



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

Tesis para acceder al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias

**“Biología reproductiva y factores que regulan la germinación en poblaciones
de *Sporobolus phleoides* Hack., una gramínea halófito endémica de
Argentina”**

Cátedra de Botánica Sistemática Agronómica - Departamento de Biología Vegetal
- Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional del Litoral.

Lic. Geraldina Alicia Richard

Director: Dr. José Francisco Pensiero

Co-directora: Dra. Beatriz Gloria Galati

Agradecimientos:

...en primer lugar a J.F. Pensiero, mi Director, quien ha dedicado gran parte de su vida a construir un patrimonio de conocimiento fundamental sobre nuestras plantas nativas...por eso, por acompañarme y guiarme durante estos años, por contagiarme desde siempre esa gran pasión por el estudio y la valoración nuestros recursos naturales...infinitas gracias Pepe!!!

...a la Facultad de Ciencias Agrarias por proporcionar el lugar físico para la ejecución de este trabajo y por haber hecho posible la realización de mis estudios de posgrado.

...al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por otorgarme las becas que me permitieron doctorarme y transcurrir mis primeros pasos en la investigación.

...a mi Directora Betty Galati, por mostrarme lo fascinante que es mundo de la embriología de las plantas, por tu gran paciencia, predisposición y enormísima bondad tanto en los buenos como en los no tan buenos momentos... sos una excelente persona, como siempre y desde siempre miles y miles de gracias!!!

...a H.F. Gutierrez, mi Director de beca, por haberme brindado esta maravillosa oportunidad, muchísimas gracias Hugo!

...a mi queridísima Caro Cerino, amiga del alma!...miles de gracias por tu contención, tu ayuda siempre, por hacerme reír tanto, por los abrazos justo a tiempo y por miles de cosas más...gracias a la vida por vos!

...a Gabriela Zarlavsky por la paciencia y siempre buena predisposición para enseñarme a hacer los cortes histológicos y contestar todas las consultas.

...a Ariel De Gracia y padres por brindarnos hospedaje y hacer más grata la estancia en Buenos Aires.

...a Marcelo Zabala por estar siempre presente y ayudarme desde a cambiar una lamparita, como con los análisis estadísticos sin ningún tipo de reparo...pero por sobre todo por tus magníficos asados y guisos con los cuales este trabajo fue nutrido...muchas gracias por todo eso y más!

...a todos los compañeros y amigos de este hermoso grupo de trabajo, con quienes tengo el Honor de compartir y contar diariamente: Eli Exner, Lore

Marinoni, Ana María Luchetti, Veronica Kern, Carlos D'Angelo, Andrés Bortoluzzi, Carlitos Dimundo, Fer Ahielo, Julio Giavedoni, Pablo Tomas, Dami Castro, Javi Castañeda, Cristian Borgeaud y Román Rosso, y a Maurito Beutel...muchas gracias!!!

...a mis viejos, hermanos y sobrinos (todos los biológicos y los adoptados), mis lucecitas del camino...por tantísimo amor!!!

...y Mati Ippolito, compañero de mi alma, para vos un eterno GRACIAS infinito punto todos los colores!!!

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS UTILIZADAS	XI
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVI
CAPÍTULO I: Introducción General	1
1. Introducción.....	2
1.1 La especie bajo estudio.....	4
2. Objetivos.....	7
2.1 Objetivo general.....	7
2.2 Objetivos principales.....	7
3. Materiales y sitio de estudio.....	7
CAPÍTULO II: Biología reproductiva de <i>Sporobolus phleoides</i>	9
1. Introducción.....	10
1.1 Sistema reproductivo en gramíneas.....	11
1.2 Antecedentes en el género.....	12
1.3 Características de plantas predominantemente autógamias.....	13
2. Hipótesis.....	15
3. Objetivos.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. Materiales y métodos.....	16
4.1 Características de la especie en estudio.....	16
4.2 Fenología de la floración.....	18

4.3	Receptividad estigmática.....	18
4.4	Relación P/O y viabilidad polínica.....	19
4.5	Porcentaje de cleistogamia.....	19
4.6	Producción de semillas bajo distintas condiciones de polinización.....	20
4.7	Análisis embriológicos.....	20
4.8	Análisis estadísticos.....	21
5.	Resultados.....	21
5.1	Fenología de la floración.....	21
5.2	Receptividad estigmática.....	24
5.3	Relación P/O y viabilidad polínica.....	24
5.4	Porcentaje de cleistogamia.....	25
5.5	Producción de semillas bajo distintas condiciones de polinización.....	25
5.6	Análisis embriológicos.....	26
6.	Discusión.....	28
CAPÍTULO III: Comportamiento germinativo de <i>Sporobolus phleoides</i>		31
1.	Introducción.....	32
1.1	Dormancia en gramíneas.....	34
1.2	Antecedentes en el género.....	35
2.	Hipótesis.....	37
3.	Objetivos.....	38
3.1	Objetivo principal.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4.	Materiales y métodos.....	38
4.1	Material vegetal.....	38
4.2	Viabilidad seminal.....	40
4.3	Efecto de diferentes niveles de luz y temperatura sobre la germinación de las semillas al momento de la cosecha.....	40
4.4	Efecto del almacenamiento sobre la germinación de semillas.....	42
4.5	Efecto de la estratificación fría y nitratos.....	43
4.6	Punzado.....	43

4.7 Análisis de la contribución de las distintas partes de la semilla a la dormancia.....	44
4.8 Análisis estadísticos.....	46
5. Resultados	46
5.1 Viabilidad Seminal.....	46
5.2 Efecto de diferentes niveles de luz y temperatura sobre la germinación de semillas al momento de la cosecha.....	46
5.3 Efecto del almacenamiento sobre la germinación de semillas.....	47
5.4 Efecto de la estratificación fría y nitratos.....	50
5.5 Punzado.....	52
5.6 Análisis de la contribución de las distintas partes de la semilla a la dormancia.....	53
6. Discusión.....	55
CAPÍTULO VI: Discusión general y conclusiones.....	60
1. Discusión general.....	61
2. Conclusiones.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO.....	87
1. Producción científica.....	88
1.1 Publicaciones.....	88
1.2 Congresos.....	88
1.3 Tesinas de grado.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Orígenes de las poblaciones de plantas de <i>S. phleoides</i> empleadas en este estudio.....	8
Tabla 2: Sistema reproductivo según la Relación polen/óvulo (Cruden, 1977).....	15
Tabla 3: Relación polen/óvulo (P/O), viabilidad del polen (%) y producción de semillas (%) bajo distintos tratamientos de polinización para las poblaciones analizadas de <i>S. phleoides</i>	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: a) imagen de *S. phleoides*; Barra = 10 cm (Fuente: Pensiero); b) área de distribución de la especie.....6

Figura 2: Detalles de la especie: a) panícula; b) espiguilla; y c) utrículo.....12

Figura 3: Detalles de la inflorescencia y espiguillas de *S. phleoides*: a) Espiguillas casmógamas en el sector apical de la inflorescencia, con las anteras fuera de los antecios; b) Espiguillas cleistógamas en la porción basal de la inflorescencia, con las anteras incluidas en el antecio; c) Antecio completamente abierto, con anteras y ramas estigmáticas fuera del mismo; d) Frutos inmaduros de espiguillas casmógamas (izquierda) y de espiguillas cleistógamas (derecha). a anteras, l lemma, lg gluma inferior, p palea, sb ramas estigmáticas, ug gluma superior. Barra= 1mm.....23

Figura 4: Espiguillas de *S. phleoides*: a) espiguilla cerrada (las ramas estigmáticas ya se encuentran receptivas); b) espiguilla al comienzo de la antesis, con la completa separación de las glumelas (lemma y pálea) (ramas estigmáticas afuera del antecio, y anteras todavía adentro); c) espiguilla completamente abierta (la elongación de los filamentos permite situar a las anteras afuera y por sobre las ramas estigmáticas); d) espiguilla parcialmente abierta (ramas estigmáticas y anteras dentro del antecio y en contacto); e) espiguilla cleistógama. Barra= 1 mm24

Figura 5: Porcentaje de cleistogamia (%) de sectores apicales y basales de inflorescencias de *S. phleoides* durante el período de floración de noviembre-diciembre de 2013. Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).....25

Figura 6: Microfotografías de óvulos de *S. phleoides*: a) célula madre de la megáspora; b) tétrade de megásporas en forma de T; c) primera cariocinesis mitótica de la megáspora viable; d) saco embrionario binucleado con una vacuola

central; e y f) megagametofito tipo *Polygonum* con una célula huevo, dos sinérgidas, dos núcleos polares y tres antípodas; g-i) megagametofito maduro con un grupo de células antípodas. a antípoda; m1, m2, m3 y m4 megásporas; cmm células madre de la megáspora; o célula huevo; pn núcleos polares; s sinérgida; v vacuola. Barra: 50 μm27

Figura 7: Semillas de *Sporobolus phleoides*: a) sector de la inflorescencia con semillas liberadas naturalmente debido a la humedad ambiental sin glumas, glumelas ni pericarpio. Barra= 1 cm; b) detalle de las semillas con glumas, glumelas y pericarpio a la izquierda, y sin estas estructuras a la derecha. S semillas. Barra= 1 mm.39

Figura 8: Embriones teñidos de rojo y viables de *Sporobolus phleoides* luego de ser sometidos en solución de tetrazolio al 1 % durante 10 horas, a 30°C en oscuridad.....40

Figura 9: plántula normal de *Sporobolus phleoides* con plúmula y radícula desarrolladas. Barra= 1 cm.....42

Figura 10: Porcentajes finales de germinación PFG (%) para distintas poblaciones de *Sporobolus phleoides*: a) en interacción con distintos niveles de temperaturas (°C); b) en interacción con distintos niveles de luz (luz continua, ciclos de alternancia entre luz y oscuridad de 16 h y 8 h respectivamente, y oscuridad).....47

Figura 11: Porcentajes finales de germinación PFG (%) de semillas viables de las seis poblaciones de *Sporobolus phleoides* con distintos tiempos de almacenamiento (0, 12, 18 y 24 meses) cultivadas bajo distintas condiciones de temperaturas en oscuridad: a) a 20°C; b) a 20-30 °C; y c) a 30°C. Las medias con letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0.05$) según prueba de Tuckey.....49

Figura 12: Porcentajes finales de germinación PFG (%) de semillas viables y Coeficiente de germinación CG para seis poblaciones de *Sporobolus phleoides* sometidas a distintos tratamientos de estratificación en frío (0, 30 y 100 días)

cultivadas a 30°C en oscuridad, expuestas a dos tratamientos con nitratos: a) PFG para semillas sin nitratos; b) semillas cultivadas con nitratos (solución de KNO₃ al 0,2 %); c) CG para semillas sin nitratos; y d) CG para semillas con nitratos. Las medias con letras distintas significan diferencias significativas (p < 0,05) según test de Tuckey;.....52

Figura 13: Curvas de respuesta de germinación de semillas perforadas (con la testa alterada) de las seis poblaciones evaluadas de *Sporobolus phleoides* (8028, 7610, 8415, 8452, 8393, y 9722) cultivadas a 30°C en oscuridad. PFG (%): Porcentaje de germinación final de semillas viables.....53

Figura 14: Efecto de la testa en la imbibición de dos poblaciones de *Sporobolus phleoides*. Los promedios en cada población seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05) con la prueba de Tuckey;.....54

Figura 15: Embrión maduro de *S. phleoides*. cl: coleóptilo; cr: coleoriza; en: endosperma; es: escutelo; ep: epiblasto; ts: tegumento seminal. Barra = 50 μm..55

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μm: micrones

a: anteras

a: antípodas

ANOVA: Análisis de Varianza

CG: coeficiente de velocidad de germinación

CH: antecios o espiguillas casmógamas

CL: antecios o espiguillas cleistógamas

cl: coleóptilo

cm: centímetros

cmm: células madre de la megáspora

cr: coleorriza

Dep.: Departamento

DF: Dormancia Fisiológica

DM: Dormancia Morfológica

DMF: Dormancia Morfofisiológica

DY: Dormancia Física

en: endosperma

ep: epiblasto

es: escutelo

F: estadístico Fisher-Snedecor

FAA: Formol/Ácido acético/Alcohol

FCA-UNL: Facultad de Ciencias Agrarias

fr/fl: número de frutos establecidos por número de flores analizados

Gral.: General

h: horas

Id: identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero, conservado en el Herbario (SF)

INASE: Registro Nacional de Semillas

KNO₃: nitrato de potasio

l: lemma

l: litros

Lat.: Latitud

lg: gluma inferior

Long.: Longitud

m: metros

m1, m2, m3 y m4: megásporas

ml: mililitros

mm: milímetros

o: célula huevo

°C: grados centígrados

P/O: número de granos de polen por óvulo

p: palea

p: probabilidad

PFG: porcentaje final de germinación

pn: núcleos polares

R.N.M. "El Fisco": Reserva Natural Manejada "El Fisco"

S: semillas

s: sinérgida

sb: ramas estigmáticas

SF: Herbario "Arturo Ragonese"

ts: tegumento seminal

ug: gluma superior

UNL: Universidad Nacional del Litoral

v: vacuola

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$: micromoles por metro cuadrado por segundo

RESUMEN

“Biología reproductiva y factores que regulan la germinación en poblaciones de *Sporobolus phleoides* Hack., una gramínea halófito endémica de Argentina.”

Sporobolus phleoides es una gramínea halófito endémica de Argentina considerada un recurso fitogenético importante para áreas salinas. Conocer su biología reproductiva y comportamiento germinativo resulta imprescindible para la adecuada conservación del germoplasma e inclusión en planes de domesticación.

La biología reproductiva se estudió a través de la fenología, análisis embriológicos, y tratamientos de auto-polinización vs. polinización libre, en seis poblaciones de plantas cultivadas en un entorno común. *S. phleoides* presenta un sistema reproductivo sexual y mixto, predominantemente autógamo con elevadas tasas de fertilidad. Presenta espiguillas casmógamas y cleistógamas simultáneas en la misma inflorescencia. La cleistogamia promedia un 23% en todas las poblaciones.

Los efectos de la luz, la temperatura, el almacenamiento en seco, nitratos, la estratificación fría y punzado fueron evaluados en la germinación de las seis poblaciones. *S. phleoides* presenta dormancia fisiológica no-profunda relacionada con su testa. A través del punzado se logró romper la dormancia de todas las semillas. Las respuestas de germinación fueron mejores bajo la estratificación en frío en combinación con nitratos que para el almacenamiento en seco. Sin embargo, las poblaciones mostraron diferentes respuestas de germinación para ambos tratamientos. El conocimiento de esta variabilidad es fundamental para su domesticación y conservación en bancos de genes.

Palabras clave: *Sporobolus*, biología reproductiva, autogamia, cleistogamia, germinación, dormancia, Poaceae

ABSTRACT

"Reproductive biology and factors regulating germination in populations of *Sporobolus phleoides* Hack., a halophyte endemic grass from Argentina."

Sporobolus phleoides is a halophyte endemic grass of Argentina considered an important genetic resource for saline environments. Information about its reproductive biology and germination behaviour are needed to programming germplasm collections and for future plans of domestication.

Its reproductive biology was studied through phenology, embryological analysis, and self-pollination vs. open-pollination treatments in six populations obtained from four provinces of Argentina and cultivated in a common environment. *S. phleoides* reproduces sexually and presents a mixed reproductive system, being mainly autogamous and showing a high fertility rate. Chasmogamous and cleistogamous spikelets occur simultaneously on the inflorescence. The average percentage of cleistogamy during the study period was 23% for all populations evaluated.

The effects of light, temperatures, dry storage, nitrates, cold stratification and pricking were evaluated in the germination of the six seeds populations. *S. phleoides* has a non-deep physiological dormancy related with their testa. Pricking was the only treatment able to break seed dormancy. The germination responses were better for treatment of cold stratification in combination with nitrates than for dry storage. However the populations showed different germination responses for both of them. The knowledge of this variability is essential for domestication, breeding, and seed storage in gene banks.

Keywords: *Sporobolus*, reproductive biology, autogamy, cleistogamy, germination, dormancy, Poaceae

CAPÍTULO I:

Introducción general

1. Introducción:

El forraje ofrecido por los pastizales naturales y pasturas cultivadas tanto anuales como perennes, constituyen los principales componentes en la alimentación de la ganadería argentina (Anderson, 1980; Quiroga *et al.*, 2009, Mendez *et al.*, 2013).

Argentina se caracteriza por poseer extensas áreas ocupadas por pastizales naturales cuya rica y variada flora constituye un importante reservorio de biodiversidad. Tal es así que la producción ganadera de nuestro país, en particular las explotaciones de cría bovina, caprinas y ovinas se basan casi exclusivamente en la utilización de estos pastizales como fuente de recursos forrajeros. La expansión de la frontera agrícola ocurrida en los últimos 25 años, ha ocasionado que las actividades ganaderas se desplacen hacia las regiones más áridas de Argentina, áreas en las que la oferta de especies forrajeras cultivadas resulta bastante escasa. Este proceso no fue acompañado debidamente por un sistema planificado de capacitación hacia productores y técnicos, ocasionando una importante erosión de estos recursos fitogenéticos nativos (PROCISUR, 2010) y una merma de la producción de los pastizales. Esto se ve incrementado por los característicos factores edafo-climáticos de estos lugares, que condicionan fuertemente el tipo de especies vegetales que allí pueden prosperar (De León, 2009; Monti & Delgado, 2013).

De las 9.938 especies de plantas vasculares descritas para Argentina, 1.151 son gramíneas (Zuloaga *et al.*, 1999). No obstante la mencionada riqueza de ésta familia, a la que pertenecen la mayoría de las especies forrajeras que integran los pastizales, muy pocas han sido estudiadas con fines agronómicos y menos aún domesticadas e introducidas a cultivo (Deregibus, 1994; Díaz, 2007; Exner, 2012).

El valor forrajero potencial de las especies nativas, muchas de ellas endémicas de Argentina, y en particular la variabilidad genética que las mismas poseen, ha sido ampliamente reconocido por fitomejoradores de diversos países, ya que pueden ofrecer una amplia gama de genes de resistencia para el estrés biótico y abiótico (Rao & Hodgkin, 2002; Greco & Cavagnaro, 2005; Mnif *et al.*,

2005; Rogers *et al.*, 2005; Bhullar *et al.*, 2009; De León, 2009; Quiroga *et al.*, 2009; Marinoni *et al.*, 2015). La prospección de especies nativas y su integración efectiva a los sistemas productivos regionales se tornan un reto cada vez mayor, reforzando la necesidad de realizar acciones tendientes a la conservación de estos ecosistemas y sus recursos genéticos.

Con la intención de abordar este aspecto de vacancia científico-tecnológica, la Universidad Nacional del Litoral (UNL) ha creado el Programa de Interés Institucional: “Programa de Documentación, Conservación y Valoración de la Flora Nativa” (PRODOCOVA). En relación con dicho programa se realizan distintas actividades relacionadas con la prospección, documentación, colecta y la generación de conocimientos básicos y aplicados necesarios para conservar, valorar y manejar de manera sustentable aquellas especies nativas consideradas promisorias como recursos fitogenéticos agronómicos, y en particular como recursos forrajeros. En el marco de dicho Programa, la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNL) ha creado el Banco de Germoplasma “Ingeniero José Mario Alonso”, orientado a la colecta, conservación y caracterización de germoplasma de especies forrajeras nativas.

En este banco se conservan semillas de más de 300 accesos de diferentes especies de gramíneas y leguminosas colectadas en distintas regiones de Argentina, seleccionadas por su potencialidad para ser utilizadas en programas de enriquecimiento de pastizales degradados y/o de fitomejoramiento de cultivares forrajeros.

En relación con la temática abordada por el Programa mencionado, y en especial referencia a las especies forrajeras nativas, se ha venido priorizando la colecta y el estudio de las siguientes especies: *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Gutiérrez *et al.*, 2006a; 2006b; 2015); *Elymus scabrifolius* (Döll) J.H. Hunz. (Zabala *et al.*, 2009a; 2009b; 2011; Tomas *et al.*, 2012); *Setaria lachnea* (Nees) Kunth (Pensiero *et al.*, 1995; Schrauf *et al.*, 1998; Pensiero *et al.*, 2005; Toniutti & Fornasero, 2008; Exner *et al.*, 2007; 2012 Pensiero *et al.*, 2011); *Setaria magna* Griseb. (Aliscioni *et al.*, 2011; Marinoni *et al.*, 2013); *Setaria pflanzii* Pensiero (Caponio & Pensiero, 2002); *Trichloris crinita* (Lag.) Parodi y *Trichloris pluriflora* E.

Fourn. (Zabala *et al.*, 2011; Marinoni *et al.*, 2013); *Desmanthus acuminatus* Benth., *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart, *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. (Zabala *et al.*, 2008; 2010; Fornasero *et al.*, 2014). Además, se incluyeron algunas especies leñosas como *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. (Cerino *et al.*, 2015a) y *Ziziphus mistol* Griseb. (Cerino *et al.*, 2015b).

Producto de los estudios realizados en las especies forrajeras nativas, varios de estos materiales se han inscripto o se hallan en trámites de inscripción como cultivares forrajeros comerciales ante el Registro Nacional de Semillas (INASE).

