and Rao, V.R. 1983. Resistance to peanut rust in wild *Arachis* species. Plant Disease 67:209-212.

Subrahmanyam, P.; Reddy, L.J.; Gibbons, R.W. and McDonald, D. 1985. Peanut rust: a major threat to peanut production in the semi-arid tropics. Plant Disease 69: 813-819.

Subrahmanyam, P.; Ramanatha Rao, V.; McDonald, D.; Moss, J.P. and Gibbons, R.W. 1989. Origins of resistances to rust and late leaf spot in peanut (*Arachis hypogaea*, *Fabaceae*). Economic Botany, 43(4): 444-455.

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA VARIABILIDAD DE RAZAS TRADICIONALES DE MAÍZ (*Zea mays* L.) EN PARAGUAY ¹

Noldin, O.² y Machado, V.²

1. RESUMEN

Una gran parte del maíz que se siembra en Paraguay por pequeños y medianos agricultores corresponden a razas nativas, conociéndose muy poco sobre la relación existente entre las mismas. El Banco de Germoplasma de Maíz del CRIA conserva 583 entradas de las cuales se caracterizaron 303 de 10 razas. El objetivo del trabajo fue evaluar poblaciones nativas de maíz colectadas en 1998 para conocer la variabilidad existente entre y dentro de las razas. El experimento fue instalado en el campo experimental del Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA). La unidad experimental consistió en una hilera de 10m de largo, con plantas espaciadas a 0.25m y 0.80m entre hileras. Se tomaron datos de 10 plantas y de cinco mazorcas, en los que se evaluó: altura de planta, altura de mazorca, días a floración masculina y a femenina, intervalo entre ambas floraciones, números de hileras y granos por hilera en mazorca, longitud y diámetro de mazorca y prolificidad. Se detectaron diferencias significativas entre razas y amplia variabilidad dentro de las mismas. Se observó correlación positiva entre altura de planta y de mazorca, días a floración masculina y femenina y días a floración masculina y número de hileras; una correlación positiva entre altura de planta y diámetro de mazorca y número de hileras y granos por hilera; mientras que la correlación entre diámetro de mazorcas y prolificidad fue significativa pero negativa.

Palabras claves: maíz, raza nativa, variabilidad, correlación.

2. ABSTRACT

A great proportion of maize sowed by medium and small farmers in Paraguay corresponds to landraces, lacking knowledge about the relationship among them. Of the 583 accessions preserved in the Maize Germplasm Bank located at Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA), 303 accessions pertaining to 10 races were characterized. The objective of this work was to evaluate maize landraces accessions collected in 1998, in order to know the genetic variation among races and among accessions in each race, to use in the breeding program. The data used was collected from the characterization plots established at CRIA, where the experimental unit consisted of one row of 10 meters long, with separation of 0,80m among rows and 0,25m among plants. Data such as plant and ear height, male and female flowering time, anthesis and silk interval and ears per plant, were taken from 10 plants in each row. Ear length and diameter were taken from 5 ears collected in each row. Minimum and maximum values of the data analyzed indicated high significant differences among races and wide variability among accessions in each race. The correlation coefficient confirmed a positive relationship between plant and ear height, male and female flowering time, and male flowering time and number of kernel rows; a positive relationship between plant height and ear diameter, and between number of kernel rows and kernels in the row; while the relationship between ear diameter and ear per plant was significant but negative.

Key words: maize, landrace, genetical variation, correlation.

¹ Resumen publicado en: Felas-APROSEMP-MAG/DISE. 2004. Conferencias y resúmenes de trabajos presentados. XIX SEMINARIO PANAMERICANO DE SEMILLAS. Sesión N° 12. Ed. D. Cristaldo R. Asunción, Paraguay, p.430.

² Ing. Agr. Investigadores del Programa de Investigación de Maíz, Sorgo y Girasol (PIMSG). MAG/DIA/CRIA. Capitán Miranda, Paraguay. e-mail: pimsg@cria.org.py

3. INTRODUCCIÓN

La selección aplicada por los indígenas y agricultores a sus cultivos de maíz a través del tiempo de acuerdo al uso que le daban, fue el principal factor en definir la variabilidad genética existente entre las entradas nativas dentro de una misma raza. Estos materiales son valorados por su rusticidad y adaptación a condiciones climáticas (sequías, lluvias excesivas, etc.). Los mismos han sido mantenidos por productores pequeños a medianos y no han sido evaluados en forma extensa a causa de diversos motivos, como la falta de recursos humanos, capital y por su amplia variabilidad genética lo que influye en el tiempo dedicado por los investigadores para obtener un producto con alta capacidad de producción (variedad sintética o híbrido). Según Salhuana y Machado (1999) “el desarrollo de las razas de maíz fue simplemente un proceso de evolución en los que suceden cambios de frecuencia de gene debido principalmente a selección e hibridación y a otros factores tales como mutación, deriva genética y migración”. El Banco de Germoplasma de Maíz se encuentra situado en el Centro Regional de Investigación Agrícola (CRIA) dependiente del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). En el mismo se conservan 583 entradas de maíz, de las cuales 478 fueron colectadas en 1998 y las restantes 105 corresponden a colectas efectuadas desde la década del 40 al año 1987. Para que estos materiales puedan ser incluidos dentro de un programa de mejoramiento se debe conocer, como mínimo, sus características agronómicas para que el investigador pueda seleccionar el material que considere adecuado para su propósito. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las entradas nativas de maíz colectadas en 1998 para determinar la variación existente entre y dentro de las razas, de manera de permitir la selección de materiales con características deseables para uso en trabajos de mejoramiento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La caracterización de entradas nativas de maíz fue realizada *ex situ*, habiéndose instalado la parcela en el campo experimental del CRIA, ubicado en la localidad de Capitán Miranda Departamento de Itapúa, situada a 27°17' Sur de latitud y 55°49' Oeste de longitud y una altitud de 200msnm. La precipitación y temperatura media anual son 1732mm y 20.9°C, respectivamente. El suelo es Oxysol typic, origen basáltico. Las entradas fueron colectadas en la Región Oriental, donde se encuentra alrededor del 99% de la superficie de maíz (Salhuana y Machado, 1999). Los departamentos donde han sido colectadas dichas entradas son Concepción, San Pedro, Guairá, Caaguazú, Caazapá, Itapúa, Misiones, Paraguari, Alto Paraná, Amambay y Canindeyú, correspondientes a las zonas maiceras del Paraguay. En el experimento fueron evaluadas 303 entradas, de 10 razas diferentes de maíz nativo como se observa en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Número de entradas caracterizadas por cada raza, con el tipo de grano correspondiente

Raza	Número de entradas	Tipo de grano
Avatí Guapy	2	Harinoso
Avatí Mitâ	12	Harinoso
Avatí Morotí	67	Harinoso
Avatí Tî	17	Harinoso
Pichinga Aristado	30	Reventón
Pichinga Redondo	39	Reventón
Sapé Mototí	7	Dentado
Sapé Pytâ	39	Dentado
Tupi Morotí	53	Duro
Tupi Pytâ	37	Duro
TOTAL	303	

La unidad experimental consistió en una parcela de 10m de largo, separados por 0,8m entre hileras y 0,25m entre plantas, dando un total de 50.000 plantas/ha. La parcela cosechable fue de 8,2m² por entrada. Las semillas fueron tratadas con el insecticida Semevin (2l/100kg de semilla). La fecha de siembra fue el 06/08/98, la fertilización se realizó en el momento de emerger los plantines teniendo en cuenta el análisis de suelo. El manejo de malezas e insectos fue con tratamiento químico en el momento adecuado de aplicación.