Para la selección de las forrajeras nativas a estudiar, uno de los aspectos más importantes que se tuvo en cuenta ha sido la tolerancia al estrés abiótico como la salinidad y la sequía, aspectos relevantes y característicos de las regiones semiáridas y áridas a las que se ha desplazado la actividad ganadera. Entre dichas especies se priorizó a *Sporobolus phleoides* Hack., ya que la misma presenta una alta tolerancia a la salinidad, aspecto de importancia a la hora de ser tomada en cuenta como recurso fitogenético en planes de enriquecimiento de pastizales o de mejoramiento de forrajeras para ambientes marginales. En tal sentido, conocer la biología reproductiva y el comportamiento germinativo de esta especie resultan aspectos básicos tanto para la colecta y conservación de materiales para el banco de germoplasma, como para ser tomada en cuenta en los planes de mejoramiento.

1.1 La especie bajo estudio

Sporobolus R. Br. es un género cosmopolita de la Tribu *Zoysieae*, Subtribu *Sporobolinae* (Denham, 2012), que agrupa a más de 230 especies distribuidas a través de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, con algunos representantes en las regiones templado-cálidas (Clayton *et al.*, 2006; Peterson *et al.*, 2014; Simon, 2014; Peterson *et al.*, 2015). Este género reúne especies típicamente C4 o megatérmicas (Ellis, 1977; Baaijens & Veldkamp, 1991; Simon & Jacobs, 1999; Giraldo Cañas, 2009) las cuales pueden crecer en suelos secos, salinos o alcalinos, arenosos o arcillosos, tanto de sabanas, páramos y praderas como de playas y ambientes alterados, entre el nivel del mar y los 3900 m de

altitud (Giraldo Cañas, 2009). Varias de estas especies son consideradas halófitas (Liphshitz & Waisel, 1974), y han adquirido gran importancia ecológica y económica por ser empleadas en planes de revegetación para ambientes salinos, en modelos para estudios de tolerancia y como recursos forrajeros para áreas degradadas (Wood & Gaff, 1989; Khan & Gulzar, 2003; Joshi *et al.*, 2005; Khan & Gul, 2008).

En América habitan más de 70 especies (Peterson *et al.*, 2003; 2007), 11 de ellas se encuentran representadas en la Argentina (Denham, 2012).

Sporobolus phleoides Hack. (Figura 1a) se destaca por ser una especie endémica de nuestro país, constituyendo un elemento típico de áreas salobres y bordes de lagunas en las Provincias Fitogeográficas Chaqueña y del Espinal (Astegiano, 1986), donde conforma comunidades halófilas con especies de reconocida tolerancia salina pertenecientes a los géneros *Distichlis* Raf. y *Sarcocornia* (Duval-Jouve ex Moss) A.J.Scot. Su distribución abarca las provincias de Catamarca, Córdoba, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán (Denham, 2012) (Figura 1b).

Debido a su comportamiento halófito (Ballesteros, 2010) y su carácter perenne, es considerada un recurso fitogenético importante para ambientes salinos (Aronson, 1989; Rogers *et al.*, 2005). Si bien Quiroga & Correa (2011) han señalado que esta especie posee un valor forrajero intermedio, esto puede verse compensado por una buena capacidad de repoblación, escasa exigencia de nutrientes o una buena resistencia a condiciones de estrés ambiental.

El conocimiento de la biología de esta especie ayudará a definir métodos apropiados para su colecta, conservación y su utilización como recurso fitogenético. Los protocolos de colección, conservación y utilización del germoplasma de recursos fitogenéticos silvestres se hallan fuertemente condicionados por la biología de las especies a conservar (Brown & Marshal, 1995; Engels & Visser, 2003; Crossa & Vencovsky, 2011). Por otra parte, la utilización eficiente de los recursos fitogenéticos requiere de la apropiada colecta, caracterización y evaluación de los materiales disponibles (Tyler *et al.*, 1985; McFerson, 1998; Muir *et al.*, 2011).

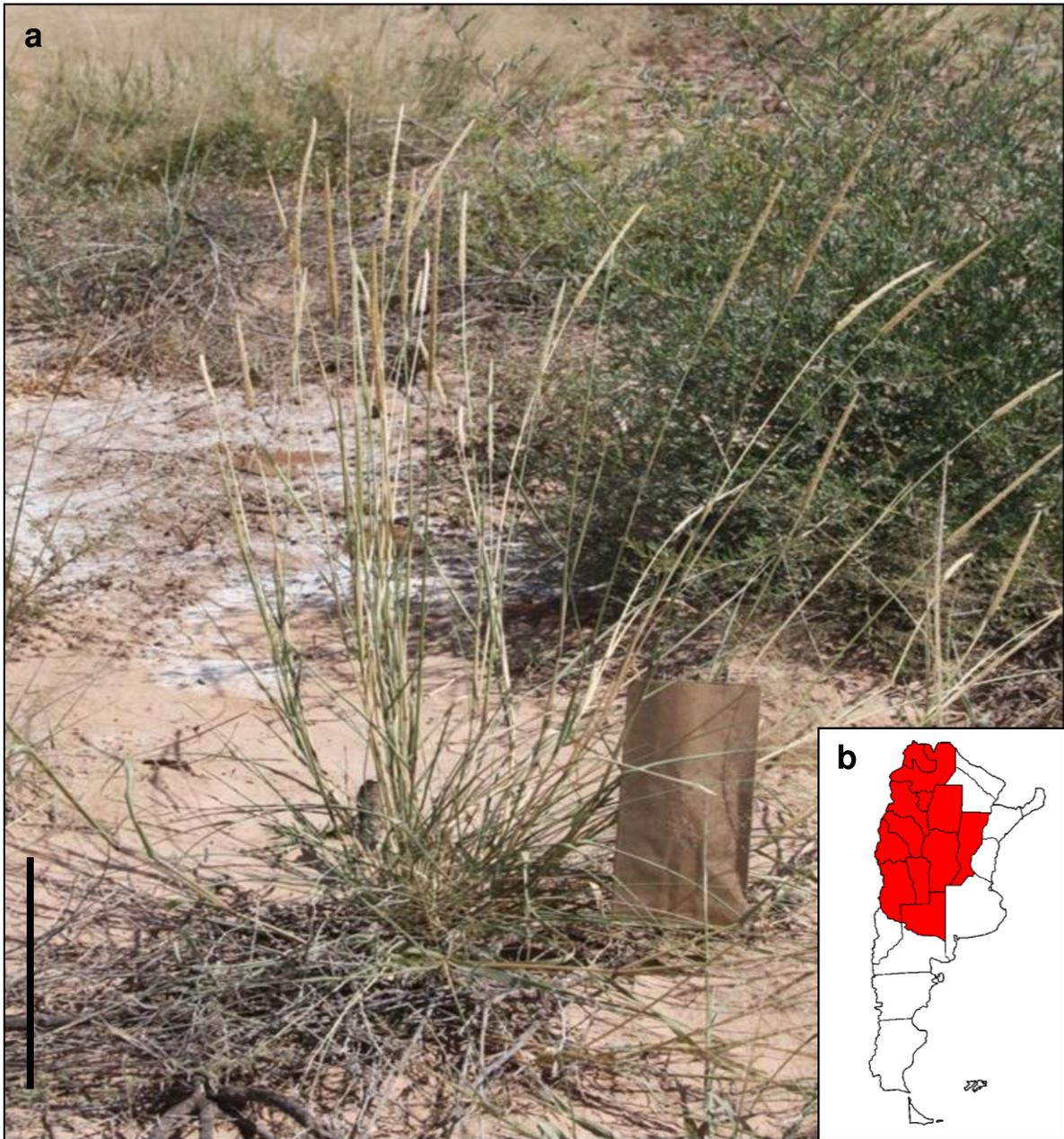


Figura 1: a) imagen de *S. phleoides*; Barra = 10 cm (Fuente: Pensiero); b) área de distribución de la especie.

Información básica relativa al sistema reproductivo, floración, producción de semillas, sistemas de polinización, dormancia seminal, comportamiento germinativo, y la capacidad de las semillas para ser almacenadas resultan

fundamentales para el manejo efectivo del germoplasma (Engels & Visser, 2003) y su inclusión en planes de domesticación (Casler & Van Santen, 2010).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Obtener información sobre la biología de *Sporobolus phleoides*, particularmente sobre su biología reproductiva y su comportamiento germinativo, que serán de utilidad para su inclusión en planes de conservación y domesticación.

2.2 Objetivos principales:

- Determinar el sistema reproductivo de *S. phleoides* (Capítulo II).
- Proporcionar información sobre el comportamiento germinativo de *S. phleoides* (Capítulo III).

3. Materiales y sitio de estudio

Las plantas de *Sporobolus phleoides* utilizadas en este trabajo se originaron a partir de semillas colectadas en diferentes ambientes (Tabla 1). De cada población se colectaron semillas de al menos 30 plantas separadas por 5 m de distancia una de otras. Además, de cada población se colectó un ejemplar de herbario que se conserva en el Herbario “Arturo Ragonese” (SF) de la FCA-UNL.

Las semillas colectadas de cada individuo fueron sembradas en bandejas plásticas sobre un sustrato de arena durante el mes de agosto de 2011. Cuando las plántulas alcanzaron los 5 cm fueron trasplantadas individualmente a macetas plásticas de 5 l con una mezcla homogénea de suelo, arena y material orgánico (resaca comercial), cuya proporción en volumen fue de 2:1:1 respectivamente, y mantenidas bajo invernadero. Luego de cuatro meses las plantas alcanzaron unos 30-40 cm de altura, y fueron trasplantadas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL), en la localidad de Esperanza, Santa Fe (31° 27' S, 60° 56' W). Cada población estudiada estuvo representada por 30 plantas, las que fueron ubicadas según un diseño completamente al azar, separadas unas de otras por 40 cm.

Tabla 1: Orígenes de las poblaciones de plantas de *S. phleoides* empleadas en este estudio.

Poblaciones Id ¹	Provincia Fitogeográfica (Distrito) ²	Provincia	Departamento y Localidad	Lat.	Long.
8028	Chaqueña (Chaco Seco)	La Rioja	Dep. Gral. Belgrano	30°38'24,70"	65°35'40,20"
7610	Chaqueña (Chaco Seco)	Córdoba	Dep. Tulumba, Salinas Grandes	29°51'0,01"	64°40'10,90"
8415	Espinal (del Algarrobo)	Santa Fe	Dep. San Cristóbal, Huanqueros	30°01'22,80"	61°16'12,20"
8452	Chaqueña (Chaco Húmedo)	Santa Fe	Dep. 9 de Julio	28°09'55,40"	61°44'19,80"
8393	Espinal (del Caldén)	San Luis	Dep. Gral. Pedernera, Villa Mercedes	33°37'36,00"	65°26'4,40"
9722	Espinal (del Algarrobo)	Santa Fe	Dep. San Cristóbal, R.N.M. "El Fisco"	30°09'55,52"	61°00'23,33"

¹ Id: identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero, conservado en el Herbario (SF)

² Según Cabrera (1994)

CAPÍTULO II:

Biología reproductiva de *Sporobolus phleoides*

1. Introducción

El modo de reproducción es uno de los principales factores que determinan la estructura genética de las poblaciones naturales (Jain, 1975; Loveless & Hamrick, 1984; Godt & Hamrick, 1998). Debido a esto, las actividades de mejoramiento y multiplicación de semillas de recursos fitogenéticos requieren del conocimiento de su sistema reproductivo para lograr una adecuada conservación, utilización y mantenimiento de su diversidad genética (Charlesworth & Wright, 2001; Rivas, 2001; Glemin *et al.*, 2006).

El sistema reproductivo vegetal comprende aquellos atributos que determinan cómo se unen las gametas para formar un cigoto (Barret & Ekert, 1990), de modo tal que algunos sistemas restringen la recombinación génica y otros la promueven.

Dentro de las Angiospermas se encuentran una gran variedad de sistemas reproductivos, incluyendo la reproducción asexual, sexual o una mezcla de ambos. A través de la reproducción asexual se logra una progenie genéticamente idéntica a los progenitores (a excepción de alguna diferencia causada por mutaciones somáticas). Por otro lado, las especies de reproducción sexual pueden dividirse en dos grandes grupos: las predominantemente autógamas (capaces de autofecundarse); y las predominantemente alógamas (de fecundación cruzada). Las principales diferencias entre autógamas y alógamas se dan en la distribución de la diversidad genética. En las autógamas las plantas son homocigotas y las poblaciones están fuertemente estructuradas en líneas puras. Las especies con fecundación cruzada, en cambio, tienen plantas heterocigotas y las poblaciones presentan una importante diversidad genética basada en las diferencias genéticas entre los individuos, no existiendo una estructuración de las mismas (Jain, 1975).

Los mecanismos de polinización constituyen uno de los medios más efectivos para regular la recombinación génica dentro de los sistemas sexuales (Lloyd & Shoen, 1992; Ashman & Shoen, 1996). Estos mecanismos se encuentran asociados a diversos factores genéticos, ecológicos, morfológicos y fisiológicos de las plantas, los cuales combinados determinan la proporción de autofecundación y/o fecundación cruzada que constituirá a la progenie, al éxito reproductivo (cantidad de progenie fértil producida) y por lo tanto al fitness (valor adaptativo)

(Wright & Meagher, 2003; Stinson, 2004; Lacey *et al.*, 2003; Lloyd, 1992; Armbruster *et al.*, 2002; Goodwillie *et al.*, 2005; Exner *et al.*, 2010). Estos últimos ofrecen la posibilidad no sólo de conocer cómo se estructura la información genética poblacional, sino también otros aspectos fundamentales para determinar las estrategias de conservación de una especie (Jain, 1975; Exner *et al.*, 2010).

1.1 Sistema reproductivo en gramíneas

La gran mayoría de las gramíneas presentan hermafroditismo (Connor, 1979), y a pesar de las varias ventajas potenciales de la autopolinización (Fisher, 1941; Baker, 1955; 1967; Schoen *et al.*, 1996; Schoen & Busch, 2008) algunas especies poseen mecanismos para reducirla o prevenirla (Igic *et al.*, 2008).

La fecundación cruzada puede ser impuesta a través de sistemas de auto-incompatibilidad gametofítica (incapacidad de producir semillas por rechazo del polen propio, controlado genéticamente), o bien a través de la dicogamia (separación temporal de las funciones sexuales) (Igic & Khon, 2006). Pero en los individuos auto-compatibles (capaces de producir semillas por autopolinización), una serie de factores ecológicos, fisiológicos y morfológicos determinan la proporción de autofecundación y de qué manera ésta se lleva a cabo (Lloyd & Schoen, 1992).

Una forma particular de autofecundación, muy extendida entre las gramíneas, consiste en la cleistogamia. La misma consiste en la autopolinización que ocurre en el interior de antecios cerrados (antecios cleistógamos) debido generalmente a algunas modificaciones estructurales (Lloyd & Schoen, 1992). En este sentido, Campbell *et al.* (1983) proponen una clasificación para los distintos tipos de cleistogamia que ocurren dentro de las gramíneas, según diversas características morfo-funcionales.

Por otro lado, los antecios abiertos (o casmógamos) también presentan potencial para auto-fecundarse. En estos casos la autopolinización puede ser facilitada a través de algún vector, o bien llevarse a cabo de manera autónoma (Lloyd & Schoen, 1992), pudiendo ocurrir antes, durante o después de la polinización cruzada (Lloyd, 1992). La autopolinización entre flores del mismo

individuo, mejor conocida como geitonogamia, también es un fenómeno común en las Angiospermas auto-compatibles (Lloyd & Schoen, 1992).

Varias especies de gramíneas presentan ambas formas florales en el mismo individuo y al mismo tiempo, a las cuales se las refiere como especies cleistógamas facultativas (Campbel et al. 1983), y se considera que poseen un sistema reproductivo mixto o múltiple estrategia (Lloyd, 1984; Schoen, 1984; Redbo-Torstensson & Berg, 1995; Masuda *et al.*, 2001).

1.2 Antecedentes en el género

Las especies del género *Sporobolus* se caracterizan por presentar inflorescencias en panojas, con espiguillas unifloras. Cada espiguilla posee un solo antecio hermafrodita y está compuesta por 2 glumas (gluma 1 y gluma 2), 2 glumelas (lemma y pálea), 2 lodículas, 3 estambres con anteras biloculares, un ovario súpero 1-ovulado con dos estigmas sésiles y plumosos.

Este género presenta típicamente reproducción sexual (Engstrom & Marshfield, 2004), con posibilidad de reproducirse vegetativamente a través de rizomas y estolones (Smith-White, 1988; Febles *et al.*, 2010). Sin embargo, la reproducción asexual a través de la agamosperma fue observada en una raza triploide de *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth (Smith-White, 1988).

Dadas las características de su floración, la autogamia constituye un mecanismo reproductivo muy extendido dentro del género. Incluso varias de sus especies han sido señaladas como cleistógamas facultativas como: *Sporobolus platensis* Parodi (Rosengurtt & Arrillaga de Maffei, 1961; Rosengurtt, 1984), *Sporobolus neglectus* Nash. (Doyon & Dore, 1967), *Sporobolus asper* (P.Beauv.) Kunth (Riggins, 1977), *Sporobolus indicus* (L.) R.Br. (Astegiano, 1986), *Sporobolus ozarkanus* Fernald, *Sporobolus vaginiflorus* (Torr. ex A.Gray) Alph. Wood (Mc Gregor, 1990), y *Sporobolus cryptandrus* A.Gray (Parodi, 1928). La cleistogamia constituye un claro indicador de auto-compatibilidad reproductiva (Connor, 1979; 1981), la cual fue comprobada sólo para *Sporobolus airoides* (Torr.) Torr., *S. cryptandrus* (Fryxell, 1957), *Sporobolus compositus* (Poir.) Merr. (Weaver, 1954) y *S. indicus* (Aracne, 2010). Estas dos últimas especies son principalmente

autógamas, sin embargo tienen un sistema reproductivo mixto en el cual la autopolinización y la polinización cruzada pueden coexistir, incluso en la misma panícula (Riggins, 1977; Astegiano, 1986; Aracne, 2010).

Para *S. phleoides* no se hallaron trabajos relacionados a sus mecanismos de polinización que permitan incluir a esta especie en alguna de las categorías mencionadas.

1.3 Características de plantas predominantemente autógamas:

La tasa de autofecundación puede variar ampliamente entre especies estrechamente relacionadas e incluso entre poblaciones de una misma especie (Jain, 1976; Goodwillie *et al.*, 2005). Debido a ello, para determinar el sistema reproductivo de *S. phleoides* en este trabajo se abordaron las siguientes características que son típicas de especies predominantemente autógamas (Cruden, 1977; Richards, 1986; Dafni, 1992; Lloyd & Schoen, 1992; Lloyd, 1992; Cheplick, 2007; Kalisz *et al.*, 2012; Duncan & Rauscher, 2013):

Proporción antecios cleistógamos: Por lo general en las gramíneas la cleistogamia es facultativa, presentándose de modo simultáneo antecios casmógamos (CH) y cleistógamos (CL) en el mismo individuo (Campbell *et al.*, 1983). Típicamente existen diferencias morfológicas o de desarrollo entre ambos tipos de antecios, y debido a que sólo los CL aseguran la autofecundación, se considera que estas especies presentan dimorfismo reproductivo, dado que se conserva la potencialidad de fecundación cruzada en los CH (Lord, 1981; Clay, 1983; Schoen & Lloyd, 1984; Cheplick, 1994; Plitmann, 1995; Culley & Klooster, 2007). De esta manera, el balance entre estos modos reproductivos puede expresarse entonces bajo la proporción CH/CL (Cheplick, 2007) o bien a través del porcentaje de cleistogamia (el número de espiguillas CL dividido por el número total de espiguillas CL+CH) (Clay, 1983).

Esta proporción es muy plástica y puede ser muy variable entre las distintas especies y sus poblaciones; y además puede ser influenciada por la ontogenia y los cambios en el ambiente (Campbell, 1982; Clay, 1983; Cheplick, 2007), y expresa la proporción de semillas que son producidas efectivamente por autofecundación.

Características morfológicas y fenológicas: La probabilidad de autogamia en los antecios casmógamos puede verse aumentada cuando se superponen en el tiempo y en el espacio las funciones de donante (liberación de polen) y receptora de polen (receptividad estigmática) al nivel de antecio (autogamia) y al nivel de inflorescencia (geitonogamia) (Lloyd & Schoen, 1992). Muchos atributos como el pequeño tamaño de las flores, la corta distancia entre anteras y estigma, la sincronía de las funciones masculinas y femeninas, ciclos florales cortos, están relacionados a elevadas tasas de autogamia (Ornduff, 1969; Sicard & Lenhard, 2011; Kalisz *et al.*, 2012; Duncan & Rauscher, 2013).

El análisis de las características morfológicas y fenológicas de las flores es un aspecto fundamental para una adecuada comprensión de la estrategia reproductiva en las diversas especies. El conocimiento de la secuencia de floración y su duración, determinan además las posibilidades de dirigir y programar las actividades vinculadas con el proceso de obtención de variabilidad y de selección de materiales (Allard, 2000).

Producción polínica: La reducción de la inversión en estructuras masculinas y de atracción a polinizadores (costo de apareamiento) es común de especies predominantemente autógamas, y esto se traduce en una mayor inversión en estructuras femeninas como la producción de frutos y semillas (Solbrig, 1976; Cruden & Lyon, 1985; Brunet, 1992; Raimúndez & Ramírez, 1998; Guzmán 2005). Cuanto más eficiente es la transferencia de polen, menor es el número de granos de polen producidos por óvulo (P/O), lo cual determina una relación entre el sistema reproductivo y la producción de polen (Cruden, 1977). Así, las flores de taxones auto-incompatibles y alógamos producen más granos de polen por óvulo que los taxones auto-compatibles o autógamos (Lloyd, 1965; 1987; Cruden, 1977; Frankel & Galum, 2012).

Esta característica ha sido muy empleada para establecer de modo indirecto el sistema reproductivo en diversas especies de plantas. Luego de estudiar 86 especies de Angiospermas, Cruden (1977) estableció distintos valores de relación P/O como referencia para estimar el sistema reproductivo (Tabla 2).

Tabla 2: Sistema reproductivo según la relación del nº de granos de polen por óvulo (P/O) (Cruden, 1977).

Sistema Reproductivo	P/O
Cleistogamia	4,7 ± 0,7
Autogamia Obligada	27,7 ± 3,1
Autogamia Facultativa	168,5 ± 22,1
Alogamia Facultativa	796,6 ± 87,7
Alogamia	5859,2 ± 936,5

Establecimiento de frutos producidos bajo distintas condiciones de polinización: Las especies autóгамas poseen la capacidad de producir frutos en condiciones de escasez de polinizadores y/o potenciales fuentes de polen, lo cual ha sido considerado como una de las principales ventajas de la autogamia (Baker, 1955; Jain, 1976; Holsinger, 1996). Esta habilidad para autofecundarse permite estudiar su sistema reproductivo mediante el establecimiento de semillas producidos bajo distintas condiciones de polinización (polinización libre, exclusión de polinización, emasculación removiendo el polen o las anteras; etc.) (Cugen *et al.*, 1989; Lloyd & Schoen, 1992; Gutiérrez, 2003). De esta manera, Aracne (2010) pudo estimar el sistema reproductivo de *S. indicus*, comparando el establecimiento de semillas bajo distintos tratamientos de polinización. Este autor observó que el 70 % de los antecios fueron capaces de producir frutos tanto bajo polinización libre, como en condiciones de autopolinización forzada (mediante el ensobrado de inflorescencias y aislamiento), lo cual indica que esta especie presentaría auto-compatibilidad y un sistema reproductivo predominantemente autógamu.

2. Hipótesis

- Al igual que sus congéneres, *Sporobolus phleoides* presenta un sistema reproductivo mixto. Predicción: Se observará la presencia de espiguillas cleistógamas y casmógamas.
- Al igual que otras especies del género, *S. phleoides* presenta auto-compatibilidad y predominancia de autogamia. Predicción: Registro de una elevada relación fr/fl bajo condiciones de auto-polinización y baja relación

P/O. Presencia de características que favorecen la autogamia en antecios casmógamos (ausencia de barreras espacio-temporales entre la liberación de polen y la receptividad estigmática, elevada cantidad de antecios por panícula).

- Como en mayoría de las especies del género, en *S. phleoides* las semillas producidas son de origen sexual. Predicción: Se observará la presencia de meiosis durante el desarrollo del gametofito femenino.

3. Objetivos

3.1 General

Determinar el sistema reproductivo de *Sporobolus phleoides*.

3.2 Específicos

- 1) Estudiar la fenología de la floración (registro del momento del día en que se produce la apertura floral; duración de la floración a escalas de espiguilla, inflorescencia y planta; determinación de sincronía entre liberación de polen viable y receptividad estigmática; analizar la expresión de cleistogamia mediante el porcentaje de antecios cleistógamos).
- 2) Estudiar el sistema reproductivo (a través del registro de la relación polen/óvulo; y la producción de semillas en cruzamientos forzados y libres).
- 3) Estudiar el desarrollo del mega-gametofito para determinar el origen sexual de las semillas.

4. Materiales y Métodos

4.1 Características de la especie en estudio:

Sporobolus phleoides es una gramínea cespitosa de 50 a 100 cm de altura. Sus inflorescencias consisten en panículas espiciformes densas, contraídas, de 7-20 cm de longitud y 0,3 a 0,4 cm de ancho, truncadas o redondeadas en el ápice, con ramificaciones adpresas o fusionadas al eje principal. Sus espiguillas son unifloras, de 1,6 a 2 mm de longitud y se desarticulan sobre las glumas a la madurez. Sus glumas, en número de 2, son poco más cortas o iguales a la lemma

y palea. Los antecios (lemma y pálea) incluyen dos lodículas y una flor perfecta con dos estigmas plumosos y tres estambres cuyas anteras alcanzan de 0,4 a 0,6 mm de longitud. El fruto es un utrículo, cuyo pericarpio es libre y típicamente se torna mucilaginoso con la humedad ambiental. Este utrículo es elipsoide, de 1,5 mm de longitud, de color marrón claro (Parodi 1928; Steibel *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 2001; Denham, 2012). Los detalles pueden observarse en la Figura 2.

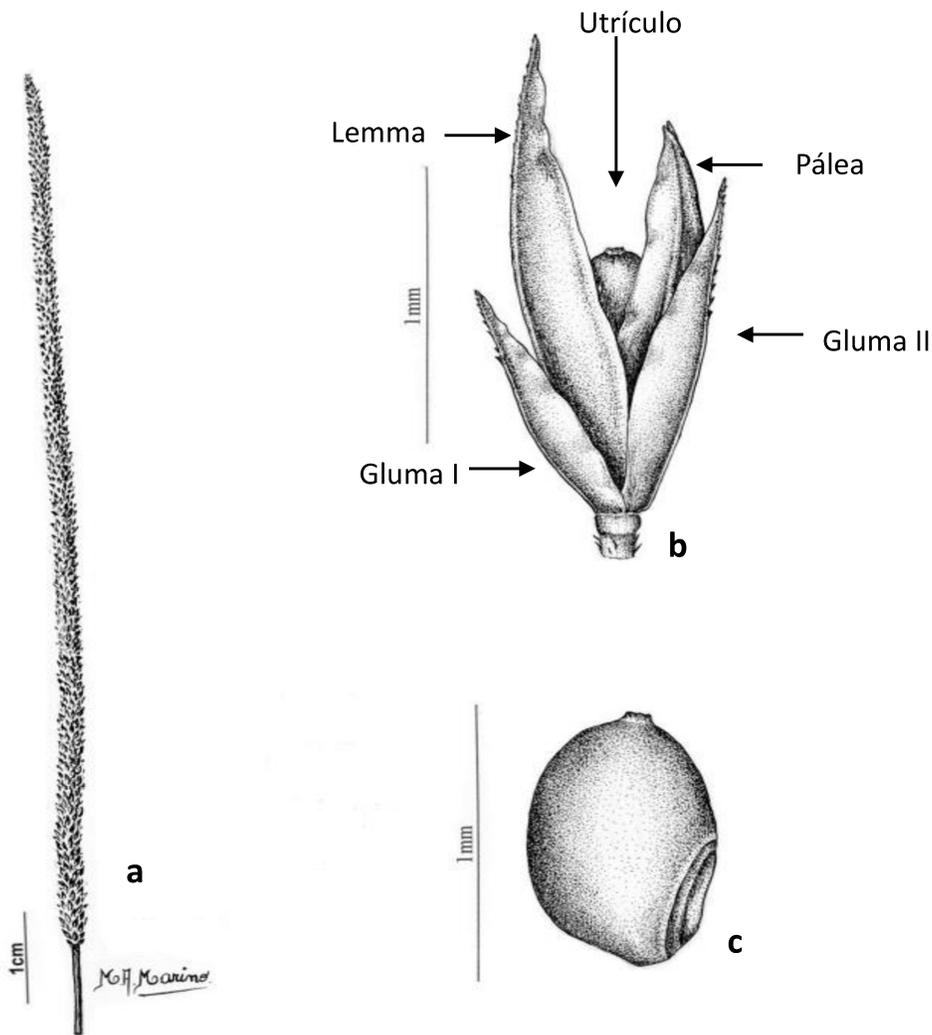


Figura 2: Detalles de la especie: a) panícula; b) espiguilla; y c) utrículo. (Fuente: <http://www.floraargentina.edu.ar>)

4.2 Fenología de la floración

Las observaciones fenológicas fueron realizadas siguiendo un ciclo anual completo durante los años 2012 y 2013.

A nivel poblacional: se registró el momento en que se observó la primera panícula en florecer y el momento en el que se registró la panícula de floración más tardía, con la finalidad de establecer el rango máximo de floración de la población. La unidad experimental fue la planta y la variable a medir fue el tiempo transcurrido entre comienzo y fin de floración. Se consideró "comienzo de floración" cuando se detectó la primera planta experimental que presentó una panícula con al menos un antecio abierto; y "final de floración" cuando la panoja más tardía en florecer -en cada planta observada- presentó más del 50 % de sus espiguillas en antesis.

A nivel de inflorescencia: se siguió la floración de la segunda panícula, en 10 plantas tomadas al azar de cada población ($n = 10$ por población). La unidad experimental fue la segunda panícula en emerger de cada planta y la variable a medir fue el tiempo que tardó cada panoja en completar la apertura de todas sus espiguillas.

A nivel de la espiguilla: se siguió la floración de 20 espiguillas de 5 plantas tomadas al azar de cada población ($n = 100$ por población). La unidad experimental fue la espiguilla y la variable a medir fue el tiempo que tarda cada espiguilla en completar la apertura de su antecio. El registro se efectuó diariamente, y se consideró "antecio abierto" aquel que había iniciado la separación de lemma y pálea. Para cada antecio se registraron los cambios morfológicos (forma, color, cronología y modalidad de apertura de las anteras, a partir de la receptividad del estigma, la liberación del polen y los cambios después de la fertilización) a intervalos de 2 minutos, a partir del comienzo de la separación de sus glumelas y hasta el cierre definitivo del antecio.

4.3 Receptividad estigmática

Para determinar el momento en que los estigmas están en condiciones de recibir polen, se determinó la receptividad estigmática en distintos estadios florales

definidos de la siguiente manera: (1) antecio cerrado; (2) antecio antes de la fertilización, cuyas anteras todavía se mantienen cerradas; y (3) antecios después de la fertilización, cuyos estigmas permanecen turgentes. La receptividad estigmática fue evaluada para cada uno de estos estadios, empleando 10 antecios procedentes de 5 plantas por población (n = 150 estigmas por población). La receptividad fue determinada colocando una solución compuesta de 6.6 ml de agua, 1.4 ml de guaiacol y 2 ml peróxido de hidrógeno (3 %) al estigma (Tel-Zur & Schneider 2009). Los estigmas se consideraron receptivos si mostraban un burbujeo vigoroso y cambio de color de blanco a marrón claro.

4.4 Relación P/O y viabilidad polínica

Recuento de granos de polen por flor: De 10 plantas tomadas al azar de cada población se cosecharon 3 espiguillas con sus respectivos antecios cerrados, elegidas en distintos sectores de una misma inflorescencia y fijadas en FAA para su posterior análisis. Las tres anteras de cada espiguilla (n = 90 anteras por población) fueron maceradas y montadas en medio glicerina-gelatina con unas gotas de safranina (Zarlavsky, 2014) y se realizó el conteo de los granos de polen siguiendo las recomendaciones de Cruden (1976) y Dafni (1992) para anteras que contienen una cantidad de granos de polen <2000. Este dato fue empleado para calcular la relación entre el número de granos de polen producido por óvulo y compararlos con las categorías establecidas por Cruden (1977).

Viabilidad polínica: fue estimada a partir de la técnica de tinción con Lugol (2 %) (Johansen, 1940). Para ello se colectó el polen procedente de 5 plantas escogidas al azar de cada población (n = 5 plantas por población) en una misma caja de Petri. Inmediatamente se procedió a la tinción del mismo colocando el polen con un pincel sobre una gota de solución durante 5 minutos. Por cada población se evaluaron 4 réplicas de 200 granos de polen cada una, determinándose el porcentaje de polen teñido.

4.5 Porcentaje de cleistogamia

El porcentaje de cleistogamia fue determinado al comienzo del período de floración durante Noviembre-Diciembre de 2013. El porcentaje fue calculado de un

total de 150 espiguillas basales y 150 espiguillas apicales de 5 inflorescencias tomadas al azar por población ($n = 1500$ espiguillas por población). Las espiguillas se consideraron cleistógamas cuando en el interior del antecio se hallaron conservados de forma completa los estambres y estigmas junto con la cariopsis ya formada (Figura 3 d) (Rosengurtt 1984). El porcentaje de cleistogamia fue definido por el número de espiguillas cleistógamas divididas por el total de espiguillas analizadas (Clay, 1983).

4.6 Producción de semillas bajo distintas condiciones de polinización

Dado que el género *Sporobolus* presenta frutos 1-ovulados, la fracción correspondiente a la relación semilla/óvulo es igual a 1, por lo cual se evaluó la producción de semillas a través del porcentaje de frutos obtenidos bajo distintos tratamientos de polinización. Los tratamientos fueron definidos como:

- Autopolinización a través de dos métodos:
 - 1) Las inflorescencias de 5 plantas tomadas al azar ($n = 5$ inflorescencias por población) fueron cubiertas con bolsas de tela antes de la antesis;
 - 2) Las inflorescencias de 5 plantas en macetas ($n = 5$ inflorescencias por población) fueron aisladas a 600 m de fuentes de polen co-específico antes de su antesis.
- Polinización libre (control): Las inflorescencias de 5 plantas fueron marcadas antes de su apertura.

De cada inflorescencia se analizó el número de frutos formados en tres muestras de 50 espiguillas del sector apical y 50 espiguillas del sector basal ($n = 300$ espiguillas por inflorescencia), calculándose luego el porcentaje de producción de semillas. De esta manera, cada población estuvo representada por $n = 1500$ espiguillas.

4.7 Análisis embriológicos

Para los análisis embriológicos, 5 inflorescencias en distintos estadios de desarrollo de 3 plantas por población ($n = 15$ inflorescencias por población) fueron fijadas en FAA durante 24 horas (Ruzin, 1999) y conservadas posteriormente en

etanol al 70%. Este material, luego de diseccionado, fue tratado con ácido fluorhídrico durante 48 horas para disolver la sílice contenida en sus estructuras. Luego se deshidrató mediante una serie de alcohol-xilol y fue embebido en parafina (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Se realizaron cortes ultrafinos de 7-9 μm de espesor con un micrótopo rotativo. Los cortes fueron posteriormente desparafinados, teñidos mediante tinción diferencial de Safranina y Fast-Green (D'Ambrogio de Argüeso, 1986) y observados en microscopio óptico.

4.8 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Para ello se constató que se cumplan los supuestos de normalidad (mediante test de Wilk-Shapiro) y homogeneidad de varianzas (mediante test de Bartlett). Los datos fueron transformados a la raíz cuadrada del arco seno en caso de no presentar distribución normal, pero los resultados se presentan como medias y desviaciones estándar sin transformar. Las diferencias entre los valores medios fueron sometidos al Test de Tuckey ($p < 0,05$). Estos análisis se realizaron con el software InfoStat versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

5. Resultados

5.1 Fenología de la floración

A nivel de población, la floración fue homogénea y duró unos 206 ± 51 días ($F= 1,40$; $p= 0,20$), exhibiendo una clara superposición entre plantas y poblaciones. La floración comenzó a principios de Octubre de 2012 y continuó hasta el 23 de Julio de 2013, finalizando con la primera helada.

La floración tuvo una duración de aproximadamente $12 \pm 1,60$ días en inflorescencias de todas las poblaciones ($F= 1,10$; $p= 0,40$). La dirección de la floración en la panícula fue basípeta, comenzando en el ápice y continuando hasta la base. Durante el periodo de floración, se observaron numerosas espiguillas con antesis simultánea, incluso en un mismo sector de la inflorescencia (Figura 3a).

Las espiguillas en antesis fueron registradas desde las 7 am hasta las 18 pm durante días largos. Todas las panículas presentaron espiguillas casmógamas

y cleistógamas. Antes de la antesis las ramas estigmáticas se encontraban receptivas y la mayoría de las anteras se tornaron de color rosado. Entre las espiguillas casmógamas se hallaron antecios completamente abiertos (Figuras 3c, 4d) y parcialmente abiertos (Figura 4d). Para las primeras, la antesis comienza con la total separación de la palea, lemma y glumas, las cuales permiten la total exposición de las ramas estigmáticas (Figura 4b). Al mismo tiempo los filamentos estaminales se alargan dejando las anteras por fuera del antecio, y arriba de las ramas estigmáticas, proceso que llevó unos 30–40 minutos desde la apertura del antecio (Figura 4c). Durante los siguientes 20 minutos, las tres anteras se abren de manera longitudinal. Esto permite que el polen sea liberado sobre las ramas estigmáticas del mismo antecio o de los antecios circundantes, sin embargo algo de polen siempre queda retenido dentro de la antera. Luego de esto, las anteras se secan y cambian inmediatamente su color de blancas o rosadas a amarillo o violeta (Figura 3a y c).

En los antecios parcialmente abiertos, las ramas estigmáticas y los estambres se mantienen dentro del mismo. El crecimiento de los filamentos estaminales empujan las anteras hacia las ramas estigmáticas (Figura 4d) de manera que el polen es liberado directamente en las ramas estigmáticas del mismo antecio. Sin embargo, se observó que algo de polen se libera también fuera del antecio.

En ambos casos, las ramas estigmáticas pierden turgencia y se tornan blanquecinas luego de la fertilización. Este proceso puede llevar unos 10 minutos en antecios cuyas anteras están en contacto con las ramas estigmáticas (antecios parcialmente abiertos); o más de 300 minutos en aquellos cuyos órganos son más distantes (antecios completamente abiertos).

En las espiguillas cleistógamas las glumelas (lemma y palea) permanecen cerradas. El filamento estaminal empuja las anteras hacia las ramas estigmáticas y la liberación del polen ocurre dentro del antecio (Figura 4e). Las anteras y ramas estigmáticas son retenidas completamente dentro del antecio hasta la formación del fruto (Figura 3d). Estas espiguillas se presentan con mayor frecuencia en la

base de la inflorescencia (Figura 3b). A la madurez, los pericarpios se humedecen y liberan los utrículos fuera de las espiguillas.

Bajo microscopio estereoscópico, las espiguillas cleistógamas resultaron muy similares en forma y tamaño a las casmógamas, resultando imposible detectarlas previo a la efectiva liberación del polen en antecios cerrados. En las secciones histológicas analizadas se observó que todas las espiguillas presentaron tres anteras con numerosos granos de polen; dos lodículas manifiestas; y el mismo patrón de desarrollo de micro y megagametofito.

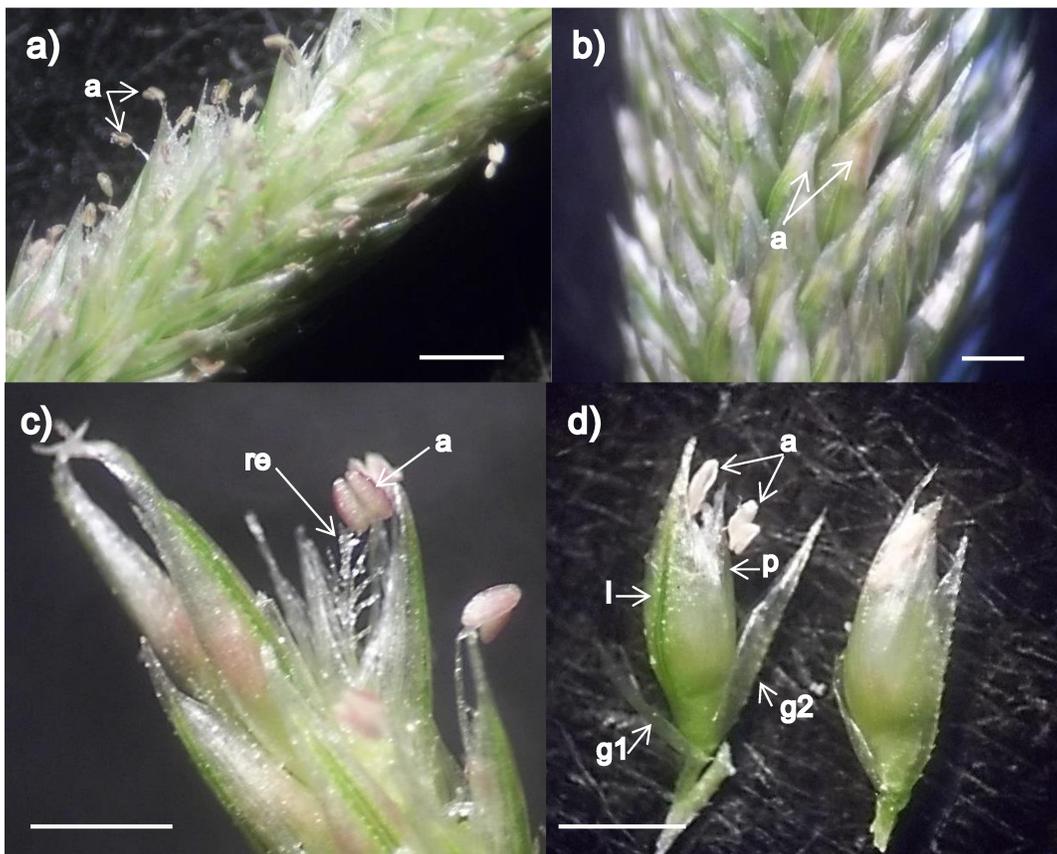


Figura 3: Detalles de la inflorescencia y espiguillas de *S. phleoides*: a) Espiguillas casmógamas en el sector apical de la inflorescencia, con las anteras fuera de los antecios; b) Espiguillas cleistógamas en la porción basal de la inflorescencia, con las anteras incluidas en el antecio; c) Antecio completamente abierto, con anteras y ramas estigmáticas fuera del mismo; d) Frutos inmaduros de espiguillas casmógamas (izquierda) y de espiguillas cleistógamas (derecha). a

anteras, l lemma, g1 gluma inferior, g2 gluma superior, p palea, re ramas estigmáticas. Barra = 1mm.