De cada unidad experimental se tomaron medidas de 10 plantas que fueron identificadas y a la cosecha se tomaron los datos de 5 mazorcas. La cosecha del experimento se efectuó entre el 19/01/99 al 21/01/99. Se tomaron datos de características cuantitativas y cualitativas de planta, hoja, panoja y mazorca, pero sólo se presentan los resultados relevantes para una preselección de entradas con características cuantitativas deseables como la altura de planta y mazorca, días a floración masculina, femenina e intervalo entre ambas, número de hileras y granos por hilera, longitud y diámetro de mazorca, e índice de prolificidad, utilizando como guía para la toma de datos el libro "Descriptores de maíz" elaborado por CIMMYT/IBPGR (1991). Para calcular las diferencias existentes entre las medias de las razas los datos fueron analizados utilizando el parámetro estadístico "Suma de cuadrados de varios grupos" (Li, C.C., 1977), donde cada raza fue tomado como un grupo diferente. Para el Coeficiente de Variación (CV) los datos de altura de planta y mazorca, números de hilera y granos por hilera, longitud y diámetro de mazorca, e índice de prolificidad fueron transformados utilizando la fórmula $\sqrt{x+1}$. Para el cálculo de correlación entre los caracteres se utilizó el programa estadístico MSTAT-C (1991).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el **Cuadro 2** pueden observarse los resultados de valores promedios, mínimo y máximo, la prueba de significancia y el coeficiente de variación (CV) de la variación genética existente entre las razas de maíz nativo. En altura de planta y mazorca superior, el promedio entre las razas fue 167 y 105cm, respectivamente, similares a los resultados de Alvarez *et. al.* (1983) que fueron 169 y 101cm, resultando superior en ambas características el Sapé Morotí (199 y 133cm, respectivamente) y el menor Avatí Tî (141 y 83cm respectivamente). En días a floración masculina y femenina el promedio entre las razas fue 105 y 109 días, mientras que las razas más precoces fueron Avatí Mitâ y Tupí Pytâ (ambos 102 días en masculina, y 105-106 días, respectivamente en femenina), mientras que la más tardía resultó ser Sapé Morotí con 111 y 114 días, respectivamente. En el intervalo de floración (ASI) el promedio fue de 4 días, registrándose los mayores valores en el grupo de maíces harinosos (Avatí Guapy, Avatí Mitâ, Avatí Morotí y Avatí Tî). En longitud de mazorca el promedio fue 14cm, resultando superior Avatí Tî (16cm.) e inferiores las razas Avatí Guapy, Pichinga redondo y Tupí Pytâ (13cm), mientras que en diámetro de mazorcas el promedio fue 37mm entre razas, similar al obtenido por Alvarez *et. al.* (1983) que fue 40mm, siendo superior Sapé Morotí (44mm) e inferior Pichinga Redondo (31mm). En número de hilera por mazorca el promedio entre razas fue 13, coincidiendo con el resultado de Alvarez *et. al.* (1983), donde Sapé Morotí con 15 fue superior y Avatí Mitâ inferior con 12. Por su parte, en número de granos por hilera el promedio fue 28, resultando superior Pichinga Redondo (31) e inferior Avatí Mitâ (24). El promedio de índice de prolificidad fue 0,96, similar al resultado obtenido por LAMP (1991) que fue 0,93, resultando superior Pichinga Aristado (1,13) e inferior Avatí Guapy (0,87). Cabe señalar que las diferencias estadísticas entre las razas fue altamente significativa para todas las características analizadas como se visualiza con la prueba de *F calc.*, mientras que, dentro de razas se observa la tendencia de un rango alto entre el mínimo y máximo valor, a excepción de Avatí Guapy que para la mayoría de las mediciones tuvo un rango estrecho debido a que sólo fueron analizadas dos entradas. Estos resultados indican existencia de variabilidad entre y dentro de razas, y su valor para su utilización en programas de mejoramiento.

Cuadro 2. Valores promedios, máximo y mínimo de altura de planta y mazorca (cm), floración masculina, femenina e intervalo de floración (ASI), longitud y diámetro de mazorca (cm), número de hilera y granos por hileras en la mazorca, e, índice de prolificidad de la Parcela. Capitán Miranda, Itapúa. PIMSG 1998/99

Raza	Altura		Floración				Mazorca		Número		Índice										
	Planta		Maz.		Masc.		Fem.		ASI		Long.		Diám.		Hilera		Gra./hil.		Prolificidad		
	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	Prom.	Min-Max	
	(cm)		(cm)		(días)		(días)		(días)		(cm)		(mm)		(n°)		(n°)		(n°)		(n°)
Avatí Guapy	150	147-152	95	93-96	107	106-107	112	111-113	6	5-6	13	7-20	43	35-55	13	10-14	29	20-42	0.87	0.77-0.96	
Avatí Mitá	152	87-175	91	38-113	102	90-111	106	91-116	4	1-7	14	6-20	36	23-47	12	8-16	24	7-39	0.92	0.66-1.31	
Avatí Morotí	169	138-196	109	81-134	107	99-113	111	100-117	5	1-8	15	4-27	37	4-52	13	1-18	26	7-44	0.97	0.69-1.23	
Avatí Tî	141	120-154	83	63-109	105	95-109	110	98-114	6	3-9	16	8-22	37	29-51	13	10-18	29	11-44	0.92	0.68-1.21	
Pichinga Aristado	156	116-179	104	75-123	107	101-113	110	101-115	3	0-7	14	6-20	33	22-48	14	10-18	29	9-44	1.13	0.68-1.41	
Pichinga Redondo	146	88-174	93	31-118	105	92-114	108	99-118	3	0-7	13	7-22	31	21-44	14	10-22	31	11-46	1.08	0.75-1.50	
Sape Morotí	199	182-216	133	117-145	111	106-113	114	111-117	3	2-5	14	9-19	44	29-54	15	12-18	30	11-44	0.92	0.74-1.22	
Sape Pytâ	192	164-213	122	90-143	104	101-107	107	103-111	3	0-6	14	9-19	41	27-59	13	8-20	30	9-45	0.88	0.69-1.06	
Tupi Morotí	169	141-192	105	74-147	105	97-113	109	98-116	3	1-7	15	9-27	39	26-50	13	8-18	28	9-46	0.88	0.51-1.17	
Tupi Pytâ	175	134-195	103	68-132	102	97-116	105	99-114	3	-2-8	13	7-19	40	30-49	13	10-18	27	11-40	0.95	0.66-1.25	
Promedio	167		105		105		109		4		14		37		13		28		0.96		
F calc	35.9**		18.5**		8.3**		9.3**		8.9**		7.9**		34.8**		8.9**		7.0**		13.7**		
CV (%)	2.1		29.2		10.3		12.3		37.2		4.2		4.1		2.8		3.3		17.5		

En el **Cuadro 3** se visualiza los resultados del análisis de correlación entre altura de planta y mazorca, floración masculina y femenina, intervalo de floración (ASI), longitud y diámetro de mazorca, número de hileras y granos por hilera y prolificidad. Estos resultados determinaron que existe una relación positiva altamente significativa entre: 1) altura de planta y mazorca, 2) floración masculina y femenina, 3) floración masculina y número de hileras. Por su parte, existe una relación positiva significativa entre: 1) altura de planta y diámetro de mazorca, 2) número de hileras y granos por hilera. Mientras que, la relación que resultó negativa y altamente significativa fue entre diámetro de mazorcas con prolificidad. Los resultados de la relación de altura de planta y mazorca, altura de planta y diámetro de mazorca y floración masculina y número de hileras coinciden con los de Alvarez *et al.* (1983). Según el resultado de coeficiente de correlación las relaciones negativas existentes altura de altura con prolificidad no coinciden con trabajos similares (Vianna *et al.*, 1980; Robinson *et al.*, 1950; Jenkins, 1929) por lo cual convendría plantear un trabajo de correlación dentro de las razas para observar cual o cuales son las que podrían estar influenciando en estos valores.