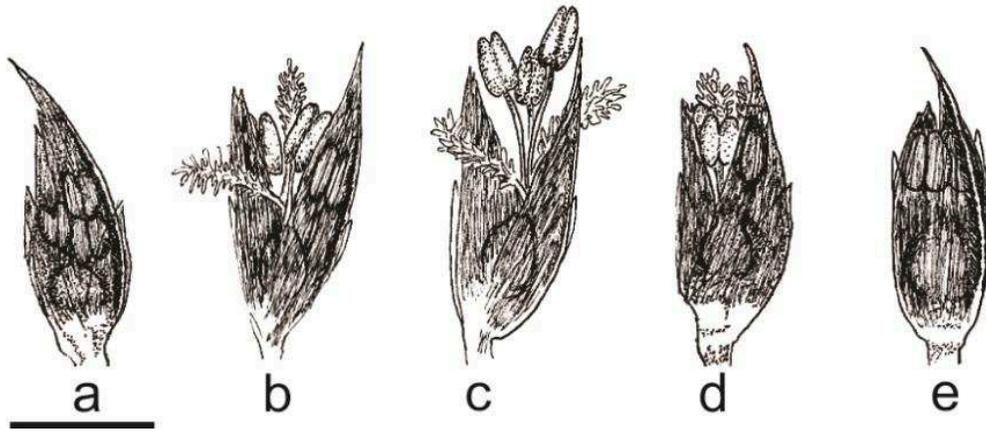


Figura 4: Espiguillas de *S. phleoides*: a) espiguilla cerrada (las ramas estigmáticas ya se encuentran receptivas); b) espiguilla al comienzo de la antesis, con la completa separación de las glumelas (lemma y pálea) (ramas estigmáticas afuera del antecio, y anteras todavía adentro); c) espiguilla completamente abierta (la elongación de los filamentos permite situar a las anteras afuera y por sobre las ramas estigmáticas); d) espiguilla parcialmente abierta (ramas estigmáticas y anteras dentro del antecio y en contacto); e) espiguilla cleistógama. Barra = 1 mm. (Fuente: Richard *et al.*, 2015)

5.2 Receptividad estigmática:

La receptividad de las ramas estigmáticas se inició cuando los antecios se encontraban aún cerrados y se mantuvo hasta la pérdida de su turgencia. La receptividad duró de 40-360 minutos, dependiendo del grado de apertura floral, como fue mencionado anteriormente. No se hallaron diferencias significativas entre las poblaciones con respecto a la duración de la receptividad estigmática ($F= 1,40$; $p = 0,20$).

5.3 Relación P/O y viabilidad polínica

Se hallaron diferencias significativas en las relaciones P/O entre poblaciones ($F= 2,80$; $p= 0,04$), aunque las mismas fueron leves. La población

7610 tuvo la mayor proporción de granos de polen por óvulo (315 ± 42), mientras que la menor relación (226 ± 17) fue obtenida en la población 8415. En las demás poblaciones las relaciones halladas fueron similares (Tabla 3).

La viabilidad de los granos de polen fue de $97 \pm 2\%$, sin registrarse diferencias significativas entre poblaciones ($F= 0,90$; $p= 0,50$).

5.4 Porcentaje de cleistogamia

El porcentaje de espiguillas cleistógamas promedió el $23 \pm 13 \%$ del total de espiguillas evaluadas en todas las poblaciones ($F= 2,40$; $p= 0,06$). Sin embargo se hallaron diferencias significativas entre los sectores basales ($31 \pm 12 \%$) y apicales ($15 \pm 7 \%$) de la inflorescencia ($F= 39,70$; $p < 0,01$) (Figura 5). La producción de frutos fue observada en prácticamente todas las espiguillas.

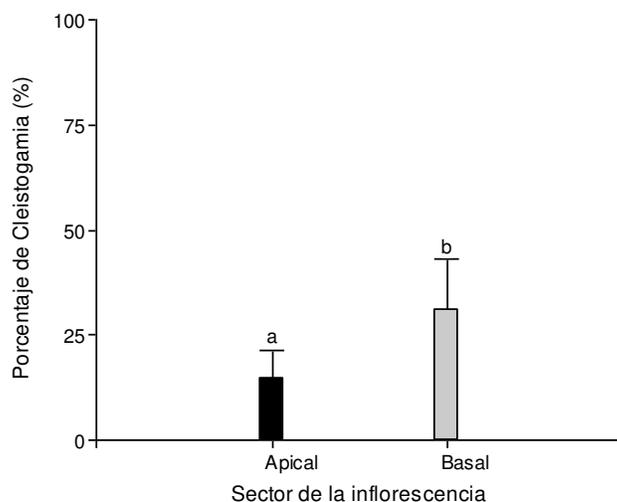


Figura 5: Porcentaje de cleistogamia (%) de sectores apicales y basales de inflorescencias de *S. phleoides* durante el período de floración de noviembre-diciembre de 2013. Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según test de Tuckey.

5.5 Producción de semillas bajo distintas condiciones de polinización

Todas las plantas de las poblaciones analizadas mostraron un elevado porcentaje de producción de semillas, sugiriendo auto-compatibilidad (Tabla 3). No

se hallaron diferencias significativas en los porcentajes de producción de semillas entre plantas sometidas a la autopolinización y a la polinización libre ($F= 1,10$; $p= 0,30$), o en distintos sectores de la inflorescencia ($F= 3,80$; $p= 0,06$). Sin embargo, la producción de semillas fue variable entre las poblaciones evaluadas ($F= 17,30$; $p= 0,01$). El mayor porcentaje fue obtenido en la población 8452, con una media para todos los tratamientos de $99 \pm 1 \%$, y el menor en la población 9722 con una media para todos los tratamientos de $96 \pm 1 \%$.

Tabla 3: Número de granos de polen por óvulo (P/O), viabilidad del polen (%) y producción de semillas (%) bajo distintos tratamientos de polinización para las poblaciones analizadas de *S. phleoides*.

Poblaciones	Número de granos de polen por óvulo (P/O)	Viabilidad de los granos de polen (%)	Producción de semillas (%)		
			Autopolinización (aislamiento)	Autopolinización (embolsadas)	Polinización libre
8028	272 ± 57 ab	96 ± 1	97 ± 2 cd	96 ± 5 cd	95 ± 3 cd
7610	315 ± 42 b	96 ± 3	98 ± 1 b	97 ± 3 b	98 ± 2 b
8415	226 ± 17 a	98 ± 2	96 ± 4 b	99 ± 2 b	98 ± 2 b
8452	257 ± 36 ab	98 ± 2	97 ± 3 a	99 ± 1 a	99 ± 1 a
8393	265 ± 38 ab	96 ± 1	97 ± 4 bc	98 ± 1 bc	97 ± 2 bc
9722	255 ± 32 ab	97 ± 2	98 ± 3 d	95 ± 3 d	95 ± 2 d

Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según test de Tuckey.

5.6 Análisis embriológicos

Todas las plantas mostraron un solo megagametofito por óvulo. Se diferencia una célula arqueospórica del tejido de la nucela que funciona como célula madre de la megáspora (Figura 6a). Esta se divide por meiosis dando lugar a cuatro megásporas haploides que conforman una tétrade en forma de T (Figura 6b). La megáspora calazal es funcional y las otras degeneran. Esta megáspora da lugar al gametofito luego de tres cariocinesis mitóticas sucesivas. El gametofito femenino queda así compuesto por dos sinérgidas, una célula huevo, dos núcleos polares y tres células antípodas (Figura 6c–f). Las antípodas proliferan a 5 o 6 células en los gametofitos maduros (Figura 6g–i).

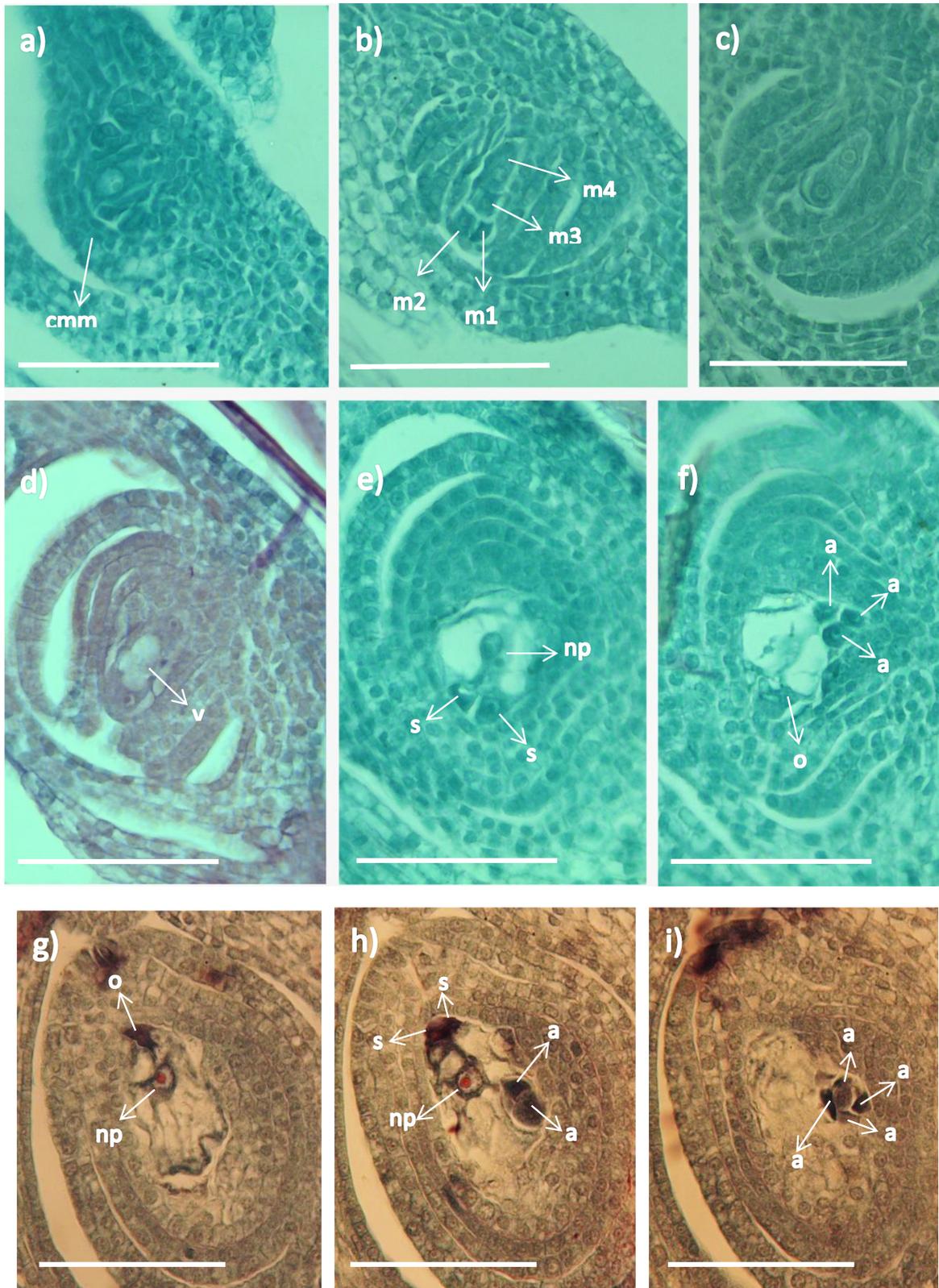


Figura 6: Microfotografías de óvulos de *S. phleoides*: a) célula madre de la megáspora; b) tétrade de megásporas en forma de T; c) primera cariocinesis

mitótica de la megáspora viable; d) saco embrionario binucleado con una vacuola central; e y f) megagametofito tipo *Polygonum* con una célula huevo, dos sinérgidas, dos núcleos polares y tres antípodas; g-i) megagametofito maduro con un grupo de células antípodas. a antípoda; m1, m2, m3 y m4 megásporas; cmm células madre de la megáspora; o célula huevo; pn núcleos polares; s sinérgida; v vacuola. Barra: 50 μm (Fuente: Richard *et al.*, 2015)

6. Discusión

Los resultados indican que *Sporobolus phleoides* se reproduce sexualmente, es principalmente autógena, y presenta espiguillas casmógamas y cleistógamas en la misma inflorescencia.

Sporobolus phleoides, al igual que todas las especies que combinan casmogamia con cleistogamia en el mismo individuo, posee un sistema reproductivo mixto (Lloyd, 1984; Schoen, 1984; Redbo-Torstensson & Berg, 1995; Masuda *et al.*, 2001; Cheplick, 2007). En estos sistemas reproductivos el balance entre autopolinización y polinización cruzada depende de la proporción relativa de los dos tipos de antecios, la cual resulta marcadamente plástica en la mayoría de las gramíneas en relación al modo en que ocurre la cleistogamia (Campbell, 1982; Clay, 1983; Cheplick, 1995; 2007). En varias especies de *Sporobolus*, las espiguillas cleistógamas están encerradas por la hoja bandera al momento de la fertilización, sus antecios no se abren debido a que poseen estructuras florales modificadas o bien porque maduran precozmente antes de emerger la panícula (Parodi, 1928; Riggins, 1977; Doyon & Dore, 1967). Esto puede afectar a una parte o a toda la inflorescencia y puede ser el resultado de una respuesta ambiental (Campbell *et al.*, 1983). En *S. phleoides* se ha observado que las espiguillas cleistógamas están expuestas al momento de la fecundación y ocurren de manera simultánea con las espiguillas casmógamas vecinas a lo largo de toda la panícula, aunque con mayor número en la región basal de la misma. A diferencia de lo que ocurre con esta especie, en *S. indicus* las espiguillas cleistógamas se hallaron sólo en la parte superior de las inflorescencias (Astegiano, 1986). Si bien en este trabajo no se abordó el estudio del mecanismo

que impide la apertura de los antecios, dada la isomorfía observada en ambos tipos de espiguillas (CL y CH) resulta probable que la cleistogamia en *S. phleoides* no sea el resultado de una modificación estructural. Esto fue observado en *S. indicus*, hallándose que la cleistogamia se debe a una ineficacia de las lodículas, y se encuentra determinada por factores intrínsecos relacionados con la economía hídrica (Astegiano, 1986). Este tipo de cleistogamia es a menudo no detectada, y representa una de las menos frecuentes en las gramíneas (Campbell *et al.*, 1983).

La proporción relativa de ambos tipos de antecios, y consecuentemente, el porcentaje de sus semillas derivadas, puede también variar entre poblaciones de la misma especie (Campbell, 1982; Clay, 1983; Cheplick, 2007; Culley & Klooster, 2007). A pesar de esto, no se han hallado diferencias consistentes en los porcentajes de cleistogamia entre las poblaciones estudiadas en este trabajo, el cual alcanza aproximadamente un 23 % independientemente del origen geográfico de las mismas. Este porcentaje se encuentra íntimamente relacionado con el sistema reproductivo ya que las semillas cleistógamas y casmógamas usualmente difieren en caracteres relacionados con la adaptación de la descendencia (offspring fitness) (Campbell *et al.*, 1983; Lloyd & Schoen, 1992; Oakley & Winn, 2008). Debido a que el ambiente, la ontogenia, el tamaño de la planta y los estadios fenológicos pueden afectar el balance entre cleistogamia y casmogamia (Cheplick, 2007), estudios adicionales ayudarían a comprender mejor la estrategia reproductiva de esta especie.

Si bien la cleistogamia garantiza un cierto porcentaje de semillas autofecundadas, se propone que la producción de semillas en *S. phleoides* ocurre principalmente por autofecundación autónoma de sus antecios casmógamos. Las características observadas tales como: cortos ciclos de vida floral, pequeña distancia física entre órganos masculinos y femeninos, y baja P/O, son típicos de especies altamente autofecundas (Sicard & Lenhard, 2011; Kalisz *et al.*, 2012; Duncan & Rausher, 2013). Por otra parte, se infiere que en esta especie puede ocurrir cierta cantidad de polinización por geitonogamia que puede llevarse a cabo de forma espontánea, lo que resulta muy común en especies autocompatibles con inflorescencias compactas y profusa floración (Cruden & Hermann-Parker, 1977;

Lloyd & Schoen, 1992; Barrett, 2002; 2003), especialmente si las fases femeninas y masculinas están constantemente superpuestas (Lloyd & Schoen, 1992). Estos mecanismos pueden ser responsables de la elevada producción de semillas registrada en todas las poblaciones evaluadas de *S. phleoides*, excediendo los valores indicados por Sutherland and Delph (1984) para especies auto-compatibles. De esta manera se obtiene una elevada eficiencia reproductiva y un bajo nivel de aborto de óvulos y semillas.

En ambientes extremos donde habita *S. phleoides*, las elevadas tasas de autofecundación representan una ventaja adaptativa, preservando combinaciones de genes que confieren un alto fitness para el ambiente local (Baker, 1965; Stebbins, 1957; Campbell *et al.*, 1983; Richards, 1986) y asegurando la producción de semillas cuando el número de individuos que compone la población son muy escasos (seguridad reproductiva) (Baker, 1955; Lloyd, 1965; Inouye *et al.*, 1996; Busch, 2011; Cheptou, 2012). Por otra parte, en especies con sistemas reproductivos mixtos, el flujo génico se mantiene debido al potencial cruzamiento que puede representar la presencia de flores casmógamas (Knight & Waller, 1987; Culley & Klooster, 2007).

Aunque la agamospermia fue indicada por Smith-White (1988) para una raza triploide de *S. virginicus*, la megagametogenesis y megasporogenesis en *S. phleoides* sigue el patrón típico de gramíneas con sistemas reproductivos sexuales, siendo muy similar al descrito para *S. indicus* (Astegiano, 1989). No se hallaron irregularidades en la megasporogenesis u otros indicios de apomixis. A la madurez el saco embrionario muestra una estructura tipo *Polygonum*, típica de las gramíneas (Anton & Cocucci, 1984; Johri *et al.*, 1992).

CAPÍTULO III:

Comportamiento germinativo de *Sporobolus phleoides*

1. Introducción

Los factores que condicionan la germinación de las semillas determinan el éxito de los programas de domesticación de especies silvestres (Casler & Van Santen, 2010), las estrategias de siembra para la restauración de ambientes degradados (Bischoff *et al.*, 2006) y constituyen un aspecto importante en la conservación y regeneración de las mismas en los bancos de germoplasma (Plucknett, 1992; Hay & Provert, 2013).

Las semillas de las especies silvestres, no domesticadas, usualmente poseen un periodo de dormancia (o latencia) (Adkins *et al.*, 2002; Baskin & Baskin, 2004) que se desarrolla durante su maduración en la planta madre (dormancia o latencia primaria) (Bewley, 1997; Hilhorst, 1998; Baskin & Baskin, 2014). Durante este periodo, la germinación de semillas intactas y viables es retardada o completamente inhibida aunque las condiciones ambientales de humedad, temperatura, iluminación y gases sean las óptimas (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Baskin & Baskin, 2014). Este fenómeno ha evolucionado de forma diferente entre las especies a través de la adaptación al ambiente, permitiendo que las plantas distribuyan su descendencia en el tiempo, y que la germinación se produzca cuando las condiciones para el establecimiento y crecimiento de una nueva generación tiendan a ser las adecuadas (Baskin & Baskin, 2004; Fenner & Thompson, 2005; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Por otro lado, la falta de dormancia en las semillas permite que éstas germinen prontamente y las plántulas comiencen a desarrollarse cuando las condiciones son favorables para la germinación, maximizando la temporada de crecimiento y reduciendo al mínimo el riesgo de depredación de semillas (Willis *et al.*, 2014).

Existen distintos mecanismos de dormancia, los que han evolucionado de acuerdo a la morfología de las semillas y a la diversidad de climas y hábitats en los que se han desarrollado las especies (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Willis *et al.*, 2014). Esto ha llevado a varios autores a sistematizar la clasificación de los tipos de dormancia basada en el estado de desarrollo del embrión al momento de la dispersión y rasgos físicos (factores endógenos) y en respuestas fisiológicas de las semillas a los estímulos ambientales (factores exógenos)

(Nikolaeva, 1969; Bewley & Black, 1994; Baskin & Baskin, 2014). La caracterización del tipo de dormancia es clave para conocer los factores involucrados en su ruptura y obtener una germinación uniforme y rápida (Adkins *et al.*, 2002). Baskin & Baskin (1998, 2004; 2014) han propuesto un sistema de clasificación que incluye cinco clases de dormancia seminal: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física y combinaciones entre éstas. Este sistema, el cual se resume a continuación, es jerárquico, con estas cinco clases divididas además en niveles y tipos:

Dormancia Fisiológica (DF): es la forma más abundante dentro de las gimnospermas y es asociada a semillas permeables al agua, que presentan un embrión diferenciado y completamente desarrollado. Esta clase puede dividirse a su vez en tres niveles: profunda, intermedia y no profunda. En la DF profunda los embriones removidos de la semilla no son capaces de crecer o producir plántulas normales; los tratamientos con giberelinas no rompen la dormancia, y numerosos meses de estratificación en frío (subclase a) o calor (subtipo b) son necesarios para que la germinación pueda llevarse a cabo. En la DF intermedia y no profunda en cambio, los embriones aislados son capaces de crecer y producir plántulas normales, lo cual puede llevar desde unos meses en el caso de la DF intermedia, o mucho antes en la DF no profunda. Esta última es la más común dentro de las semillas con DF, y según la especie, los tratamientos con giberelinas, escarificación, almacenamiento en seco, y estratificación en frío o calor pueden romper la dormancia. Pueden distinguirse cinco tipos de DF no profunda según los patrones de cambios en las respuestas fisiológicas a la temperatura desarrolladas en Baskin & Baskin (2004).

Dormancia Morfológica (DM): se asocia a semillas con embriones subdesarrollados (en términos de tamaño, pero desarrollados por ejemplo en cotiledones y hipocótilo-radícula). Los embriones en semillas con MD no presentan dormancia fisiológica y no requieren un pretratamiento *per se* para germinar, simplemente necesitan tiempo para crecer al tamaño completo y después germinar (protrusión radicular).

Dormancia Morfofisiológica (DMF): ésta es evidente en semillas con embriones subdesarrollados, los cuales además presentan un componente fisiológico en su dormancia. Estas semillas requieren por lo tanto de tratamientos para romper la dormancia, por ejemplo una combinación definida de estratificación frío y/o calor, la cual en algunos casos puede ser reemplazada por la aplicación de giberelinas. Existen ocho niveles conocidos de DMF basados en un protocolo para la ruptura de la latencia de las semillas y su germinación (Baskin & Baskin, 2004).

Dormancia Física (DY): la misma es causada por las capas impermeables de células en empalizada del fruto o semillas que controlan el flujo de agua. La escarificación química o mecánica puede romper este tipo de dormancia.

Dormancia Combinada (DF + DY): la misma se asocia a semillas con cubiertas seminales impermeables al flujo de agua y que presentan embriones fisiológicamente latentes.

1.2 Dormancia en gramíneas:

La dormancia es frecuente en las gramíneas, pero muy variable entre y dentro de las especies dado que es una característica polimórfica, y por lo tanto dependiente del sistema reproductivo (Simpson, 2007) tan diverso en este grupo (Connor, 1979).

Sin embargo, Adkins *et al.* (2002) señalan que para las gramíneas estivales, los mecanismos de dormancia pueden corresponder a dos tipos básicos: 1) aquellos relacionados a los tejidos que rodean al embrión (cubiertas seminales), y 2) los que se encuentran relacionados al embrión.

Cubiertas seminales: entre éstas se incluyen las cubiertas propias de la cariopsis (la testa y el pericarpio los cuales se encuentran típicamente fusionados en las gramíneas); y aquellas estructuras inmediatamente externas a la cariopsis, como las glumelas, glumas y aristas que pueden formar parte o no de la unidad de dispersión. Estas estructuras pueden actuar como: a) barreras de permeabilidad a la absorción de agua o intercambio gaseoso; b) fuente de inhibidores de la germinación, o impedir la lixiviación de inhibidores de la germinación de tejidos del

embrión durante el proceso de imbibición, y con ello prolongar la latencia indirectamente; c) modificación de la respuesta a la luz; d) barreras mecánicas que impiden la expansión del embrión; y e) una combinación de todos estos factores (Bewley & Black, 1994; Morris *et al.*, Tieu, 2000; Adkins *et al.*, 2002).

Embrión: Los mecanismos asociados al embrión pueden involucrar la expresión de ciertos genes, niveles de ciertos reguladores del crecimiento, la actividad de importantes vías de respiración, o la movilización y utilización de reservas de alimentos (Bewley & Black, 1994; Morris *et al.*, 2000; Adkins *et al.*, 2002). Adicionalmente, algunos embriones pueden ser demasiado inmaduros para germinar inmediatamente y deben someterse a una fase de crecimiento previo a la germinación (Bewley & Black, 1994; Adkins *et al.*, 2002). Por otro lado, Martin (1946) sostiene que las gramíneas presentan embriones bien desarrollados, por lo que Baskin & Baskin (1998) consideran que las gramíneas no presentarían dormancia del tipo morfológica.

1.3 Antecedentes en el género

Entre los factores que promueven la germinación de las semillas de distintas especies del género pueden citarse: la alternancia de temperaturas entre 20 y 35°C (Toole, 1941; Khan & Gulzar, 2003; Joshi *et al.*, 2005; Ferrari, 2008), y la presencia de luz (Lodge 1981; Andrews, 1995; Ferrari, 2008; Khan & Gulzar, 2003) o ausencia de luz (Martínez *et al.*, 1992). Sin embargo, varias especies de *Sporobolus* son conocidas por presentar semillas con dormancia luego de su dispersión (Andrews *et al.*, 1997). Entre los factores endógenos, la dormancia puede estar relacionada tanto al embrión como a sus cubiertas. Lodge (1981) reportó que en algunas especies las semillas al momento de su dispersión presentan embriones inmaduros. En otras, los mecanismos de dormancia están relacionados a sus cubiertas seminales, dado que se han logrado altos porcentajes de germinación luego de la escarificación de las mismas (Toole, 1941). En este sentido, este género constituye una particularidad dentro de las gramíneas ya que el fruto (utrículo) se encuentra libre en el antecio y su pericarpio es mucilaginoso. En varias especies se ha observado que al hidratarse el pericarpio con la humedad ambiental, deja salir las semillas hacia afuera del

antecio, libres de glumas y glumelas (Nicora & Rógolo de Agrasar, 1987). Dada esta particularidad, a diferencia de las demás gramíneas, sería la testa el tejido que estaría jugando un rol preponderante en la dormancia de estas especies, sin embargo en los estudios realizados esta característica ha sido subestimada.

Entre los factores exógenos que han sido empleados para liberar a las semillas de la dormancia se hallan:

- a) Escarificación: Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para romper la dormancia en gramíneas (Adkins *et al.*, 2002; Simpson, 2007) e implica la ruptura de las cubiertas seminales que rodean al embrión ya sea en forma mecánica (mediante limas, papel de lija, percusión), química (ácidos, álcalis, solventes orgánicos o alcohol), o física (exposición a calor seco, a microondas). Sin embargo, la duración e intensidad del tratamiento suelen ser críticos pudiendo provocar la muerte del embrión. En tal sentido, Toole (1941) halló que el ácido sulfúrico al 71% durante 2 a 7 minutos promovió la germinación en cuatro especies de *Sporobolus*, pero su aplicación durante 9 minutos resultó ser perjudicial para *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray. La escarificación mecánica y química (con ácido) mejoró el porcentaje de germinación hasta de 94 % y 98 %, respectivamente en *S. indicus* (L.) R. Br. var *pyramidalis* (Currey *et al.*, 1973).
- b) Almacenamiento en seco: El almacenamiento en seco puede desbloquear lentamente la dormancia debido a un proceso de post-maduración (after-ripening) (Bewley, 1997). Sin embargo, la velocidad a la que se pierde la dormancia en respuesta a la post-maduración depende de varios factores, entre los que se incluyen: las condiciones ambientales preponderantes durante la maduración, almacenamiento y germinación de las semillas (Donohue *et al.*, 2005; El-Keblawy *et al.*, 2009; Vogler & Bahnisch, 2006); de las características propias de la semilla, como el contenido de humedad y/o aceites, y de la estructura de la cubierta seminal (Manz *et al.*, 2005; Sharif-Zadeh & Murdoch, 2001). En relación con esto, en el género los antecedentes son variables. Vogler & Bahnisch (2006) hallaron que las semillas de *S. pyramidalis* P. Beauv. fueron capaces de germinar en su

totalidad luego de 6 meses de almacenamiento bajo temperaturas que fluctuaron entre 15 y 35°C. Para *S. indicus*, 18 meses de almacenamiento a 20°C fueron suficientes para desbloquear la dormancia (Ferrari, 2008). Toole (1941) estudió el efecto del almacenamiento a temperatura ambiente (aprox. 20°C) en siete especies de *Sporobolus*, hallando diversas respuestas: un efecto positivo en *S. cryptandrus*, *S. airoides* (Torr.) Torr., *S. wrightii* Munro ex Scribn. y *S. asper* (Poir.) Merr., pero no para *S. flexuosus* (Thurb. ex Vasey) Rydb. y *S. giganteus* Nash.

- c) Estratificación fría: Este tratamiento consiste en mantener las semillas en frío húmedo, generalmente dentro del rango de 1 a 10°C. Con esto se rompe la dormancia al cabo de un lapso de tiempo que puede ser distinto para cada especie (Bewley & Black, 1994). En *S. indicus* las semillas fueron liberadas de la dormancia luego de 25 días bajo 8°C. Sin embargo, en otras especies de *Sporobolus* no fue posible romper la dormancia de todas las semillas luego de someterlas durante 15 a 30 días bajo 3 a 8°C (Toole, 1941).
- d) Nitratos: Los nitratos en concentraciones bajas también pueden liberar a las semillas de la dormancia (Bewley & Black, 1994), como se ha señalado para varias especies de gramíneas estivales (Adkins *et al.*, 2002). En el género se reportaron respuestas variadas entre y dentro de las especies, actuando como liberador de dormancia para *S. indicus* (Ferrari, 2008), *S. spicatus* Kunth (El-Keblawy, 2013), *S. airoides*, *S. wrightii*, *S. asper* y en algunos materiales de *S. cryptandrus* (Toole, 1941). En otros casos parece tener poco efecto, como fuera señalado para *S. flexuosus*, *S. contractus*, *S. giganteus*, y en algunos materiales de *S. cryptandrus* (Toole, 1941).

2. Hipótesis:

- Las semillas recién cosechadas de *Sporobolus phleoides* presentan dormancia primaria. Predicción: Los porcentajes finales de germinación serán muy bajos en semillas sin almacenamiento y cultivadas en varias condiciones de luz y temperatura.

- Al igual que en sus congéneres, en *S. phleoides* la dormición puede ser superada mediante el efecto combinado de agentes físicos y químicos. Predicción: Se obtendrán elevados porcentajes de germinación bajo cortos períodos de tiempo en semillas: a) con varios meses de almacenamiento a 20°C; b) sometidas a la estratificación en frío; c) con agregados de nitratos; d) con ruptura de la testa.
- Al igual que en la mayoría de las especies de *Sporobolus*, los mecanismos de dormancia en *S. phleoides* están relacionados a las estructuras que cubren el embrión. Predicción: El embrión se encuentra totalmente desarrollado y la ruptura de la testa promueve la germinación.
- Las poblaciones de *S. phleoides* están adaptadas a las condiciones ambientales de cada hábitat particular. Predicción: Existirán diferencias en las respuestas germinativas entre las poblaciones.

3. Objetivos

3.1 General:

Proporcionar información sobre el comportamiento germinativo de *Sporobolus phleoides*.

3.2 Específicos:

- 1) Determinar la presencia de dormancia primaria en *Sporobolus phleoides*
- 2) Analizar la contribución de las distintas partes de la semilla de *Sporobolus phleoides* a la dormancia.
- 3) Hallar métodos para superar la dormancia y obtener una germinación uniforme, elevada y rápida de las semillas de *Sporobolus phleoides*.

4. Materiales y métodos

4.1 Material vegetal

Las semillas que se estudiaron fueron cosechadas en abril de 2012 de plantas cultivadas en el Campo Experimental de la FCA. De cada población se obtuvieron cosechas masales para obtener representatividad genética. Parte de

las mismas fueron empleadas en los distintos ensayos como “semillas sin almacenamiento” o “al momento de cosecha” y otra parte fue almacenada en bolsas de papel a 20°C para los ensayos de post-maduración.

Antes de cada ensayo, las semillas fueron desinfectadas siguiendo la técnica de Aracne (2010) para *S. indicus*.

Dado que naturalmente las semillas de *S. phleoides* son liberadas del pericarpio mucilaginoso sin glumas ni glumelas (Figura 7a), en este trabajo se emplearon semillas sin estas estructuras (Figura 7b) suponiendo que no afectan la germinación en esta especie, como ha sido demostrado para otras especies de *Sporobolus* (Toole, 1941).

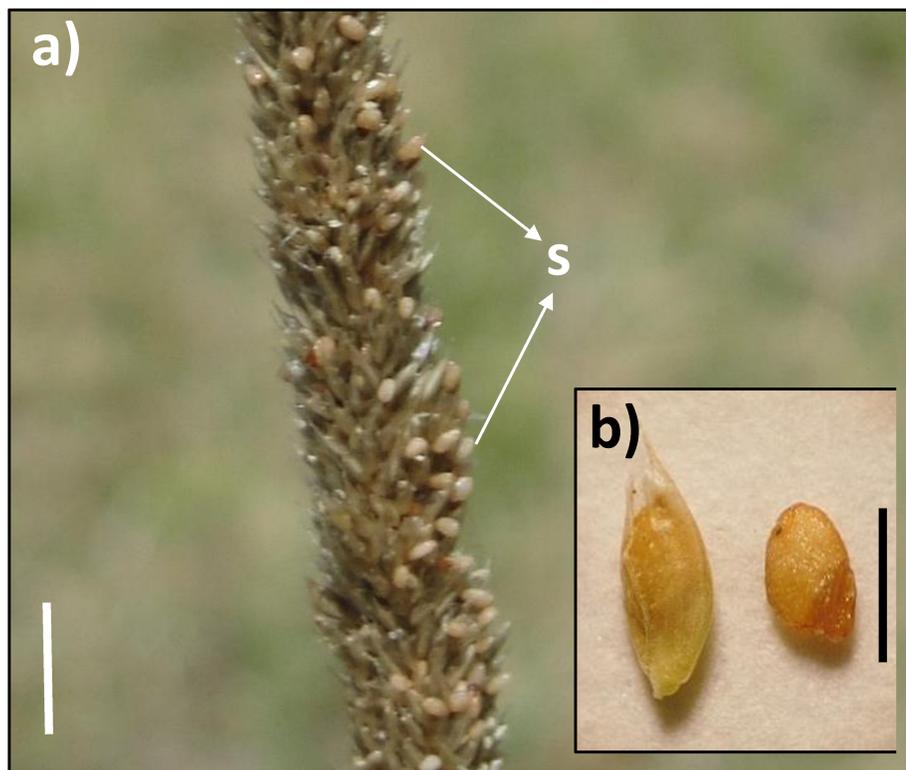


Figura 7: Semillas de *S. phleoides*: a) sector de la inflorescencia con semillas liberadas naturalmente debido a la humedad ambiental sin glumas, glumelas ni pericarpio. Barra= 1 cm; b) detalle de las semillas con glumas, glumelas y pericarpio a la izquierda, y sin estas estructuras a la derecha. S semillas. Barra= 1 mm.

4.2 Viabilidad seminal

Se evaluó la viabilidad de las semillas de cada cosecha masal al momento de cosecha y a los 12, 18 y 24 meses de almacenamiento en seco, mediante la prueba topográfica de Tetrazolio. Para ello, las semillas fueron sumergidas en agua destilada durante 12 horas, luego de lo cual parte del endosperma fue removido empleando una cuchilla de afeitar. De esta manera, el resto de la semilla que contenía el embrión fue colocado en un recipiente con una solución de sal de tetrazolio al 1 % (Peretti, 1994) durante 10 horas, a 30°C en oscuridad (Figura 8). Posteriormente se enjuagaron en agua destilada y se determinó la viabilidad de cada semilla bajo microscopio estereoscópico según el patrón de coloración desarrollado por Ferrari (2008) para *S. indicus*. Se analizaron cuatro réplicas de 50 semillas cada una (n = 200 por población) para cada tiempo de almacenamiento (0; 12; 18; y 24). La variable analizada fue el porcentaje de semillas viables.



Figura 8: Embriones viables de *S. phleoides* teñidos de rojo luego de ser sometidos en solución de tetrazolio al 1 % durante 10 h, a 30°C en oscuridad. A las 24 h presentan crecimiento radicular. Barra = 1 mm.

4.3 Efecto de diferentes niveles de luz y temperatura sobre la germinación de las semillas al momento de la cosecha

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar si las semillas de *S. phleoides* son liberadas de la planta madre con dormancia primaria. Para ello se evaluaron distintas condiciones de germinación, determinadas por el efecto combinado de luz y temperatura. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con distribución factorial (poblaciones x luz x temperatura). Los tratamientos fueron definidos por tres niveles de luz:

- luz continua
- oscuridad continua
- ciclos de alternancia entre luz y oscuridad de 16 h y 8 h respectivamente,

combinados con 5 niveles de temperatura:

- dos temperaturas continuas de 20°C y 30°C
- tres condiciones de alternancia de temperaturas de 15-20°C, 20-30°C, y 25-35°C, en ciclos de 16 y 8 h respectivamente.

Para todos los tratamientos de luz en este trabajo se emplearon 3 tubos fluorescentes de luz blanca fría de 30 W cada uno (aproximadamente 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Se analizaron cuatro réplicas por población y por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 50 semillas ($n = 200$ semillas por población y tratamiento) en placas de Petri con tres capas de Whatman No. 1 de filtro humedecidas con agua destilada.

Los recuentos de germinación se realizaron cada 2 días de iniciado el ensayo, considerándose germinadas aquellas que produjeron plántulas normales (plúmula y radícula desarrolladas) (Figura 9). Las variables evaluadas fueron porcentaje final de germinación (PFG) a los 15 días [$\text{PFG}=(n_i/n_t)*100$, donde: n_i =número de semillas germinadas a los 15 días, n_t =número de semillas viables (determinado en el ensayo de viabilidad)] y coeficiente de velocidad de germinación (CG) [$\text{CG}=\sum(n_i/\sum t_i)$, donde: n_i =número de semillas germinadas registradas en el intervalo de tiempo (t_i), y $\sum t_i$ =el período desde la siembra hasta t_i , (Maguire, 1962)].



Figura 9: plántula normal de *Sporobolus phleoides* con plúmula y radícula desarrolladas. Barra: 1 cm

4.4 Efecto del almacenamiento sobre la germinación de semillas

Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del almacenamiento en seco a 20°C sobre el comportamiento germinativo de las semillas de las poblaciones analizadas. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con distribución factorial (poblaciones x tiempo de almacenamiento x temperatura x luz). Los tratamientos fueron definidos por la combinación de cuatro niveles para el factor 'tiempo de almacenamiento': semillas con 0 (al momento de cosecha), 12, 18 y 24 meses de almacenamiento; combinado con 5 niveles de temperaturas:

- una constante de 30°C
- dos condiciones de alternancia de 20/30°C y 25/35°C en ciclos de 16 h/8 h respectivamente

y tres niveles de luz:

- luz continua
- oscuridad continua

- ciclos de alternancia entre luz y oscuridad de 16 h y 8 h respectivamente

Se analizaron cuatro réplicas por población y por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 50 semillas ($n = 200$ semillas por población y tratamiento) dispuestas en placas de Petri con tres capas de papel de filtro Whatman No. 1 humedecidas con agua destilada.

Los recuentos de germinación se realizaron cada 2 días de iniciado el ensayo, considerándose germinadas aquellas que produjeron plántulas normales (plúmula y radícula desarrolladas) y se evaluaron las variables PFG e IM de la misma manera que en el ensayo anterior.

4.5 Efecto de la estratificación fría y nitratos

Para evaluar el efecto combinado de estos factores sobre el comportamiento germinativo de semillas al momento de cosecha, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con distribución factorial (poblaciones x estratificación en frío x nitratos). Los tratamientos fueron definidos por dos niveles para el factor 'Nitratos':

- Presencia de nitratos: placas de Petri con tres capas de papel de filtro Whatman No. 1 humedecidas con una solución de KNO_3 al 0,2 %;
- Ausencia de nitratos: placas de Petri con tres capas de papel de filtro humedecidas con agua destilada;

combinados con tres niveles de 'Estratificación en frío', el que consistió en dejar las placas de Petri envueltas en papel aluminio en heladera (a 8°C) durante 100, 30 y 0 (control) días. Las mismas placas fueron posteriormente pasadas a una estufa a 30°C para analizar su germinación.

Se analizaron cuatro réplicas por población y por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por 50 semillas ($n = 200$ semillas por población y tratamiento). Se evaluaron las variables PFG y CG de la misma manera que en los ensayos anteriores.

4.6 Punzado

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar el efecto de la cubierta seminal en el comportamiento germinativo. Para ello se empleó un diseño experimental

completamente al azar con distribución factorial (poblaciones x punzado). Los tratamientos fueron definidos por dos niveles para el factor 'Punzado':

- Semillas perforadas: una vez hidratadas por 4 horas en agua destilada a temperatura ambiental, se realizó una perforación en la mitad de cada semilla con una aguja de disección para alterar su testa.
- Semillas intactas (control): las semillas fueron hidratadas durante 4 horas, pero no se les aplicó ninguna perforación.

Posteriormente, estas semillas fueron colocadas en placas de Petri con tres capas de papel de filtro Whatman No. 1 humedecidas con agua destilada y se cultivaron a oscuridad a 30 °C. Cada combinación consistió en cuatro réplicas de 50 semillas (n = 200 semillas por población y tratamiento). Se evaluaron las variables PFG y CG de la misma manera que en los ensayos anteriores.

4.7 Análisis de la contribución de las distintas partes de la semilla a la dormancia

Estos ensayos se realizaron con semillas de sólo dos poblaciones (8028 y 8415), las cuales fueron seleccionadas por su comportamiento contrastante de germinación observada en los ensayos anteriores.

a) Absorción de agua:

Mediante este ensayo se examinó la tasa de absorción de agua en semillas perforadas e intactas. Para ello se empleó un diseño experimental completamente al azar con distribución factorial (Población x Tratamiento). Los tratamientos quedaron definidos por:

- Semillas perforadas: una vez hidratadas por 4 horas en agua destilada a temperatura ambiental, se realizó una perforación en la mitad de cada semilla con una aguja de disección para alterar su testa.
- Semillas intactas (control): las semillas fueron hidratadas durante 4 horas, pero no se les aplicó ninguna perforación.