Cuadro 3. Coeficiente de correlación para características agronómicas de 303 entradas nativas de maíz caracterizadas en 1998.

	Alt. maz	Flor. masc	Flor. fem.	ASI	Long. maz.	Diám. Maz	Nºhil.	Nºgra./hil.	Prolif
Alt.pta	0.95**	0.31	0.13	-0.53	-0.09	0.62*	0.37	0.13	-0.32
Alt.maz		0.53	0.34	-0.52	-0.11	0.54	0.55	0.26	-0.15
Flor.masc			0.95**	0.08	0.10	0.31	0.78**	0.46	0.10
Flor.fem.				0.34	0.23	0.35	0.60	0.37	-0.04
ASI					0.35	0.15	-0.04	-0.19	-0.33
Long.maz.						-0.06	-0.18	-0.18	-0.21
Diám.maz							0.06	0.05	-0.80**
Nºhil.								0.71*	0.42
Nºgra./hil.									0.20

(*) Diferencia significativa al 5%

(**) Diferencia significativa al 1%

6. CONCLUSIONES

Las diferencias entre las razas fueron altamente significativas, indicando que existe una amplia variabilidad fenotípica entre las mismas.

Los parámetros de valores mínimos y máximo dentro de las razas fueron muy amplios, pudiendo utilizarse estas diferencias en un programa de mejoramiento.

El análisis del coeficiente de correlación confirmó que existe una alta correlación positiva entre altura de planta y mazorca, floración masculina y femenina y floración masculina y número de hileras; una correlación positiva entre altura de planta y diámetro de mazorca y número de hileras y granos por hilera; mientras que, la correlación resultó negativa entre diámetro de mazorcas y prolificidad.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS

Alvarez, M.; Machado, V.; Frutos, E. y Mamola, C. 1983. Catálogo de Recursos Genéticos de Maíz de Sudamérica-Paraguay. EERA-Pergamino INTA CIRF. Pergamino, Argentina.

IBPGR. 1991. Descriptores de maíz. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, D.F./International Board for Plant Genetic Resources, Roma, Italia.

Jenkins, M.T. 1929. Correlation studies with inbred and crossbred strains of maize. *Journal of Agricultural Research*. 39(9):677-721.

LAMP (Proyecto Latino-Americano de Maíz). 1991. Catálogo del germoplasma de maíz. Tomo 2. Paraguay, p 705-744.

Li, C.C. 1977. Introducción a la estadística experimental. Trad. por Griselda Ribó. Barcelona, España. Omega. p 51-57.

Robinson, H.F.; Comstock, R.E. and Harvey, P.H. 1951. Genotypic and phenotypic correlations in corn and their implications in selection. *Agronomy Journal*. 43:283-287.

Salhuana, W. y Machado, V. 1999. Razas de maíz en Paraguay. Estados Unidos. Departamento de Agricultura de Estados Unidos y Programa de Investigación de Maíz del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Paraguay. Estados Unidos. Pub 025. p. 48-55.

Vianna, R.T.; Gomes, E.E.G.; Napolini, V.F. e E Môro, J.R. 1980. Correlações e análises do coeficiente-vector (path-coefficient) em linhagens endogâmicas de milho (*Zea mays* L.). *Ciencia e Cultura*. 32(9):1235-1242.

LESIS – LEGUMINOSAS PARA SISTEMAS SUSTENTABLES

Rebuffo, M.¹; Acuña, H.²; Monza, J.³; Ruz, E.⁴; Acosta, J.⁵; Condón, F.¹ y Zarza, R.¹

1. RESUMEN

El Proyecto “Ampliación de la base genética de leguminosas forrajeras naturalizadas para sistemas pastoriles sustentables”, financiado por el Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO) tiene por objetivo valorizar los recursos genéticos de leguminosas forrajeras templadas y sus rizobios asociados. El consorcio integrado por instituciones de investigación y académicas, asociaciones de productores y empresas comerciales realizará la colecta participativa y caracterización en Uruguay, Chile y Bolivia, con la participación de instituciones de España y Japón. Esta comunicación describe el contexto productivo en el cual se enmarca el proyecto, sus objetivos, la conformación del consorcio y las actividades iniciales desarrolladas en el 2006.

Palabras Claves: leguminosas forrajeras, *Trifolium*, *Lotus*, *Medicago*, *Rhizobium*

2. INTRODUCCIÓN

El Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO) aprobó en la Convocatoria Ordinaria 2005 el Proyecto “Ampliación de la base genética de leguminosas forrajeras naturalizadas para sistemas pastoriles sustentables”.

Este proyecto de *Leguminosas para Sistemas Sustentables (LESIS)* será ejecutado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria de Uruguay y coordinado por el Programa PROCISUR, contando en la actualidad con la participación de 12 instituciones co-ejecutoras (Ver Colaboradores).

3. OBJETIVO DE LESIS

Ampliar y valorizar los recursos genéticos de las leguminosas forrajeras naturalizadas del género *Lotus* y *Trifolium* y sus rizobios asociados para su mejoramiento y utilización agronómica en ambientes con limitaciones.

4. METAS GLOBALES

Conservar y desarrollar los recursos genéticos de especies naturalizadas de los géneros *Lotus*, *Trifolium* y *Medicago* de valor agronómico y caracterizar la diversidad genética de poblaciones nativas o naturalizadas de *Rhizobium*.

Esta meta se alcanzará mediante una colecta participativa y la caracterización de poblaciones naturalizadas en relación con la adaptación natural al pastoreo y estrés biótico, así como las respuestas bioquímico-fisiológicas frente a estrés abiótico. En una fase más aplicada se evaluará participativamente la calidad de insumos y procesos (planta-rizobio) utilizados por los productores en la implantación de leguminosas y su impacto en la eficiencia de la cadena productiva.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

² Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile.

³ Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁴ Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial Del Cono Sur (PROCISUR), Montevideo, Uruguay.

⁵ Cooperativas Agrarias Federadas (CAF), Montevideo, Uruguay.