Luego de estos tratamientos, las semillas fueron secadas durante 24 h a temperatura ambiente (25°C) en oscuridad antes de iniciar el estudio de absorción de agua. Luego fueron pesadas (peso estimado en el tiempo 0) y envueltas en

papel de filtro humedecido con agua destilada a saturación para su hidratación bajo temperatura ambiente en oscuridad. El mismo conjunto de semillas fue pesado cada 2, 4, 6, 8 y 24 h.

Se emplearon 4 repeticiones de 100 semillas por cada tratamiento ($n = 400$ semillas por población y tratamiento). La variable analizada fue el 'porcentaje de imbibición' calculada para cada intervalo de tiempo considerado.

b) Germinación de embriones y presencia de inhibidores:

Para evaluar la posible presencia de inhibidores en las cubiertas seminales o endosperma, se adaptó la técnica propuesta por Duclos et al. (2013). Para ello se obtuvieron soluciones moliendo 500 semillas sin sus embriones en 2 ml de agua destilada. Esto se dejó macerar durante 24 h a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad, con la finalidad de extraer posibles inhibidores químicos. Por otro lado, se diseccionaron los embriones de semillas previamente hidratadas. De esta manera se definieron los siguientes tratamientos:

- Embriones con inhibidores: los embriones fueron colocados en papel humedecido con 2 ml de la solución que contenía los posibles inhibidores químicos. El papel fue doblado a la mitad para cubrir completamente los embriones.
- Embriones sin inhibidores: los embriones fueron colocados en papel humedecido con 2 ml de agua destilada. El papel fue doblado a la mitad para cubrir completamente los embriones.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con distribución factorial (Poblaciones x Tratamiento). Estos tratamientos se colocaron en cajas de Petri cerradas herméticamente para no perder la humedad. Se emplearon cuatro réplicas de treinta embriones cada una ($n = 120$ embriones por tratamiento y población). A las 24 h se realizó un conteo de los embriones germinados. La variable analizada fue 'porcentaje de embriones germinados'.

Además se realizaron cortes histológicos de semillas al momento de cosecha para observar el estado de desarrollo de sus embriones. Para ello, estas semillas fueron previamente hidratadas durante 12 horas. Luego se fijaron en FAA por 24 horas y posteriormente fueron deshidratados mediante una serie de

alcohol-xilol para finalmente ser embebidos en parafina (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Se realizaron cortes ultrafinos de 10 μm de espesor con un micrótomo rotativo. Luego de desparafinados, se les aplicó una tinción diferencial de Safranina y Fast-Green (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

4.8 Análisis estadísticos:

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Para ello se constató que se cumplan los supuestos de normalidad (mediante test de Wilk-Shapiro) y homogeneidad de varianzas (mediante test de Bartlett). Los datos fueron transformados a la raíz cuadrada del arco seno en caso de no presentar distribución normal, pero los resultados se presentan como medias y desviaciones estándar sin transformar. Las diferencias entre los valores medios fueron sometidos a una prueba de Tuckey ($p < 0,05$). Estos análisis se realizaron con el software InfoStat versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

5. Resultados

5.1 Viabilidad Seminal

El porcentaje de viabilidad seminal fue igualmente elevado en todas las poblaciones ($F = 0,30$; $p = 0,91$), y se mantuvieron así durante todos los meses de almacenamiento evaluados (0; 12; 18; y 24), con una media de $94,23 \pm 4,61$ % para todos los casos, sin registrarse diferencias estadísticamente significativas entre los mismos ($F = 0,29$; $p = 0,83$).

5.2 Efecto de diferentes niveles de luz y temperatura sobre la germinación de semillas al momento de la cosecha

Los valores de germinación fueron muy bajos para todas las combinaciones evaluadas, en ningún caso la media superó el 3 % de germinación final. Sin embargo, se registró interacción entre Poblaciones y las condiciones de Luz ($F = 2,14$, $p < ,05$ para PFG; $F = 2,46$ $p < 0,05$ para CG) (Figura 10b), y entre las Poblaciones y las Temperaturas ($F = 2,22$; $p < 0,05$ para PFG; $F = 2,03$, $p < 0,05$

para CG) (Figura 10a), mostrando una respuesta diferencial entre las poblaciones, en particular bajo temperaturas elevadas.

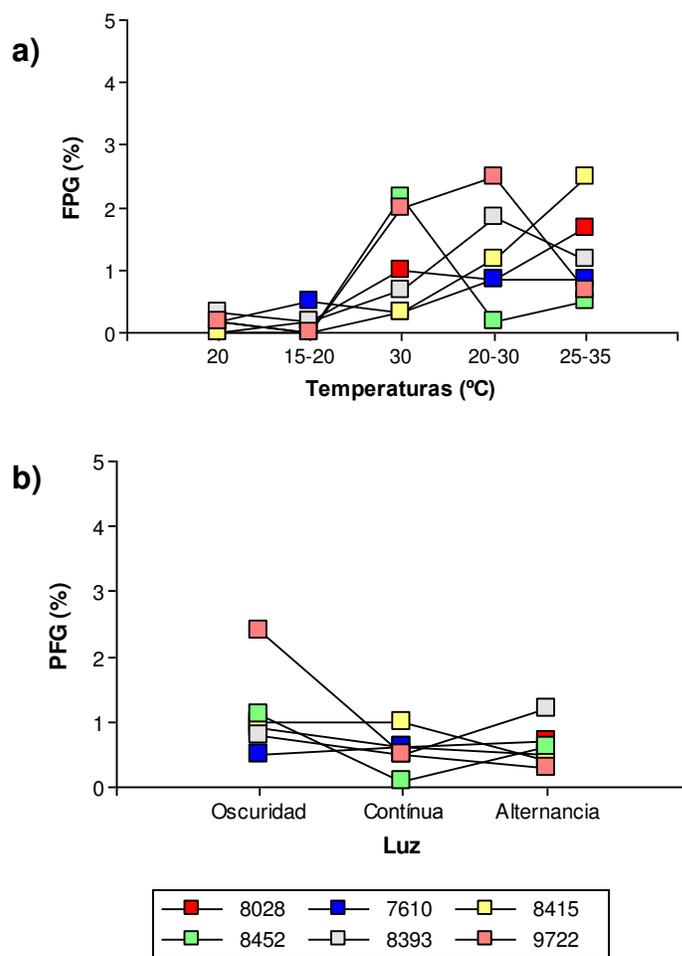


Figura 10: Porcentajes finales de germinación PFG (%) para distintas poblaciones de *Sporobolus phleoides*: a) en interacción con distintos niveles de temperaturas (°C); b) en interacción con distintos niveles de luz (luz continua, ciclos de alternancia entre luz y oscuridad de 16 h y 8 h respectivamente, y oscuridad)

5.3 Efecto del almacenamiento sobre la germinación de semillas

Con relación a las distintas condiciones de Luz evaluadas, en ninguna de las poblaciones ni tratamientos realizados se evidenciaron diferencias importantes con respecto a la presencia o ausencia de luz ($p < 0,05$ para PFG). Por ello, con la intención de simplificar el análisis, se emplearon sólo los datos de germinación obtenidos en condiciones de oscuridad.

A pesar que fue registrada una interacción estadísticamente significativa de segundo orden entre los factores Poblaciones, Tiempo de almacenamiento y Temperatura ($F= 4,07$ $p < 0,0001$ para PFG; y $F= 1,94$ $p < 0,05$ para CG), en ningún caso se superó el 50 % de PFG (Figura 11). Sólo dos poblaciones (8452 y 8415) respondieron al almacenamiento en seco, alcanzando su mejor respuesta entre los 12 y 18 meses bajo 30°C. La germinación más elevada se obtuvo para la población 8415, con un 39 ± 2 % de TPG (Figura 11c). Las poblaciones restantes alcanzaron una media de 10 % de TPG bajo todos los tratamientos evaluados.

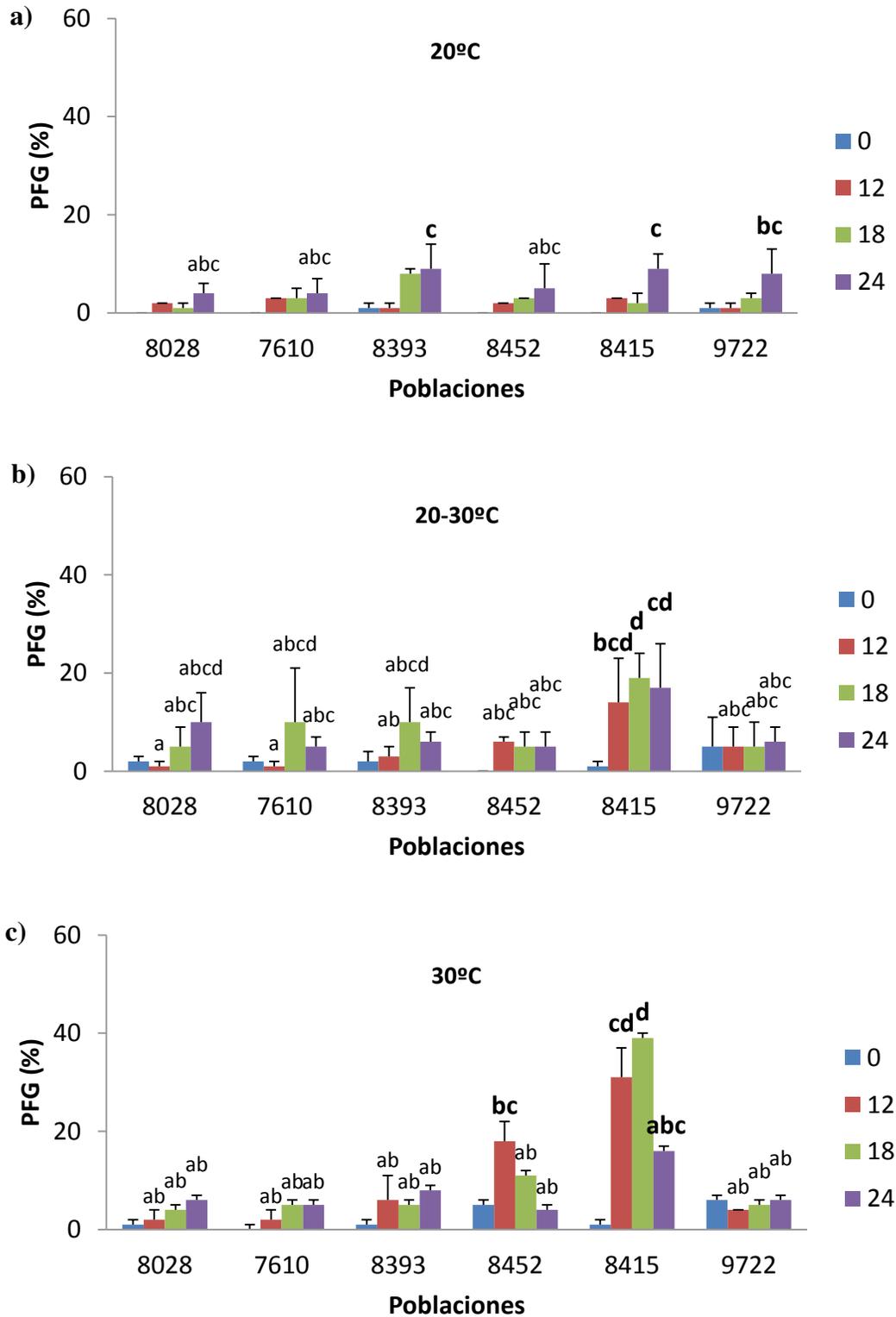


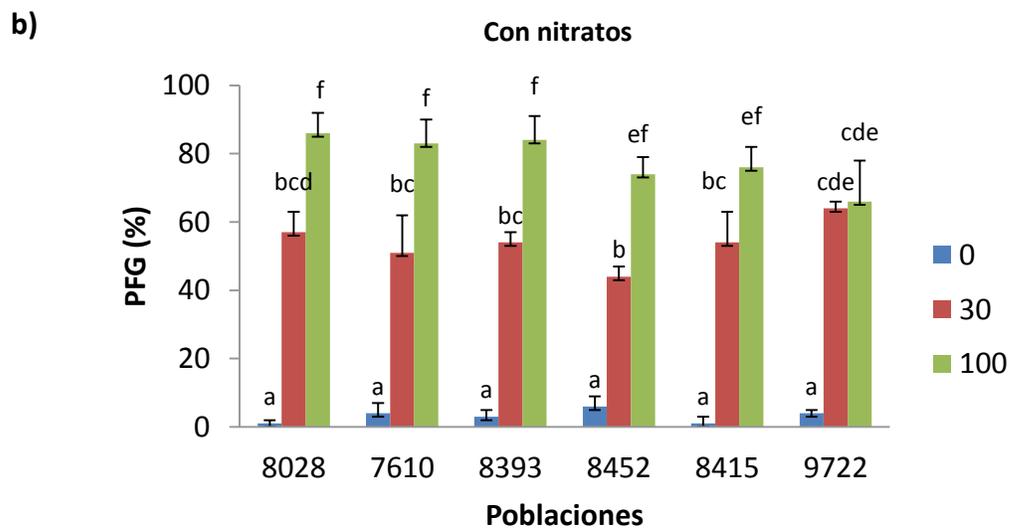
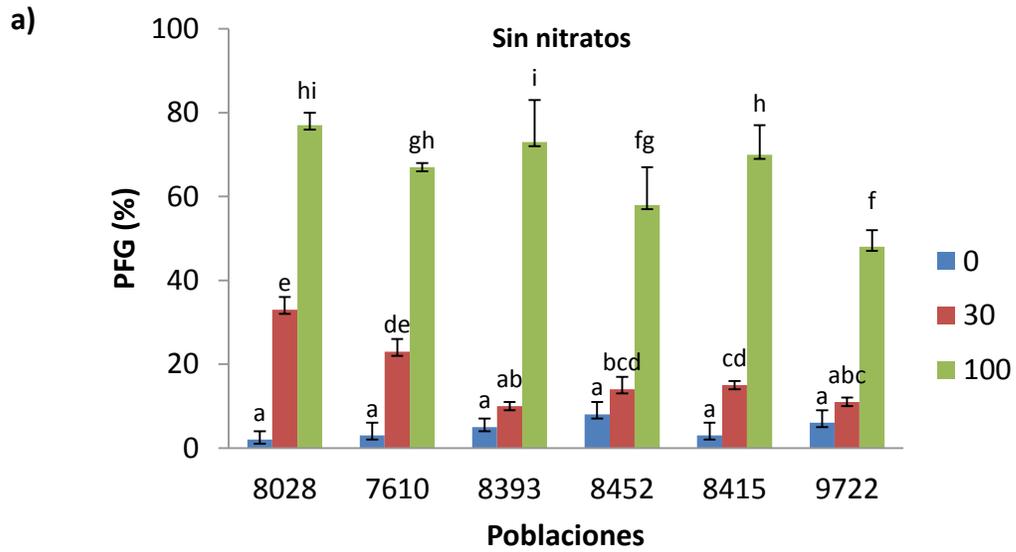
Figura 11: Porcentajes finales de germinación PFG (%) de semillas viables de las seis poblaciones de *Sporobolus phleoides* con distintos tiempos de

almacenamiento (0, 12, 18 y 24 meses) cultivadas bajo distintas condiciones de temperaturas en oscuridad: a) a 20°C; b) a 20-30°C; y c) a 30°C. Las medias con letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0.05$) según test de Tuckey.

5.4 Efecto de la estratificación fría y nitratos

Se registró interacción triple entre los efectos de la estratificación fría, nitratos y poblaciones, la cual fue significativa para las dos variables analizadas (PFG: $F = 4,08$, $p < 0,05$; CG: $F = 2,96$, $p < 0,05$). Sin embargo, la estratificación fría tuvo una influencia importante en la ruptura de la dormancia en las semillas recién cosechadas (Figura 12).

En general, se registró un incremento en la germinación (PFG y CG) en semillas con 30 días de estratificación en frío, y en combinación con nitratos el resultado fue mayor, alcanzando valores de PFG desde 44 % (población 8452) a 64 % (población 9722). Sin embargo, la mejor respuesta obtenida fue con 100 días de estratificación en frío en combinación con nitratos. En este último caso, las poblaciones más occidentales (8028, 7610 y 8393) fueron las más sensibles, alcanzando un PFG superior al 80 %; en cambio la población 9722 mostró mayor dormancia ya que obtuvo una media de 66 ± 7 % de PFG (Figura 12b). No se observaron diferencias en el PFG y CG de las semillas empleadas como control (sin estratificación) de todas las poblaciones evaluadas cultivadas con o sin nitratos.



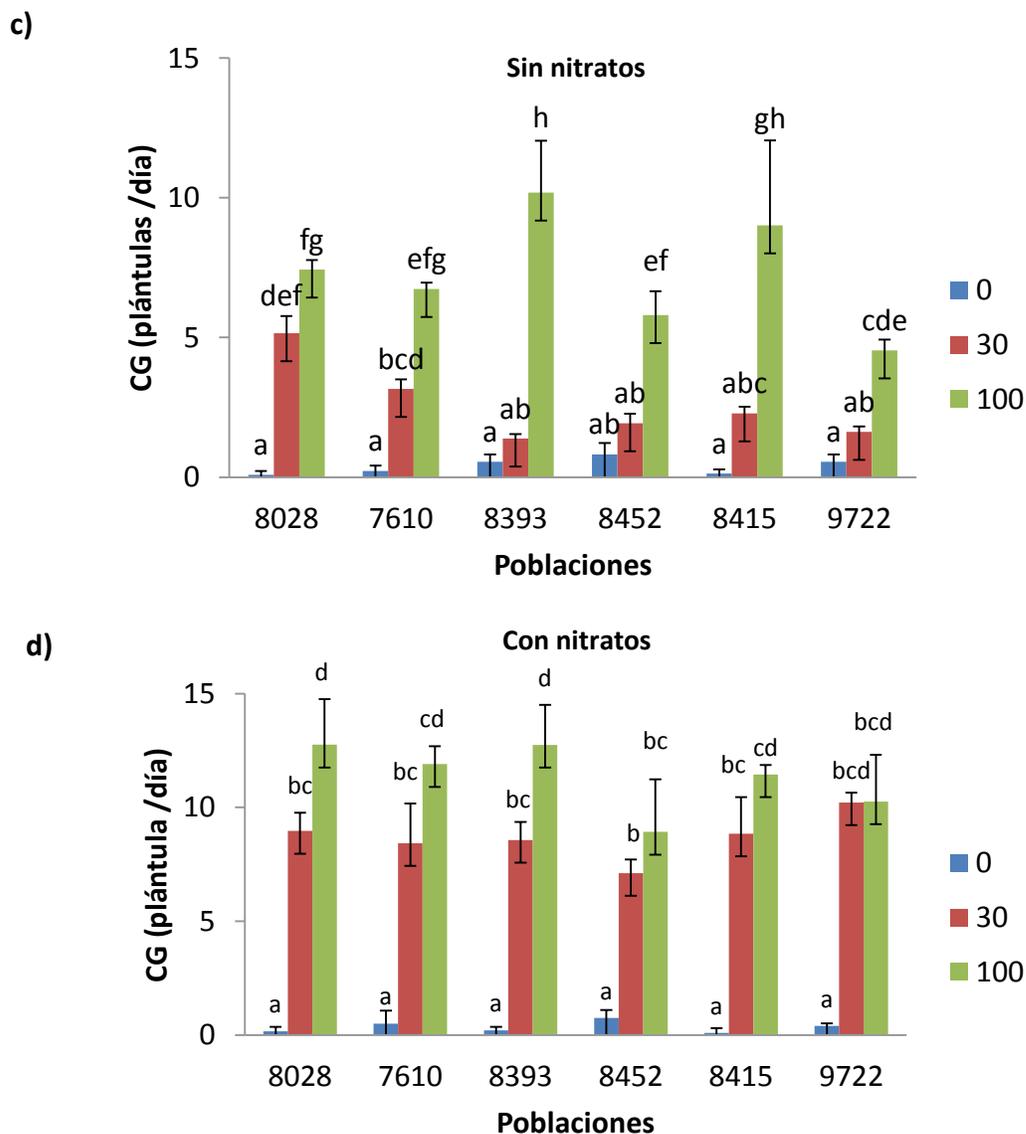


Figura 12: Porcentajes finales de germinación PFG (%) de semillas viables y Coeficiente de germinación CG para seis poblaciones de *Sporobolus phleoides* sometidas a distintos tratamientos de estratificación en frío (0, 30 y 100 días) cultivadas a 30°C en oscuridad, expuestas a dos tratamientos con nitratos: a) PFG para semillas sin nitratos; b) PFG para semillas con nitratos (cultivadas con solución de KNO₃ al 0,2 %); c) CG para semillas sin nitratos; y d) CG para semillas con nitratos. Las medias con letras distintas significan diferencias significativas ($p < 0,05$) según test de Tuckey.

5.5 Punzado

Las semillas perforadas de todas las poblaciones evaluadas alcanzaron los valores máximos de germinación, PFG y CG ($95 \pm 5 \%$ y $16,5 \pm 1$, respectivamente) a partir del tercer día de germinación (Figura 13); mientras que para semillas intactas, se obtuvo un $2 \pm 2 \%$ del PFG y $0,1 \pm 0,1$ de CG en quince días de germinación.

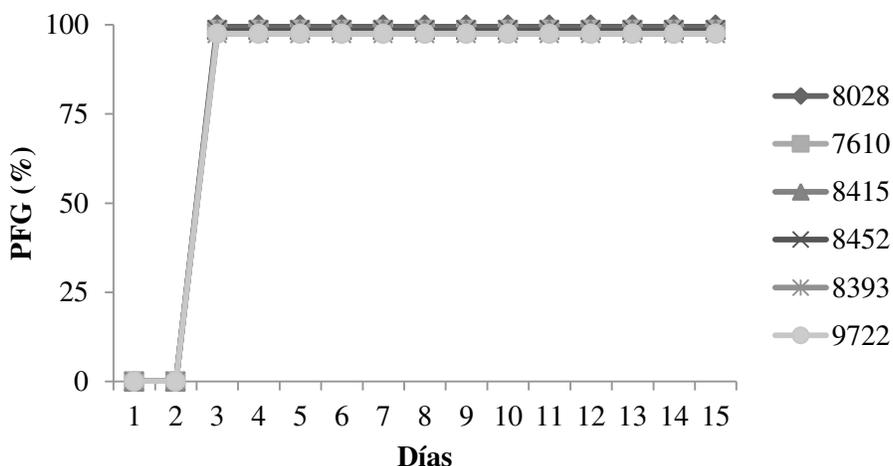


Figura 13: Curvas de respuesta de germinación de semillas perforadas (con la testa alterada) de las seis poblaciones evaluadas de *Sporobolus phleoides* (8028, 7610, 8415, 8452, 8393, y 9722) cultivadas a 30°C en oscuridad. PFG (%): Porcentaje de germinación final de semillas viables.

5.6 Análisis de la contribución de las distintas partes de la semilla a la dormancia

a) Absorción de agua

Después de las 24 h de imbibición, se observaron diferencias significativas en los porcentajes de imbibición entre los tratamientos y las poblaciones evaluadas ($F= 93,5$, $p<0.0001$; $F= 42,1$, $p<0,0001$, respectivamente). La población 8415 mostró una mayor capacidad de imbibición que la población 8028, pero ambos lotes de semillas mostraron curvas de imbibición similares (Figura 14).

La tasa y el porcentaje de imbibición fueron mayores en las semillas perforadas que en las semillas intactas. En las primeras se observó una fase de

imbibición rápida durante las primeras 2 h, con un porcentaje de imbibición de casi el doble que el obtenido en semillas intactas, y la aparición de la radícula a las 24 h. En las semillas intactas, el porcentaje máximo de imbibición se obtuvo a las 8 h y no se detectaron signos de emergencia radicular.

Cabe destacar que no se hallaron diferencias significativas en el peso seco inicial entre semillas perforadas e intactas ($F= 1,97$ $p= 0,18$).

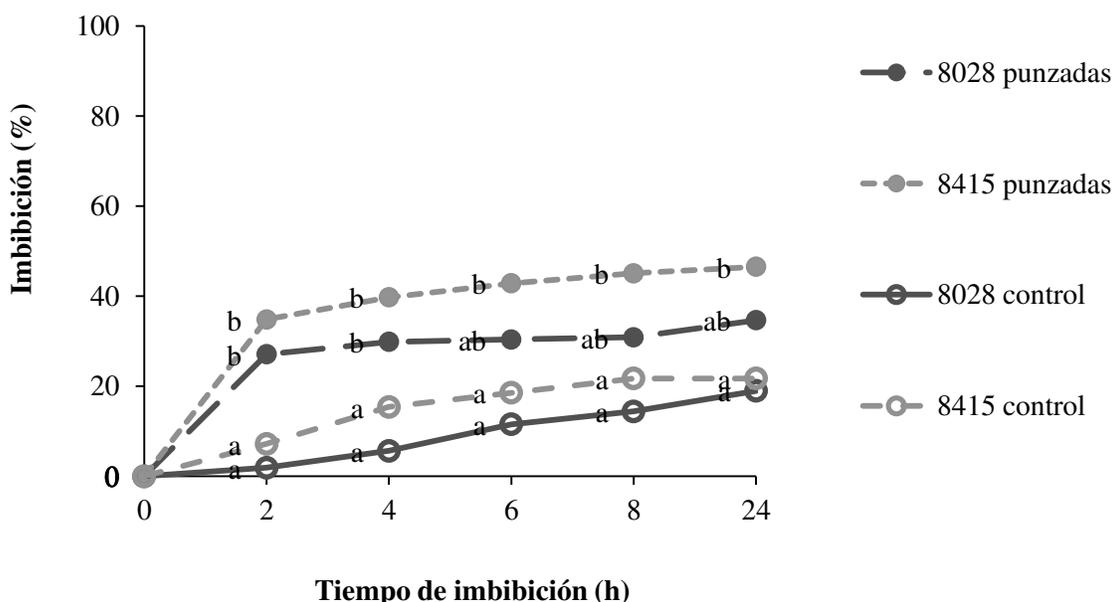


Figura 14: Efecto de la testa en la imbibición de dos poblaciones de *Sporobolus phleoides*. Los promedios en cada población seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con la prueba de Tuckey.

b) Germinación de embriones y presencia de inhibidores

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y las poblaciones evaluadas. Los embriones se hallan diferenciados y desarrollados (Figura 15) y fueron capaces de germinar ya sea al ser cultivados en solución con posibles inhibidores, o en agua destilada, alcanzando una media de 94 ± 6 % de embriones germinados a las 24 horas.

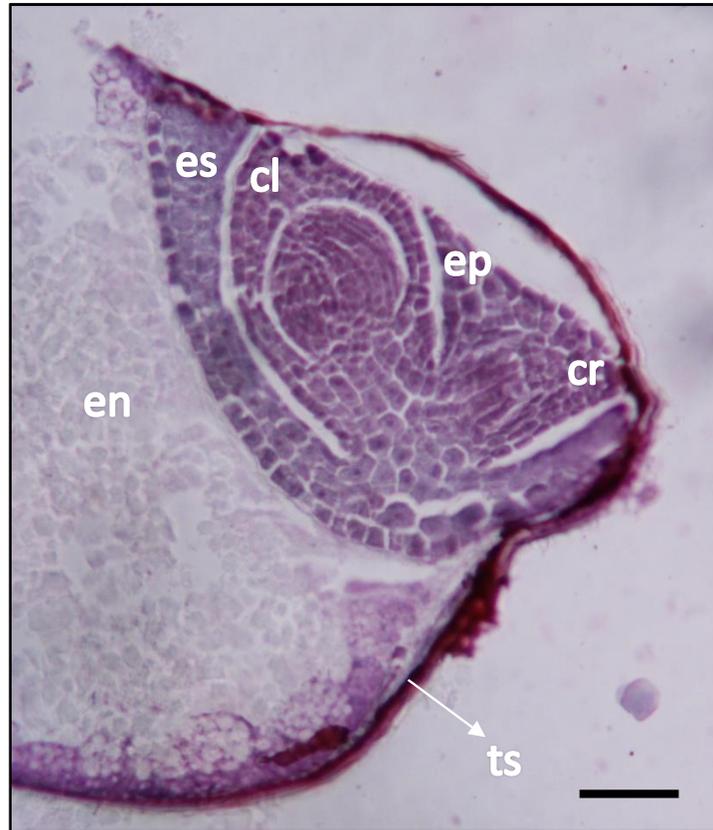


Figura 15: Embrión maduro de *S. phleoides*. cl: coleóptilo; cr: coleorriza; en: endosperma; es: escutelo; ep: epiblasto; ts: tegumento seminal. Barra = 50 μ m

6. Discusión

Los bajos porcentajes de germinación obtenidos en todas las poblaciones de semillas cultivadas bajo las diversas combinaciones de luz y temperatura evaluadas en este trabajo, indican que las semillas de *Sporobolus phleoides* son liberadas de la planta madre con dormancia primaria. Esto es consistente con lo señalado para otras especies de *Sporobolus* (Toole, 1941; Persad, 1980; Andrews, 1995; Andrews *et al.*, 1997; Khan & Ungar, 2001; Vogler & Bahnisch, 2006; Ferrari, 2008).

Como ya se ha mencionado, los mecanismos de dormancia pueden estar relacionados a las cubiertas que envuelven al embrión; o bien al embrión mismo (Simpson, 2007; Adkins *et al.*, 2002). A diferencia de lo que halló Lodge (1981) para algunas especies del género, los embriones en *S. phleoides* se encuentran bien diferenciados y plenamente desarrollados, siendo capaces de germinar

cuando la cubierta de la semilla está dañada. Esto indica que sus embriones son viables y que los mecanismos de dormancia en esta especie se encuentran relacionados a la cubierta seminal, lo que ha sido indicado también en otras especies de *Sporobolus* (Toole, 1941). La cubierta seminal en este género está constituida sólo por la testa (Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987), representando una particularidad dentro de las gramíneas, para las cuales la dormancia puede asociarse a una cubierta seminal conformada por el pericarpio y la testa que se encuentran fusionados.

Son varios los mecanismos de dormancia que pueden estar relacionados a la cubierta seminal (Bewley & Black, 1994). Según Baskin & Baskin (1998), las cubiertas seminales de las gramíneas no presentan las gruesas capas en empalizada características de semillas con dormancia física, y son capaces de embeberse cuando son dispuestas en un sustrato húmedo. En correspondencia con esta afirmación, la testa en *S. phleoides* es permeable al agua y sus semillas intactas son capaces de embeberse. Esto también fue observado para otras especies de *Sporobolus*, para las cuales se ha propuesto que la cubierta seminal puede constituir entonces una barrera que impida el intercambio gaseoso (Toole, 1941; Vogler & Bahnisch, 2006), aunque no ha sido comprobado. Vogler & Bahnisch (2006) sugieren que en *S. pyramidalis* la dormancia puede deberse al contenido de inhibidores químicos como los taninos hallados en especies del género *Triticum* por Bewley & Black (1994). Adkins & Bellairs (1995) registraron para varias especies de gramíneas la presencia de inhibidores químicos de la germinación en diversos tejidos de las cubiertas seminales, tales como el ácido abscísico (ABA) y la cumarina entre los más importantes, además de catequinas, taninos y fenoles. Sin embargo, algunos autores sostienen que en general las gramíneas no desarrollan inhibidores, o bien éstos tienen un efecto mínimo sobre la germinación (Simpson, 2007; Ducklos *et al.*, 2013). Para este género sólo se ha descrito la presencia de sustancias similares al tanino en las células de la testa de *S. coromandelianus* (Retz) Kunth. (Satyamurty, 1983), pero no se han realizado estudios para comprobar su influencia en la germinación. En este trabajo no se ha

podido demostrar la presencia de inhibidores de la germinación en la testa/endosperma de las semillas de *S. phleoides*.

Simpson (2007) sugiere que la perforación de la cubierta seminal podría implicar una mayor disponibilidad de agua para el embrión. Esto permitiría que el embrión genere una fuerza expansiva suficiente como para romper la cubierta de la semilla (Baskin *et al.*, 2006). En la especie estudiada se observó que al perforar la testa se aumenta significativamente la tasa de imbibición, las semillas fueron capaces de absorber más cantidad de agua y de germinar de manera rápida y uniforme. Toole (1941) también observó aumento en la tasa de absorción de agua en semillas escarificadas y en semillas sin dormancia. Estudios complementarios como el desarrollo de la cubierta seminal y perforaciones en distintas partes de la semilla podrían ayudar a comprender mejor este aspecto.

Los resultados obtenidos sugieren que *S. phleoides* presenta una dormancia del tipo fisiológica no profunda (NDP), según las clasificaciones propuestas por Baskin & Baskin (2004) y Finch-Savage & Leubner-Metzger (2006). Este tipo de dormancia es bien conocida en las gramíneas y por lo general su ruptura implica períodos de estratificación en frío (Baskin & Baskin, 2014), típico de las especies que inician su ciclo en primavera (Baskin & Baskin, 1987; Baskin *et al.*, 1993; 1995). Para *S. phleoides*, la estratificación húmeda a 8°C promueve significativamente la germinación, y los mejores resultados se obtuvieron luego de 100 días, lo que coincidiría con el período invernal de su área de distribución natural. Sin embargo, no fue posible romper la latencia de todas las semillas, como se observó también en otras especies de *Sporobolus* (Toole, 1941).

Se ha demostrado que bajas concentraciones de nitratos en actúan como promotores de la germinación en varias especies de gramíneas estivales (Adkins *et al.*, 2002). En *S. indicus*, el KNO_3 desbloquea la dormancia primaria (Ferrari, 2008), pero en otras especies del género de su efecto fue variable (Toole, 1941). En *S. phleoides* produce efectos sólo bajo la acción combinada con estratificación en frío. Una germinación elevada, rápida y uniforme fue obtenida cuando las semillas fueron estratificadas durante 100 días en combinación con nitratos,

aunque existió un porcentaje variable de semillas con dormancia entre las poblaciones evaluadas.

El almacenamiento en seco puede liberar lentamente los niveles de dormancia debido a un proceso de post-maduración, siendo un fenómeno variable entre y dentro de especies. Para *S. phleoides* se observó que el almacenamiento en seco a 20°C promovió la germinación sólo en dos poblaciones (8452 del Chaco Húmedo y 8415 del Espinal del Algarrobo), y sus respuestas fueron mejores bajo 30 °C luego de 12 y 18 meses de almacenamiento. Este comportamiento sugiere que pudo haberse inducido una dormancia de tipo secundaria (Batlla & Benech-Arnold, 2010). La variación intraespecífica en respuesta al almacenamiento en seco ha sido registrado también en otras especies silvestres como *Oryza ssp. L.* (Veasey *et al.*, 2004) y *Paspalum dilatatum* Poir. (Glison *et al.*, 2014). Por lo tanto, las respuestas al tiempo de almacenamiento en seco, o las condiciones requeridas para lograr niveles más bajos de dormancia pueden ser consideradas para la selección de los genotipos deseables.

El tratamiento de perforación fue el único capaz de liberar a las semillas de *S. phleoides* de su dormancia, pero resulta difícil de aplicar en la práctica para un gran número de semillas. Una técnica que puede simular los efectos de la perforación es la escarificación (Simpson, 2007). Este ha sido el método más utilizado para romper la dormancia impuesta por las cubiertas seminales en gramíneas forrajeras estivales (Adkins *et al.*, 2002), y ha funcionado para algunas especies de *Sporobolus* (Toole, 1941; Currey *et al.*, 1973). A futuro, se tendrá que adecuar un método de escarificación que permita obtener una germinación rápida y uniforme de las semillas de *S. phleoides*.

Las demandas para reducir la dormancia fueron variables entre las poblaciones de *S. phleoides*. Sin embargo, ha sido ampliamente demostrado que el grado de dormancia es dependiente tanto de factores genéticos como de las condiciones ambientales que gobernaron durante el desarrollo de las semillas en la planta madre (Bewley & Black, 1994; Li & Foley, 1997; Simpson, 2007). A pesar de sus diferentes orígenes, las semillas empleadas en este trabajo fueron obtenidas de un ambiente uniforme, por lo que la variabilidad observada en el

comportamiento germinativo podría ser atribuible entonces a diferencias genéticas (Baskin & Baskin, 1973). El conocimiento de esta variabilidad es un requisito básico para estudios relacionados con la domesticación y conservación de semillas en bancos de germoplasma.

CAPÍTULO IV:

Discusión general y conclusiones

1. Discusión general

La gran complejidad genética que presentan la mayoría de las poblaciones de plantas silvestres y las formas posibles en que los recursos genéticos pueden ser utilizados en el futuro, hacen que sea difícil proporcionar sistemas de muestreo generales simples y eficientes y que el tamaño de las muestras sean las óptimas para la conservación de todas las especies (Namkoong, 1986; Vogler & Vanish, 2011). En este sentido, el conocimiento de aspectos básicos de la biología de las especies resulta fundamental para poder adaptar las estrategias de colecta y la regeneración del material conservado, dado que durante estos procesos es muy común la ocurrencia de deriva genética (Brown & Marshal, 1995; Vogler & Vanish, 2006; Crossa & Vencovsky, 2011). En este trabajo se aporta información esencial para adecuar las actividades de colecta, conservación y utilización del germoplasma de *Sporobolus phleoides*.

El conocimiento obtenido sobre el sistema reproductivo de esta especie, permitirá estimar cómo se estructura la diversidad genética entre las poblaciones naturales, constituyendo uno de los factores más importante en el control de la diversidad y evolución genética (Charlesworth & Wright, 2001; Glemin *et al.*, 2006).

En especies con sistema reproductivo mixto como *S. phleoides*, las proporciones de autogamia y alogamia son las que determinan la estructura genética de la progenie. En especies que presentan cleistogamia, este balance depende de la proporción relativa de los dos tipos de flores, la que es plástica en la mayoría de las gramíneas (Campbell, 1982; Clay, 1983; Cheplick, 1995; 2007). Sin embargo, en la especie estudiada, características de sus antecios casmógamos como cortos ciclos de vida floral, pequeña distancia física entre órganos masculinos y femeninos, y baja relación P/O, estarían asegurando elevadas tasas de autogamia (Sicard & Lenhard, 2011; Kalisz *et al.*, 2012; Duncan & Rausher, 2013), en todas las poblaciones de *S. phleoides* estudiadas. Si las tasas de autofecundación dentro de las poblaciones naturales son similares a las obtenidas en este trabajo, la especie se estaría comportando como una especie autógena, esperándose entonces una gran proporción plantas homocigotas,

conformando poblaciones fuertemente estructuradas en líneas puras (Jain, 1975; Charlesworth & Wright, 2001; Glemin *et al.*, 2006). Por esto, a la hora de planificar su colecta como recurso fitogenético, será más importante priorizar un gran número de poblaciones (de distintos sitios), a expensas del número de individuos por población en cada sitio (Brown & Marshal, 1995).

Sin embargo, no se debe subestimar el efecto potencial de los cruzamientos. La floración estacional y sincrónica entre plantas y poblaciones, la floración masiva de individuos y el gran número de espiguillas que se encuentran en anthesis simultáneamente, implican la existencia de un cierto flujo génico que aumentaría las chances de alogamia y reduciría las probabilidades de diferenciación de las poblaciones en subpoblaciones (Loveless & Hamrik 1984). Debido a esto, resultaría de importancia para esta especie obtener la tasa de cruzamiento mediante metodologías moleculares adecuadas, como las empleadas por Tomas *et al.* (2013) para gramíneas perennes. De todas maneras, Crossa & Vencovsky (2011) proponen un número de plantas y semillas por planta para planificar la colecta y la regeneración del germoplasma en especies con sistema reproductivo mixto y tasas de autogamia conocidas, bajo un tamaño poblacional efectivo deseado.

Otro aspecto importante abordado en este trabajo consistió en conocer el comportamiento germinativo de *S. phleoides*. Dado que los mecanismos de dormancia en esta especie están principalmente ligados a la testa seminal, se requieren tratamientos que produzcan una ruptura en la cubierta seminal para su óptima germinación. Para análisis de germinación efectivos en esta especie, se recomienda la perforación de las semillas previamente hidratadas y su posterior cultivo a 30°C en oscuridad y sobre papel humedecido con agua destilada; con recuentos iniciales y finales de germinación durante el primer y tercer día, respectivamente. Para el análisis de la viabilidad de las semillas, se sugiere aplicar el tratamiento descrito en la sección 4.2 del Capítulo III.

Varios estudios sobre el comportamiento germinativo en gramíneas con cleistogamia muestran que existen diferencias entre las semillas obtenidas de antecios casmógamos y las provenientes de antecios cleistógamos. En

Dichanthelium clandestinum (L.) Gould por ejemplo, las semillas de antecios casmógamos demandan más tiempo en germinar y tienen un menor porcentaje de germinación que las provenientes de auquillos cleistógamos; pero en *Stipa brachychaeta* Godr. las semillas de antecios casmógamos presentan un comportamiento germinativo relativamente más simple que las provenientes de antecios cleistógamos (Campbel *et al.*, 1983). A pesar de que en este trabajo se observó que las demandas para reducir la latencia fueron variables entre las poblaciones evaluadas, esto no tuvo correlación con los porcentajes de cleistogamia registrados, ya que fueron similares para todas estas poblaciones. Sin embargo, estos datos de cleistogamia fueron tomados durante el inicio del período de floración, y es sabido que la proporción de ambos tipos de antecios suele estar influenciada tanto por la ontogenia como por las condiciones ambientales (Cheplick, 2007) por lo cual su estudio debería ampliarse.

Si bien las poblaciones empleadas representan parte del área de distribución de la especie, por tratarse de un endemismo de Argentina que presenta una alta tolerancia a la salinidad, sería importante mejorar la dimensión espacial en futuros estudios, dado que los diferentes rasgos reproductivos e interacciones biológicas son susceptibles de variación regional a lo largo del rango de distribución geográfica de una especie (Travis, 1996; Thompson, 1997).

El carácter ortodoxo (Hong & Ellis, 1996) y la elevada producción y viabilidad de semillas, hacen de *S. phleoides* una especie con características que facilitarían la colecta, conservación y regeneración en un banco de germoplasma (Rao *et al.*, 2007).

2. Conclusiones

- *Sporobolus phleoides* se reproduce sexualmente y presenta un sistema reproductivo mixto, caracterizado por la presencia de espiguillas casmógamas y cleistógamas, con un claro predominio de la autogamia. Por lo que en sus poblaciones se podrían obtener una gran proporción de plantas

homocigotas conformando líneas puras. Se sugiere que en los planes de colección sea priorizado el número de poblaciones a coleccionar.