5. FIGURAS INNOVADORAS DEL PROYECTO

Instituciones de investigación y académicas, junto a empresas y asociaciones de productores realizarán la co-ejecución del proyecto. Esta integración determina que LESIS sea uno de los pocos ejemplos donde la participación de los productores se integra a la investigación en el área de recursos genéticos de leguminosas forrajeras templadas y sus simbioses y simultáneamente participan en la caracterización de la calidad de insumos y procesos de sus predios, permitiendo medir el impacto en la implantación de las leguminosas y por ende en el resultado económico de las empresas. Este equipo multidisciplinario generará conocimiento y materiales en relación a las características de adaptación a condiciones ambientales restrictivas para su posterior uso en mejoramiento genético. La utilización de investigación básica en fisiología y genética permitirá acelerar la identificación de germoplasma adaptado a las condiciones restrictivas objetivo del proyecto. La construcción de programas de mejoramiento orientados al desarrollo de cultivares mejorados adaptados a estreses ambientales, asistidos por el conocimiento de productores y extensionistas sobre los agrosistemas, aparece como una estrategia factible para incrementar la productividad de las áreas de pastoreo, factor esencial para mejorar la producción pecuaria.

6. EL CONTEXTO PRODUCTIVO

Las producciones vacuna y ovina representan una importante porción del producto nacional bruto en los países del Cono Sur de América Latina. La mejora de la producción animal está limitada por la productividad, calidad y extensión de las pasturas naturales, que representan más de 70% del área pastoril total. Las pasturas basadas en leguminosas forrajeras se han adoptado en sistemas intensivos, particularmente en rotaciones de cereales con leguminosas perennes. La pequeña proporción de pasturas cultivadas refleja las dificultades para lograr la implantación y persistencia de las especies de leguminosas introducidas.

7. LAS ESPECIES DE LEGUMINOSAS ADAPTADAS

El cultivo de las leguminosas forrajeras en América del Sur comenzó con complejas mezclas de semilla introducidas de diversos orígenes. Las principales especies perennes adaptadas a los ecosistemas del Cono Sur son *Lotus corniculatus* L., *Trifolium repens* L., *T. pratense* L., *Medicago sativa* L., *L. uliginosus* Schkuhr, *L. glaber* Mill. (Rebuffo y Abadie, 2001). Dentro de las anuales se destacan *M. polymorpha* L., *L. subbiflorus* Lag., *T. subterraneum* L., *T. michelianum* L., *T. resupinatum* L., *T. incarnatum* L., *T. vesiculosum* Savi, *Ornithopus compressus* L., *O. Sativus* Brot., *Biserrula pelecinus* L. Estas especies crecen en pasturas naturales y/o cultivadas y sus áreas de distribución varían con las condiciones edáficas y climáticas. Uno de los usos más destacados de las leguminosas perennes en la región es el uso en sistemas de rotación con cultivos de arroz, trigo, cebada, soja, maíz, girasol. La adopción por parte de los productores de leguminosas para esta rotación permite el mantenimiento de los sistemas agrícolas en áreas marginales de la región. A pesar de la adaptación de muchas especies perennes a la región, su producción está limitada por diversas restricciones medioambientales, tales como sequía y anegamiento, acidez del suelo, enfermedades y plagas, que afectan la implantación, crecimiento y persistencia.

8. LOS RECURSOS GENÉTICOS DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS NATURALIZADAS

Debido a la creciente presión impuesta por la expansión de los cultivos, las pasturas se cultivan cada vez más al límite de su adaptación, en áreas donde la habilidad para sobrevivir estreses ambientales se ha tornado una característica esencial del éxito. Las colectas de mayor utilidad en mejoramiento genético se basaron en el conocimiento de poblaciones locales provenientes de pasturas viejas (Hijano y Navarro, 1995; Olmos, 2004; Ortega *et al.*, 1991; 1994), o de semilla mantenida por los productores, que han generado poblaciones naturalizadas adaptadas al

pastoreo (Acuña *et al.*, 2002; Ovalle *et al.*, 2003; Rebuffo y Abadie, 2001; Rebuffo *et al.*, 2005; Ulanovsky *et al.*, 1990; Urzúa y Torre, 1985). Las poblaciones naturalizadas han mostrado una marcada variación y adaptación a condiciones de estrés abiótico y manejo del pastoreo, cuando fueron llevadas a ambientes comunes (Acuña *et al.*, 2002; Campos y Ortega, 2001; Olmos, 2004; Ortega *et al.*, 1994; Rebuffo y Abadie, 2001; Rebuffo *et al.*, 2005). La comprensión de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que confieren tolerancia a estrés hídrico es importante en términos de desarrollo de estrategias de selección y mejoramiento genético. El estrés por sequía lleva a una serie de ajustes fisiológicos y bioquímicos encadenados que van desde el cierre estomático a la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Las plantas logran superar el daño oxidativo por acciones coordinadas de mecanismos antioxidantes no enzimáticos mediados por moléculas tales como los carotenos, ascorbato, prolina y glutatión, así como enzimáticos relacionados con las actividades superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasas (Borsani *et al.*, 2001). Se ha encontrado que existe relación entre la actividad enzimas antioxidantes y la tolerancia al estrés ambiental. Por lo tanto, para comprender mejor los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que subyacen a la tolerancia diferencial a la sequía es necesario evaluar parámetros de este tipo (Vance, 2001).

9. LAS LEGUMINOSAS Y SU RELACIÓN CON LOS SIMBIOTES

La fijación biológica de nitrógeno está limitada en algunos ecosistemas por poblaciones naturalizadas de cepas de rizobios incompatibles con las especies cultivadas. En Uruguay se ha determinado que las poblaciones nativas de rizobios efectivas en *L. corniculatus* resultan inefectivas en *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* (Barrientos *et al.*, 2002), lo que dificulta su introducción en campos con historia previa de *L. corniculatus*. En Chile se han determinado cepas con incompatibilidad similar, así como poblaciones nativas que nodulan efectivamente *L. uliginosus* (Acuña *et al.*, 2004). Asimismo, las poblaciones nativas de rizobios asociados a tréboles nativos, resultan en general inefectivas o parasitarias en las principales especies introducidas de tréboles (ej: *T. pratense*; Labandera y Vincent, 1975; Urzúa y Torres, 1985). De manera similar, existen poblaciones nativas de rizobios que resultan efectivas en especies anuales del género *Medicago* e inefectivas en alfalfa.

La especificidad de cepas para especies de los géneros *Lotus*, *Trifolium* y *Medicago* determina que la introducción y mejoramiento genético de especies cultivadas deba ir acompañado de un programa de selección de cepas de rizobios que posibilite la disponibilidad de inoculantes comerciales específicos. En Uruguay se utilizan inoculantes fabricados con cepas seleccionadas desde 1960 para las diferentes alternativas forrajeras, lo cual puede explicar la presencia de poblaciones naturalizadas de rizobios adaptadas a las condiciones de suelo y clima de Uruguay. La utilización de leguminosas forrajeras con buena nodulación se traduce en incrementos de la materia orgánica de los sistemas de rotaciones agrícolas, que pueden alcanzar niveles 8 veces más altos que en los sistemas de monocultivo, transformándose en sistemas sustentables (Díaz-Rossello, 1994).

10. LA UTILIZACIÓN DE MATERIALES ADAPTADOS EN MEJORAMIENTO GENÉTICO

La creación de materiales genéticos adaptados a condiciones marginales y superiores en rendimiento y/o resistencia a factores adversos (biológicos o químicos) es uno de los componentes fundamentales de cualquier sistema de producción sustentable. La selección natural así como la introgresión de poblaciones locales llevaron al desarrollo de ecotipos adaptados, con los consecuentes aumentos en adaptación y variabilidad intra-específica (Olmos, 2004; Rebuffo y Abadie, 2001; Rebuffo *et al.*, 2005; Ulloa *et al.*, 2003). La utilización de ecotipos en mejoramiento genético ha permitido desarrollar nuevos cultivares con mayor productividad y persistencia (ej: *L. corniculatus* INIA Draco, Rebuffo *et al.*, 2005; *T. pratense*, Ortega *et al.*, 1997). San Gabriel y Estanzuela Ganador, ejemplos destacados de cultivares

locales de *L. corniculatus*, rinden el doble de forraje que los cultivares americanos en Uruguay (García *et al.*, 1988).

11. LA PARTICIPACIÓN DE LOS PRODUCTORES

El Proyecto LESIS se concentrará en las principales especies perennes y anuales de los géneros *Lotus*, *Trifolium* y *Medicago*, con énfasis diferencial en función de los ecosistemas marginales de cada región. La participación de los productores y su conocimiento asociado es fundamental para identificar potenciales diferencias ecotípicas, especialmente en la información referida al número de generaciones en el mismo sitio, el origen genético y manejo de pastoreo al que han estado sometidas (Rebuffo *et al.*, 2005). El riesgo de erosión genética ha aumentado recientemente en la región debido a los cambios progresivos en la estructura rural, la especialización productiva, extensión del monocultivo de soja, la nivelación de los ambientes impuestos por las modificaciones de los ecosistemas agrícolas, la sustitución de las poblaciones naturalizadas por nuevas variedades nacionales o importadas (Rebuffo y Abadie, 2001; Rebuffo *et al.*, 2005). El conjunto de estos factores han puesto en serio riesgo el mantenimiento de las poblaciones naturalizadas que han acumulado las presiones de selección y la evolución natural que caracteriza el desarrollo de variedades criollas.

12. ARTICULACIÓN DEL PROYECTO LESIS CON LAS CADENAS PRODUCTIVAS

El desarrollo del proyecto se apoya directamente en el sistema productivo de la región, tanto por tener a los predios comerciales como fuente del germoplasma a prospectar, así como por ser los productores, sus agremiaciones y las empresas vinculadas, los destinatarios finales de los productos del Proyecto.

En definitiva, los resultados del proyecto se dirigen a mejorar la producción pecuaria mediante la calidad de insumos y procesos así como el desarrollo de nuevos cultivares e inoculantes, cuya base proviene del material colectado en los predios de la región. Productores representados por las Agremiaciones Regionales y Empresas estarán involucrados en la colecta del material genético. Las instituciones de investigación realizarán la caracterización del material colectado para su incorporación en los programas de mejoramiento genético y selección de cepas, cuyos productos serán comercializados por los sistemas cooperativos y empresas de la región.

Este proyecto cuenta con una contraparte en los países muy bien estructurada a través de la Red de Recursos Genéticos de PROCISUR (REGENSUR) y complementa los esfuerzos realizados en el pasado (<http://www.procisur.org.uy/online/regensur.asp>). Esto garantiza que el germoplasma y los resultados técnicos generados en el proyecto, tendrán una continuidad en los programas de mejoramiento genético de los respectivos países. Este proyecto está dentro de los objetivos de las líneas estratégicas definidas por los países de la región (PROCISUR): Recursos Naturales y Agricultura Sustentable, Cadenas Agroindustriales, Recursos Genéticos y Biotecnología.

13. COLABORADORES DEL PROYECTO LESIS

13.1. Institutos de Investigación de Uruguay, Chile, Bolivia, España y Japón.

13.1.1. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay (INIA) es el organismo ejecutor del proyecto. Mónica Rebuffo (Mejoramiento Genético), Federico Condón (Recursos Genéticos), Rosario Alzugaray (Entomología), María Bemhaja (Ecofisiología), Diego Risso (Fisiología y Manejo), Walter Ayala (Fisiología Vegetal), Raúl Bermúdez (Manejo de Pasturas), Nora Altier (Fitopatología) y Marcos Dallariza (Biología Molecular)

13.1.2. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile (INIA-CI) es el organismo de enlace en Chile. Hernán Acuña Pommiez (Manejo de Pasturas), Carlos Ovalle Molina (Fisiología), Patricio Soto Ortiz (Producción), Fernando Ortega (Mejoramiento Genético), Oriella Romero (Manejo de Pasturas), Rafael Galdames (Rizobiología), Ivette Seguel (Recursos Genéticos), Nolberto Teuber (Mejoramiento Genético), Alfredo Torres (Fisiología y Manejo) y Alejandro del Pozo (Fisiología Vegetal) de la *Universidad de Concepción, Chile*

13.1.3. Centro de Investigación en Forrajes "La Violeta" (CIF)-FCAP- UMSS, Bolivia. Jorge Delgado y Ruddy Meneses (Fisiología y Manejo)

13.1.4. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas– España (CSIC). Juan Sanjuán (Genética – Rizobiología)

13.1.5. National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Japón. Sachiko Isobe (Biología Molecular)

13.2. Instituciones Académicas de Uruguay, Chile y España.

13.2.1. Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay (FAGRO). Jorge Monza (Fisiología y Bioquímica del estrés), Pedro Díaz (Fisiología y Bioquímica del estrés), Susana Gonnet (Fijación Biológica de Nitrógeno), Omar Borsani (Fisiología del estrés), Pilar Irisarri (Rizobiología), Mariana Sotelo (Fisiología Vegetal), Clara Pritsch (Biología Molecular)

13.2.2. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile (UACH). Oscar Balocchi Leonelli (Ecofisiología), Dante Pinochet Tejos (Fisiología del estrés), Ignacio López Campbell (Ecología de Praderas)

13.2.3. Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España (USEV). Antonio J. Márquez (Bioquímica del estrés)

13.3. Asociaciones de Productores y Empresas de Uruguay y Chile.

13.3.1. Cooperativas Agrarias Federadas, Uruguay (CAF). Gastón Rico Menge (Gerente y Economista) y Jorge Acosta Soto (Relaciones Públicas, Extensionista)

13.3.2. Biosemillas Ltda., Chile. Mario A. Grez Badilla y Juan Carlos Palma (Jefe Técnico)

13.3.3. Calister S.A., Uruguay. Guillermo Arrospide (Director)

13.3.4. Enzur S.A., Uruguay. Miguel Castiglioni (Director Técnico, Microbiología Industrial)

13.3.5. Lage S.A., Uruguay. Pedro Lage (Director)

13.4. Coordinación

Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial Del Cono Sur (PROCISUR). Emilio Ruz (Secretario Ejecutivo) coordinará la relación interinstitucional y la divulgación de los resultados del proyecto.

14. PRIMERAS ACTIVIDADES DEL PROYECTO LESIS

14.1. Foro de Difusión y Lanzamiento del Proyecto

PROCISUR, junto con la Cámara Mercantil de Productos del País (CMPP), la Cámara Uruguaya de Semillas (CUS) e INIA Uruguay, organizaron el miércoles 9 de agosto de 2006 el Foro de Difusión y Lanzamiento del Proyecto, en Montevideo. Esta primera instancia de difusión de objetivos fue de particular relevancia para lograr que los diferentes actores del sector agropecuario se involucren activamente en el proyecto. Las presentaciones destacaron el significado de los fondos del FONTAGRO en la financiación, así como la conformación multidisciplinaria del consorcio interinstitucional. En particular, se destacó la importancia que el proyecto le asigna a la participación desde el inicio a los productores y empresas vinculadas al sector productivo, estimulando una mayor difusión de los objetivos para ampliar al máximo la participación y fundamentalmente la adopción de resultados.

14.2. Primer Taller Técnico del Proyecto LESIS

El 10 de agosto 2006 en las instalaciones de la Estación Experimental La Estanzuela se realizó el Primer Taller de planificación de las actividades del Proyecto LESIS. Con la participación de técnicos de INIA, FAGRO, INIA-CI, CIF y CALI se realizó el análisis de las actividades planteadas en el POA 2006 presentado a FONTAGRO. El objetivo central del taller fue coordinar las actividades de investigación y difusión de las instituciones de los países de la región, especialmente en cuanto a las metas a alcanzar en el 2006 en términos de especies prioritarias así como en disciplinas involucradas en la ejecución de los objetivos específicos del proyecto. La discusión general permitió identificar a *T. pratense* como una especie prioritaria para Chile y Uruguay, especie en la cual también tiene interés Bolivia y Japón. La confluencia de intereses comunes en *T. pratense* está basada en las similitudes de ciclo de crecimiento de trébol rojo en Uruguay y Chile, el marcado interés en el potencial de crecimiento invernal de las poblaciones naturalizadas y la misma problemática sanitaria que reduce la persistencia (podredumbres de raíz y corona). Estos aspectos comunes permitirán proceder a la planificación conjunta de actividades específicas (por ejemplo, metodologías de investigación y testigos comunes), como forma de complementar la información generada en cada país con el objetivo de generar una base de datos de resultados del Proyecto LESIS.

15. INICIO DE LA INVESTIGACIÓN EN EL 2006

15.1. Colecta y caracterización de germoplasma

Desde 1999 se han conservado 147 entradas de leguminosas forrajeras en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (Rebuffo *et al.*, 2005). Todas estas entradas provienen de cosecha propia en los establecimientos agropecuarios, por lo que corresponden a las leguminosas con mayor área de utilización en el país (85 entradas de *L. corniculatus*, 32 de *T. pratense*, 21 de *M. sativa* y 9 de *T. repens*). Esta colecta se ha realizado en forma participativa, vinculando la investigación desarrollada en INIA La Estanzuela con productores individuales y técnicos asesores, que a su vez pertenecen a diversas asociaciones de productores y cooperativas agropecuarias. El poder germinativo de 52 entradas está por debajo de los estándares comerciales de Uruguay y de al menos 19 de estas entradas no será posible obtener nuevas muestras debido a que los productores perdieron sus cultivos, principalmente durante la sequía 1999/2000. A la colección, que incluye una ficha de colecta y registro de datos histórico-culturales, se han incorporado 31 entradas con el inicio de Proyecto LESIS. A su vez se ha iniciado la caracterización productiva de esta colección en parcelas, sembrándose tres experimentos con 16 poblaciones de *L. corniculatus* en tres sitios experimentales (Palo a Pique, Treinta y Tres; Glencoe, Tacuarembó; La Estanzuela, Colonia).

A la fecha, en Chile se cuenta con 51 poblaciones de *T. repens* y una preselección de nueve de estos materiales de buen comportamiento bajo pastoreo. En los próximos meses se iniciará la caracterización de los genotipos preseleccionados en condiciones de estreses hídrico, de pH,

toxicidad de Al y fósforo en el suelo, en ambiente controlado y bajo pastoreo. En *T. pratense* existe una colección de germoplasma, producto de colectas realizadas en Chile, que será caracterizada frente a estreses bióticos, tales como resistencia a *Fusarium* y ataque de insectos. En el verano 2005/2006 se colectó semilla de 20 poblaciones de especies anuales del género *Trifolium* y otras leguminosas naturalizadas en la zona centro-sur del país; se está iniciando la identificación botánica de estos materiales.

15.2. Colecta y caracterización de rizobios

En Uruguay se ha realizado la colecta de rizobios que nodulan *L. corniculatus* y *T. pratense* de dos regiones de Uruguay con suelos contrastantes en lo que respecta a la disponibilidad de agua. Las regiones de muestreo fueron seleccionadas en base al mapa de cobertura vegetal proporcionado por la Unidad de Agroclima y Sistema de Información, Uruguay (GRAS). La colaboración de cooperativas y técnicos asesores ha permitido localizar 7 sitios que tenían déficit hídrico desde Noviembre 2005 en el Norte del país y 7 sitios sin déficit hídrico en el Sur. En cada sitio de colecta se tomaron muestras de plantas, panes de suelo con tapiz y muestras de suelo. La diversidad de cepas aisladas de nódulos y de suelo se está evaluando a través de marcadores moleculares (PCR-fingerprinting). Hasta el momento se han realizado más de 1000 aislamientos de estas dos regiones, que constituyen la mayor parte de los recursos genéticos microbianos que se estudiarán en Uruguay.

15.3. Calidad de insumos

La calidad genética y física de semillas y los procesos de inoculación que utilizan los productores incide en la implantación de leguminosas y por lo tanto en la eficiencia de la cadena productiva. Las Cooperativas Agrarias Federadas, que poseen una infraestructura y un cometido que facilita el contacto y articulación en forma directa con los productores de Uruguay, liderarán esta actividad. La realización de un taller de planificación con los técnicos asesores de diferentes regiones permitirá analizar los posibles escenarios y poblaciones de interés en el área de producción de semilla forrajera. El diagnóstico de las principales limitantes que enfrenta el productor permitirá diseñar experimentos dirigidos a demostrar el impacto productivo así como realizar el análisis económico de la incidencia de la calidad de insumos en el proceso productivo.

16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, H.; Figueroa, M.; de la Fuente, A.; Ortega, A. F. y Fuentes, C. 2002. Comportamiento de cvs. de *Lotus corniculatus* L. en diferentes ambientes de la VIII y IX Regiones de Chile. *Agrociencia* 18(2):75-84.

Acuña, H.; Hellman, P.; Barrientos, L.; Figueroa, M. y de la Fuente, A. 2004. Estimación de la fijación de N de tres especies del género *Lotus*, por el método de la dilución isotópica. *Agrociencia* 20(1):5-15.

Barrientos, L.; Higuera, M.; Acuña, H.; Guerrero, J.; Ortega, F. y Segue, L. 2002. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. *Agricultura Técnica (Chile)* 62(2):226-236.

Borsani, O.; Díaz, P.; Aguis, F.; Valpuesta, V. and Monza, J. 2001. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Science* 161:757-763.

Campos de Quiroz, H. y Ortega, F. 2001. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 122:61-67.

Díaz Rossello, R. 1994. Long-term Changes of Soil Carbon and Nitrogen under Rotation of

Legume Pastures and Arable Crops. Transactions of the 15th World Congress of Soil Science 9: 304-305.

García, J.A.; Rebuffo, M. y Astor, D. 1988. Performance de variedades forrajeras en La Estanzuela. Variedades forrajeras II. MGAP-CIAAB, Miscelanea No. 68, 15 p.

Hijano, D.H. y Navarro, H. (ed.). 1995. La alfalfa en la Argentina. INTA, San Juan Enciclopedia Agro de Cuyo; manuales n°. 11. 287 p.

Labandera, C. and Vincent, J.M. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. Plant and Soil 42:327-347.

Olmos, F. 2004. Factores que afectan la persistencia y productividad de pasturas mejoradas con trébol blanco (*Trifolium repens* L.). INIA, Montevideo. Serie Técnica N°. 145. 248 p.

Ortega, F.; Romero, O. y Galdames, R. 1991. Evaluación de cultivares de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). (cv. Quiñequeli) en la novena región. Agricultura Técnica (Chile) 51:138-144.

Ortega, F.; Demanet, R.; Paladines, O. y Medel, M. 1994. Colecta y caracterización de poblaciones de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en la zona sur de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 54: 30-38.

Ortega, F.; Galdames, R. y Aguilera, A. 1997. Fitomejoramiento de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). 2. Comportamiento de una prueba de progenies y sus relaciones con el bloque de policruzamiento. Agricultura Técnica (Chile) 57:79-86.

Ovalle, C.; Bustos, P.; del Pozo, A.; Avendaño, J. y Arredondo, S. 2003. Caracterización preliminar de una colección de leguminosas forrajeras anuales para la zona mediterránea de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 63:156-168.

Rebuffo, M. and Abadie, T. 2001. Genetic resources for temperate areas: achievements and perspectives. Proc.XIX Int.Grassl.Congress, Sao Pedro, Brasil, 469-475.

Rebuffo, M.; Condón, F. y Alzugzray, R. 2005. Variedades criollas de forrajeras templadas: conservación y uso en mejoramiento genético. Agrociencia (Uruguay) IX (1/2):105-114.

Vance, C.P. 2001. Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiology 127:390-397.

Ulanovsky, S.; Elechosa, M.; Fukuoka, H. and Inami, S. 1990. Collecting alfalfa germplasm in Argentina. Plant Genetic Resources Newsletter 81/82:46.

Ulloa, O.; Ortega, F. and Campos de Quiroz, H. 2003. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. Genome 46:529-535.

Urzúa, H. y Torres, M.E. 1985. Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. 2. Respuesta del trébol blanco y rosado a la inoculación con cepas efectivas de *Rhizobium trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. Ciencia e Investigación Agraria (Chile) 45:15-21.

UNA OPORTUNIDAD PARA LA INVESTIGACIÓN COOPERATIVA: LA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DEL CONSORCIO LOTASSA

Condon, F.^{1,2}, Rebuffo, M.¹ y Messa, A.¹

1. RESUMEN

El Proyecto LOTASSA busca desarrollar herramientas biotecnológicas y biológicas que permitan mejorar la adaptación de especies cultivadas del género *Lotus*, tales como *L. corniculatus* L., *L. uliginosus* (Schkuhr), *L. glaber* (Mill), *L. subbiflorus* (Lagasca) a los ambientes, donde restricciones impuestas por factores abióticos (sequía, acidez y salinidad) restringen la persistencia y productividad de las pasturas. El Proyecto utilizará la especie modelo *Lotus japonicus* (Regel) Larsen para generar conocimientos sobre la tolerancia a estreses abióticos y sus herramientas genómicas como puente para aplicar estos conocimientos en las especies cultivadas. La colección de germoplasma y su base de datos asociada están centralizadas en INIA Uruguay y PROCISUR, respectivamente, con el objetivo de hacer disponibles materiales genéticos uniformes a todos los participantes del proyecto.

Palabras claves: LOTASSA, *Lotus*, germoplasma, proyecto cooperativo, especie modelo

2. INTRODUCCIÓN.

En el Cono Sur de Latinoamérica hay más de 45 millones de hectáreas de pasturas que podrían ser mejoradas con leguminosas forrajeras, ya que éstas son ricas en proteína y tienen capacidad para aportar N al suelo gracias a su simbiosis con bacterias fijadoras de N atmosférico. El género *Lotus* es uno de los géneros de leguminosas que ha sido históricamente utilizado en la región. El proyecto LOTASSA-PL 517617 (INCO) titulado “Resources for Adaptation and Sustainable Production of Forage *Lotus* Species in Environmentally-Constrained South-American Soils” tiene por objetivo el aprovechar la especie modelo *Lotus japonicus* (Regel) Larsen para desarrollar herramientas que permitan acelerar el proceso de mejoramiento de especies cultivadas de *Lotus* (*L. corniculatus* L., *L. glaber* (Mill), *L. uliginosus* (Schkuhr) y *L. subbiflorus* (Lagasca)) para su adaptación a ambientes con limitantes dadas por estreses abióticos (sequía, salinidad y acidez). En paralelo, el proyecto trabajará con el desarrollo de líneas de rizobio que garanticen una fijación óptima de nitrógeno en estos suelos, como forma de mejorar la productividad, calidad y sostenibilidad de las pasturas de *Lotus* en suelos marginales.

3. EL CONSORCIO LOTASSA

El Proyecto LOTASSA está formado por 14 instituciones y 16 grupos de investigación (**Tabla 1**) que constituyen el Consorcio, con integrantes pertenecientes a cuatro países de Latinoamérica (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay) y cuatro países de Europa (Alemania, Dinamarca, España y Eslovaquia), además de PROCISUR (Proyecto Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur). Mayor detalle del Proyecto LOTASSA y sus participantes se puede obtener en el sitio web del mismo, ubicado en <http://www.lotassa.org>.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Rta 50 Km. 11, Colonia, Uruguay.

² Email para correspondencia: fcondon@le.inia.org.uy

Tabla 1. Institutos y países participantes en el Proyecto LOTASSA

Nombre del Participante	País
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Coordinador) *	España
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria	Uruguay
Instituto Max Planck de Fisiología Vegetal Molecular MPI-MP	Alemania
Facultad de Agronomía -Universidad de la República	Uruguay
CONICET-Instituto Tecnológico de Chascomús, IIB-INTECH	Argentina
Universidad de Aarhus	Dinamarca
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria	Chile
Universidad de Sevilla	España
Universidad de Munich	Alemania
Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS*	Brasil
Academia Eslovaca de Ciencias	Eslovaquia
Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca	Uruguay
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Instituto Fitopatología y Fisiología Vegetal	Argentina
PROCISUR	Uruguay

* Instituciones con dos grupos de investigación participantes en el Proyecto LOTASSA

4. LA ESTRATEGIA DE LOTASSA

La estrategia propuesta por el Proyecto LOTASSA consiste en caracterizar la respuesta de la especie modelo y de las especies cultivadas frente a los estreses de interés, en paralelo con la identificación y desarrollo de líneas contrastantes en su tolerancia a los mismos. Dependiendo del estrés, se caracterizará la respuesta fisiológica, genómica y/o metabólica, con el objetivo de identificar marcadores genéticos y/o metabólicos asociados con la tolerancia a los estreses (la salinidad, acidez y sequía). En el aspecto genético de la tolerancia a estrés abiótico se estará trabajando con al menos cinco genes candidatos; estos marcadores identificados serán validados en poblaciones de las especies cultivadas de *Lotus*, como estrategia para facilitar el progreso de la selección por tolerancia a los estreses de interés. Complementariamente a la estrategia de estudio en planta, también se busca mejorar la sobrevivencia de rizobios y su eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno en las mismas condiciones de estrés. Con este objetivo se aislarán, caracterizarán y seleccionarán cepas de rizobio adaptadas a suelos existentes en la región que presentan los estreses abióticos objetivos del Proyecto.

En síntesis, LOTASSA tiene por objetivo contribuir a la sustentabilidad de las pasturas en el Cono Sur de Latinoamérica, mediante la generación de herramientas biotecnológicas y productos biológicos que permitan desarrollar una mejor adaptación de las especies forrajeras de *Lotus* a suelos que sufren de sequía, acidez ó salinidad. Un elemento fundamental para que esta estrategia sea exitosa es poder obtener resultados que sean comparables e intercambiables entre los distintos grupos de investigación, como forma de potenciar el conocimiento regional y desarrollar herramientas que sean útiles a los diferentes socios del Consorcio. Esto implica que los diferentes grupos del Consorcio compartan los resultados obtenidos en el desarrollo y validación de metodologías de evaluación, buscando evitar duplicaciones de investigación.

5. LA COLECCIÓN

Uno de los objetivos específicos es desarrollar la colección activa de germoplasma, tanto de los genotipos de la especie modelo (*Lotus japonicus*), como de los híbridos inter-específicos y de los genotipos y poblaciones de referencia de las especies cultivadas aportados por los miembros del Consorcio, así como del germoplasma generado en el transcurso del Proyecto. El propósito de esta colección es facilitar el intercambio, manteniendo y distribuyendo los mismos genotipos entre los diferentes socios. Se ha puesto un especial énfasis en esta actividad del Proyecto, ya que también existen dificultades para el intercambio de germoplasma debido a la complejidad de requisitos fitosanitarios, especialmente entre los países del Cono Sur. Igualmente se utilizó la oportunidad para ajustar el uso de un único Acuerdo de Transferencia de Materiales en el Consorcio.

Para alcanzar el objetivo establecido en el párrafo anterior, el banco de germoplasma de INIA La Estanzuela funcionará como banco de referencia del Proyecto LOTASSA. En él se depositarán aquellos materiales que deben ser usados como testigos y compartidos como base para los estudios y se hará la distribución a los demás socios del Consorcio. De esta forma se logrará que exactamente el mismo material genético esté disponible para todos los equipos de investigación durante los 3 años de duración de LOTASSA (del 01/12/05 al 30/11/08). El procedimiento de establecer colecciones de referencia ha sido llevada a cabo en mucho mayor escala para organismos modelo como *Arabidopsis* (Meinke y Scholl, 2003), para la cual existen “stocks centers” donde no sólo se mantiene y distribuye públicamente germoplasma experimental de dicha especie, sino que además se mantiene disponible la información genética. En el caso de la colección LOTASSA, inicialmente se encuentra formada por un número limitado de genotipos, pero su número aumentará con la conservación y distribución del germoplasma que se desarrolle en el marco del Proyecto.

6. METODOLOGÍA Y OBJETIVOS

El Proyecto comenzó sus actividades con la primera reunión de los participantes del Consorcio llevada a cabo del 5 al 7 de diciembre del 2005 en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. En esta reunión se ajustó el comienzo de actividades, así como la discusión de los componentes de las bases de datos de la colección de germoplasma vegetal y de microorganismos del Consorcio, así como la metodología y protocolo a usar para el intercambio de germoplasma vegetal. A partir de este momento se comenzó la actividad de formación de la colección del Proyecto. Hasta Julio del 2006 la colección está compuesta por un total de 16 entradas (dos entradas de *L. japonicus*, una de *L. filicaulis* Durieu, una de *L. burtii* Borsos, seis entradas de *L. corniculatus*, dos de *L. uliginosus*, una de *L. subbiflorus* y tres de *L. glaber*). En el primer semestre del Proyecto se ha llevado a cabo la distribución inicial, con un total de 79 intercambios con los 15 laboratorios del Consorcio que llevan a cabo investigación en planta y rizobio. También se comenzó con la multiplicación de las entradas de *L. japonicus*, provenientes de la Universidad de Aarhus, con el objetivo de aumentar el volumen de semilla disponible para el uso del Proyecto. Como parte de esta actividad, desde 2004 se ha iniciado la multiplicación en INIA La Estanzuela de los materiales parentales de la planta modelo (*L. japonicus* MG20, *L. japonicus* Gifu, *L. filicaulis*, *L. burtii*) con el objetivo de generar un stock de semillas suficiente como para atender las necesidades del Consorcio. Las próximas multiplicaciones corresponden a líneas recombinantes (RILs) de la cruce inter específica de *L. japonicus* x *L. filicaulis*, que se ha llevado a cabo con el objetivo de estudiar la genética de la interacción entre planta y los diferentes géneros de rizobios, que tienen comportamiento diferencial en cuanto a la fijación de nitrógeno en diferentes especies (Sandal *et al.*, 2006). En el futuro, la colección de germoplasma del Proyecto LOTASSA contará con líneas de germoplasma desarrolladas por el Consorcio tanto de las especies cultivadas (líneas seleccionadas por su tolerancia a estreses por sequía, acidez o salinidad), como mutantes generados por TILLING (Perry *et al.*, 2003) en las especies

modelos para los 5 genes candidatos relacionados con el comportamiento frente a los estreses de interés.

La colección se enriquece con la información generada por los participantes del Consorcio, que estará en la base de datos ubicada en el sitio web. Esta base de datos, que estará disponible exclusivamente para los miembros del Proyecto en los primeros años, está siendo desarrollada por PROCISUR, en alianza con la unidad de documentación de recursos genéticos de INTA Argentina, liderado por Julio Tilleria.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Meink, D. and Scholl, R. 2003. The preservation of plant genetic resources. Experiences with *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133:1046-1050.

Perry, J.A.; Wang, T.L.; Welham, T.J.; Gardner, S.; Pike, J.M.; Yoshida, S. and Parniske, M. 2003. A TILLING Reverse Genetics Tool and a Web-Accessible Collection of Mutants of the Legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131: 866-871.

Sandal, N.; Petersen, T.R.; Murray, J.; Umehara, Y.; Karas, B.; Yano, K.; Kumagai, H.; Yoshikawa, M.; Saito, K.; Hayashi, M.; Murakami, Y.; Wang, X.; Hakoyama, T.; Imaizumi-Anraku, H.; Sato, S.; Kato, T.; Chen, W.; Hossain, M.D.S.; Shibata, S.; Wang, T.L.; Yokota, K.; Larsen, K.; Kanamori, N.; Madsen, E.; Radutoiu, S.; Madsen, L.H.; Radu, T.G.; Krusell, L.; Ooki, Y.; Banba, M.; Betti, M.; Rispail, N.; Skot, L.; Tuck, E.; Perry, J.; Yoshida, S.; Vickers, K.; Pike, J.; Mulder, L.; Charpentier, M.; Müller, J.; Ohtomo, R.; Kojima, T.; Ando, S.; Marquez, A.J.; Gresshoff, P.M.; Harada, K.; Webb, J.; Hata, S.; Suganuma, N.; Kouchi, H.; Kawasaki, S.; Tabata, S.; Hayashi, M.; Parniske, M.; Szczyglowski, K.; Kawaguchi, M. and Stougaard, J. 2006. Genetics of Symbiosis in *Lotus japonicus*: Recombinant Inbred Lines, Comparative Genetic Maps, and Map Position of 35 Symbiotic Loci. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19:80-91.