- Las semillas de *S. phleoides* son liberadas de la planta madre con dormancia primaria de tipo fisiológica no profunda. Sus embriones son viables y los mecanismos de dormancia se encuentran relacionados a la testa seminal. Debido a esto, se requieren tratamientos que produzcan la ruptura de su cubierta seminal para su óptima germinación.
- Para análisis de germinación en esta especie se recomienda la perforación de semillas previamente hidratadas y cultivarlas a 30°C en oscuridad. Se recomienda 1 a 3 días para realizar los recuentos iniciales y finales de germinación, respectivamente.
- Las poblaciones demostraron ser bastante homogéneas en cuanto a los caracteres reproductivos evaluados en este trabajo, pero mostraron distintos comportamientos de germinación, lo cual debería ser tenido en cuenta en futuros trabajos.
- La información obtenida contribuirá a planificar adecuadamente las estrategias de colecta, conservación y regeneración, consideradas básicas en bancos de germoplasma y en planes de mejoramiento forrajero, de este importante recurso fitogenético endémico para áreas afectadas por la salinidad en Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adkins S.W.; Bellairs S.M.; Loch D.S. (2002). Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica*, 126: 13-20.
- Aliscioni S.S.; Gómiz N.E.; Torretta J.P.; Pensiero J.F (2011). Reproductive biology of *Setaria magna* Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Pl. Syst. Evol.*, 293: 111-118
- Allard R.W. (2000). Principles of plant breeding. John Wiley & Sons, New York.
- Anderson D.L. (1980). Manejo racional de un campo en la región árida de los Llanos de La Rioja (República Argentina). Parte 1: Manejo del pastizal natural y producción ganadera. INTA, Buenos Aires.
- Andrews T.S. (1995). Dispersal of seeds of giant *Sporobolus* spp. after ingestion by grazing cattle. *Aust. J. Exp. Agric.*, 35: 353-356.
- Andrews T.S.; Jones C.E.; Whalley R.D.B. (1997). Factors affecting the germination of Giant Parramatta grass (*Sporobolus indicus*). *Aust. J. Exp. Agric.*, 37: 439-446.
- Anton A.M.; Cocucci A.E. (1984). The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Pl. Syst. Evol.*, 146: 117-21.
- Aracne M. (2010). Efecto de la polinización libre y la autopolinización en el éxito reproductivo pre-emergente y la germinación en poblaciones de *Sporobolus indicus* (Poaceae). Tesis de grado, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Armbruster W.S.; Debevec E.M.; Willson M.F. (2002). Evolution of syncarpy in angiosperms: theoretical and phylogenetic analyses of the effects of carpel fusion on offspring quantity and quality. *Int. J. Evol. Biol.*, 15: 657-672.
- Aronson J.A. (1989). Haloph, a data base of salt tolerant plants of the world. University of Arizona, Tucson.

- Ashman T.L.; Schoen D.J. (1996). Floral biology. Floral longevity: fitness consequences and resource costs. (Lloyd D.G.; Barrett S.C.), Chapman and Hall, New York. 112-139.
- Astegiano M.E. (1986). La cleistogamia y casmogamia en *Sporobolus indicus* (Poaceae). Kurtziana, 18:69-76.
- Baaijens G.; Veldkamp J. (1991). *Sporobolus* (Gramineae) in Malesia. Blumea, 35 (2): 393-458.
- Baker H.G. (1955). Self-compatibility and establishment after "longdistance" dispersal. Evolution, 9: 347-348.
- Baker H.G. (1965). The genetics of colonizing species. Characteristics and modes of origin of weeds. (Baker H.G.; Stebbins G.L.). Academic Press, New York, 147-172.
- Ballesteros H.M. (2010). Análisis de la tolerancia a la salinidad en los primeros estadios de desarrollo en planta de *Sporobolus indicus* (L.) R.Br. y *Sporobolus phleoides* Hack. (Poáceae, subfamilia Chloridoideae)". Tesis de grado, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Barrett S.C.H. (2002). Sexual interference of the floral kind. Heredity, 88: 154-159.
- Barrett S.C.H. (2003). Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. Philos. Trans., Ser. B, 358: 991-1004.
- Barrett S.C.H.; Eckert C.G. (1990). Biological approaches and evolutionary trends in plants. Variation and evolution of mating systems in seed plants. (Kawano S.) Academic Press, Tokio. 229-254.
- Baskin C.C.; Baskin J.M. (1998). Population biology of grasses. Ecology of seed dormancy and germination in grasses. (Cheplick G.P). Cambridge University Press, Cambridge.

- Baskin C.C.; Baskin J.M. (2014). Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Second Edition. Elsevier, San Diego.
- Baskin C.C.; Chesson P.L.; Baskin J.M. (1993). Annual seed dormancy cycles in two desert winter annuals. *Journal of Ecology*, 81: 551-556.
- Baskin C.C.; Meyer S.E.; Baskin J.M. (1995). Two types of morphophysiological dormancy in seeds of two genera (*Osmorhiza* and *Erythronium*) with an Arcto-Tertiary distribution pattern. *Am. J. Bot.*, 82: 293-298.
- Baskin C.C.; Thompson K.N.; Baskin J.M. (2006). Mistakes in germination ecology and how to avoid them. *Seed Sci. Res.*, 16: 165-168.
- Baskin J.M.; Baskin C.C. (1973). Plant population differences in dormancy and germination characteristics of seeds: heredity or environment?. *Am. Midl. Nat.*, 90: 493-498.
- Baskin J.M.; Baskin C.C. (1987). Temperature requirements for after-ripening in buried seeds of four summer annual weeds. *Weed Research*, 27: 385-389.
- Baskin J.M.; Baskin C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.*, 14: 1-116.
- Batlla D.; Benech-Arnold R.L. (2010). Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Mol. Biol.*, 73(1-2): 3-13.
- Bewley J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9(7): 1055-1066.
- Bewley J.D.; Black M. (1994). Seeds: physiology of development and germination. Second Edition. Plenum Press, London.
- Bhullar N.K.; Street K.; Mackay M.; Yahiaoui N.; Keller B. (2009). Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the Pm3 resistance locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106: 9519-9524.

- Bischoff A.; Cremieux L.; Smilauerova M.; Lawson C.S.; Mortimer S.R.; Dolezal J.; Müller-Schärer H.E.I.N.Z. (2006). Detecting local adaptation in widespread grassland species—the importance of scale and local plant community. *Journal of Ecology*, 94(6): 1130-1142.
- Brown A.H.D.; Marshall D.R. (1995). Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. A basic sampling strategy: theory and practice. (Guarino L.; Ramanatha Rao V.; Reid R.). CAB International, Wallingford. 75-91.
- Brunet J. (1992). Sex allocation in hermaphroditic plants. *Trends Ecol. Evol.* 7: 79-84.
- Busch J.W. (2011). Demography, pollination, and Baker's law. *Evolution*, 65(5): 1511-1513.
- Cabrera A. L. (1994). Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería, Tomo II, Fascículo 1: Regiones Fitogeográficas Argentinas. ACME, Buenos Aires.
- Campbell C.S.; Quinn J.A.; Cheplick G.P.; Bell T.J. (1983). Cleistogamy in grasses. *Annual Rev. Ecol. Syst.*, 14: 411-441.
- Caponio I.; Pensiero J.F. (2002). Comportamiento citológico y reproductivo de *Setaria Pflanzii* (Poaceae). *Darwiniana*, 40(1-4): 17-23.
- Casler MD; Van Santen E (2010) Fodder Crops and Amenity Grasses. Handbook Of Plant Breeding: Breeding Objectives in Forages. (Boller B.U.; Posselt K.; Veronesi F.). Springer, New York. 115-136.
- Cerino M.C.; Richard G.A.; Torretta J.P.; Gutiérrez H.F.; Pensiero J.F. (2015b). Reproductive biology of *Ziziphus mistol* Griseb.(Rhamnaceae), a wild fruit tree of saline environments. *Flora*, 211: 18-25.
- Cerino M.C.; Torretta J.P.; Gutiérrez H.F.; Richard G.A.; Pensiero J.F. (2015a). Reproductive biology of *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil.(Caricaceae), a moth-pollinated 'highland papaya'. *Pl. Syst. Evol.*, 301(2): 589-598.

- Charlesworth D.; Wright S.I. (2001). Breeding systems and genome evolution. *Curr. Opin. Genetics Dev.*, 11(6): 685-690.
- Cheplick G.P. (1994). Life history evolution in amphicarpic plants. *Pl. Spec. Biology*, 9(2): 119-131.
- Cheplick G.P. (1995). Plasticity of seed number, mass, and allocation in clones of the perennial grass *Amphibromus scabrivalvis*. *Int. J. Pl. Sci.*, 156: 522-529.
- Cheplick G.P. (2007). Plasticity of chasmogamous and cleistogamous reproductive allocation in grasses. *Aliso*, 23(1): 286-294.
- Cheptou P.O. (2012). Clarifying Baker's law. *Ann Bot*, 109(3), 633-641.
- Clay K. (1983). Variation in the degree of cleistogamy within and among species of the grass *Danthonia*. *Am. J. Bot.* 70: 835-43.
- Clayton W.D.; Vorontsova M.S.; Harman K.T.; Williamson H. (2006). GrassBase – The online World grass flora. The Board of Trustees. Royal Botanic Gardens Kew, London.
- Connor H.E. (1979). Breeding systems in the grasses: a survey. *New Zeal. J. Bot.* 17: 547-574.
- Connor H.E. (1981). Evolution of reproductive systems in the Gramineae. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 68: 48-74.
- Crossa J.; Vencovsky R. (2011). Basic sampling strategies: theory and practice. Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. Bancos de Germoplasma No. 6. Bioversity International, Rome.
- Cruden R.W. (1977). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31: 32-46.
- Cruden R.W.; Hermann-Parker S.M. (1977). Temporal dioecism: an alternative to dioecism. *Evolution*, 31: 863-866.

- Cruden R.W.; Lyon D.L. (1985). Patterns of biomass allocation to male and female functions in plants with different mating systems. *Oecologia (Berl.)*, 66: 299-30.
- Cugen J.; Acheroy M.; Loutfy A.L.; Petit D.; Vernet P. (1989). Breeding system differentiation in *Arrhenatherum elatius* populations: evolution toward selfing?. *Evol. Trend. Plant*, 3(1): 17-24.
- Culley T.M.; Klooster M.R. (2007). The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. *Bot. Rev.*, 73(1): 1-30.
- Currey W.L.; Parrado R.; Jones D.W. (1973). Proceedings of the 32nd Soil Crop Science Society of Florida. Seed characteristics of smutgrass. (Gainesville F.L.). Soil and Crop Science Society of Florida, Florida. 53-54.
- D'Ambrogio de Argüeso A. (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Dafni A. (1992). Pollination ecology: a practical approach. Oxford University Press, New York.
- De León M. (2009). Utilización de pasturas megatérmicas *Rev. Braford*, 25(61): 66-69.
- Denham S.S. (2012). *Sporobolus* R. Br. Flora vascular de la República Argentina. Monocotyledoneae, Poaceae: Aristidoideae a Pharoideae. (Zuloaga F.O.; Rúgolo Z.E.; Anton A.M.). Graficamente, Córdoba. 208–218.
- Deregibus V.A. (1994). Situación de la forrajicultura en Argentina: Una propuesta para su mejoramiento a través de recursos genéticos. Primeras Jornadas Nacionales de Producción de Semillas y Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras, Buenos Aires, sept 1992. 1-6.

- Di Rienzo J.A.; Casanoves F.; Balzarini M.G.; Gonzalez L.; Tablada M.; Robledo C.W. (2011) InfoStat versión 2011. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz R.O. (2007). Utilización pastizales naturales. Editorial Brujas, Córdoba.
- Donohue K.; Dorn L.; Griffith C.; Kim E.; Aguilera A.; Polisetty C.R.; Schmitt, J. (2005). The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution*, 59(4): 758-770.
- Doyon D.Y.; Dore W.G. (1967). Notes on the distribution of two grasses, *Sporobolus neglectus* and *Leersia virginica* in Quebec. *Can. Field Nat.* 81: 30-2.
- Duclos D.V.; Rayb D.T.; Johnson D.J.; Taylor A.G. (2013). Investigating seed dormancy in switchgrass (*Panicum virgatum* L.): understanding the physiology and mechanisms of coat-imposed seed dormancy. *Ind. Crop Prod.*, 45: 377-387.
- Duncan T.M.; Rausher M.D. (2013). Evolution of the selfing syndrome in *Ipomoea*. *Front Plant. Sci.*, 4(301): 1-8.
- El-Keblawy A. (2013). Impacts of dormancy-regulating chemicals on innate and salinity-induced dormancy of four forage grasses native to Arabian deserts. *Grass Forage Sci.*, 68(2): 288-296.
- El-Keblawy A.; Ksiksi T.; El Alqamy H. (2009). Camel grazing affects species diversity and community structure in the deserts of the UAE. *J. Arid Environ.*, 73(3): 347-354.
- Ellis R. (1977). Distribution of Kranz síndrome in the southern African Eragrostoideae and Panicoideae according to bundle sheath anatomy and cytology. *Agroplanta*, 9: 73-110.
- Engels J.; Visser L. (2003). A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks (No. 6). IPGRI, Rome.

- Engstrom B.; Marshfield V. (2004). *Sporobolus compositus* var. *compositus* (Tall Dropseed). Conservation and Research Plan for New England. New England Wild Flower Society, Framingham, Massachusetts.
- Exner E. (2012). Estudios agronómicos en “moha perenne” - *Setaria lachnea* (Nees) Kunth-. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.
- Exner E.; Zabala J.M.; Pereyra M.; Pensiero J.F. (2007). Comportamiento germinativo en genotipos de *Setaria lachnea* (Nees) Kunth. XXXI Jornadas Argentinas de Botánica, sept. 2007, Corrientes. 129 pp.
- Exner E.; Zabala J.M.; Pensiero J.F. (2010). Variación en la fenología de la floración y en el éxito reproductivo en *Setaria lachnea*. *Agrociencia*, 44(7): 779-789.
- Febles G.; Padilla C.; Achan G. (2010). Estudios acerca de la reproducción agámica en *Sporobolus indicus*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 44(2): 185-187.
- Fenner M.; Thompson K. (2005). *The ecology of seeds*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ferrari L. (2008). Bases fisiológicas de la germinación y dormición en *Sporobolus indicus* (L.) R. Br. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Finch-Savage W.E.; Leubner-Metzger G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.*, 171: 501-523.
- Fisher R.A. (1941). Average excess and average effect of an allelic substitution. *Ann. Eugen.* 11: 53-63.
- Fornasero L.V.; Del Papa M.F.; López J.L.; Albicoro F.J.; Zabala J.M; Toniutti M.A.; Pensiero J.F.; Lagares A. (2014). Phenotypic, molecular and symbiotic

- characterization of the rhizobial symbionts of *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart, that grow in the province of Santa Fe, Argentina. PLoS ONE, 9(8): 104-636.
- Frankel R.; Galun E. (2012). Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding (Vol. 2). Springer Science & Business Media, New York.
- Fryxell P.A. (1957). Mode of reproduction of higher plants. Bot. Rev., 3: 135–233.
- Giraldo-Cañas D. (2009) Revisión de las especies del género *Sporobolus* (Poaceae: Chloridoideae: Sporobolinae) del noroeste de sudamérica: Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela). Caldasia, 31(1): 41-76.
- Glémin S.; Bazin E.; Charlesworth D. (2006). Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. P. Roy. Soc. Lond. B Bio., 273(1604): 3011-3019.
- Glison N.; Viega L.; Cornaglia P.; Gutierrez L.; Speranza P. (2014). Variability in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds is genotype dependent. Grass Forage Sci., 70: 144-153.
- Godt M.J.W.; Hamrick J.L. (1998). Population Biology of grasses. Allozyme diversity in the grasses. (Cheplick G.P.). Cambridge University Press, Cambridge.11-29.
- Goodwillie C.; Kalisz S.; Eckert C.G.; (2005). The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. An. Rev. Ecol. Evol. Syst., 36: 47-79.
- Greco S.A., Cavagnaro J.B. (2005). Growth characteristics associated with biomass production in three varieties of *Trichloris crinita* (Poaceae), a forage grass native to the arid regions of Argentina. Rangeland J., 27(2): 135-142.

- Gutiérrez H.F.; Medan D.; Pensiero J.F. (2006a). Limiting factors of reproductive success in *Bromus auleticus* (Poaceae). 1. Flowering phenology, sexual expression, and pollen production, *New Zeal. J. Bot.*, 44(1): 47-55.
- Gutiérrez H.F.; Medan D.; Pensiero J.F. (2006b). Limiting factors of reproductive success in *Bromus auleticus* (Poaceae). 2. Fruit set under different pollination regimes, pollen viability, and incompatibility reactions. *New Zeal. J. Bot.*, 44(1): 57-63.
- Gutiérrez H.F. (2003) "Factores limitantes del éxito reproductivo pre-emergente de la cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trin. ex Nees). Tesis de Magíster, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Gutiérrez H.F.; Pensiero J.F.; Zabala J.M. (2015). Effect of population combinations on the reproductive success and germination of seeds of *Bromus auleticus* (Poaceae). *Grass Forage Sci.*, 70: 176-184.
- Guzmán D. (2005). Funciones masculina y femenina de la reproducción en cinco especies de *Thalictrum* (Ranunculaceae) con diferentes vectores de polinización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España.
- Hilhorst H.W. (1998). The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisite. *Seed Sci. Res.*, 8(2): 77-90.
- Holsinger K.E. (1996). Evolutionary biology. Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. (Hecht M. K.; Steere W. C.; Wallace B.) Plenum Press, New York. 49: 49-107.
- Hong T.D.; Ellis R.H. (1996). A protocol to determine seed storage behaviour (Nº 1). Bioversity International, Rome.
- Igic B.; Kohn J.R. (2006). The distribution of plant mating systems: study bias against obligately outcrossing species. *Evolution*, 60: 1098-1103.

- Igic B.; Lande R.; Kohn J.R. (2008). Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *Int. J. Pl Sci.*, 169(1): 93-104.
- Inouye K.; Maki M.; Masuda M. (1996). Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants. Evolution of *Campanula* flowers in relation to insect pollinators on islands. (Lloyd D.G.; Barrett S.C.H.). Chapman and Hall, New York, 377-301.
- Jain S.K. (1975). Crop Genetic Resources For Today And Tomorrow (Vol 2). Population structure and the effects of breeding system. (Frankel O.H.; Hawkes J.G.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Jain S.K. (1976). The evolution of inbreeding in plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 7:469-495.
- Johansen D.A. (1940). Plant microtechnique. Plant microtechnique.
- Johri B.M.; Ambegaokar K.B.; Srivastava P. (1992). Comparative embryology of angiosperms. Springer - Verlag, New York.
- Joshi A.J.; Mali B.S.; Hinglajia H. (2005). Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. *Environ. Exp. Bot.*, 54: 267-274.
- Kalisz S.; Randle A.; Chaiffetz D.; Faigeles M.; Butera A.; Beight C. (2012). Dichogamy, outcrossing rates and selfing syndrome in mixed-mating *Collinsia*. *Ann. Bot. (Oxford)* 109: 571-582.
- Khan M.A., Gulzar S. (2003). Light, salinity and temperature effects on the seed germination of perennial grasses. *Am. J. Bot.*, 90(1): 131-134.
- Khan M.A.; Gul B. (2008). Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants. Halophyte seed germination. (Khan M.A.; Weber D.J.). Springer, Netherlands, 11-30.

- Khan M.A.; Ungar I.A. (2001). Effect of germination promoting compounds on the release of primary and salt-enforced seed dormancy in the halophyte *Sporobolus arabicus* Boiss. *Seed Sci. Technology*, 29: 299-306.
- Knight S.E.; Waller D.M. (1987). Genetic consequences of outcrossing in the cleistogamous annual *Impatiens capensis*. I Population genetic structure. *Evolution*, 41: 969-978.
- Lacey E.P.; Roach D.A.; Herr D.; Kincaid S.; Perrott R. (2003). Multigenerational effects of flowering and fruiting phenology in *Plantago lanceolata*. *Ecology*, 84: 2462-2475.
- Li B.; Foley M.E. (1997). Genetic and molecular control of seed dormancy. *Trends Plant. Sci.*, 2: 384-389.
- Lipshitz N.; Waisel Y. (1974). Existence of salt glands in various genera of the gramineae. *New Phytol.*, 73:v507-513.
- Lloyd D.G. (1965) Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contrib. Gray Herb. Harvard Univ.* 195: 3-134.
- Lloyd D.G. (1984) Variation strategies of plants in heterogeneous environments. *Biol. J, Linn. Soc.*, 21: 357-385.
- Lloyd D.G. (1987). Allocations to pollen, seeds and pollination mechanisms in self-fertilizing plants. *Functional Ecology*, 83-89.
- Lloyd D.G. (1992). Self-and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *Int. J. Pl Sci.*, 153 (3): 370-380.
- Lloyd D.G.; Schoen D.J. (1992). Self and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *Int. J. Pl. Sci.*, 153 (3): 358–369.
- Lodge G.M. (1981). Establishment of warm- and cool-season native perennial grasses on the north-west slopes of New South Wales. II. Establishment and seedling survival in the field. *Austr. J. Bot.*, 29: 121-133.

- Lord E.M. (1981) Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *Bot. Rev.*, 47: 421-49.
- Loveless M.D.; Hamrick J.L. (1984). Ecological Determinants Of Genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 15: 65- 95.
- Maguire J.D. (1962). Speed of germination - Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2: 176-177.
- Manz B.; Müller K.; Kucera B.; Volke F.; Leubner-Metzger G. (2005). Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol.*, 138: 1538-1551.
- Marinoni L.; Bortoluzzi A.; Parra-Quijano M.; Zabala J.M.; Pensiero J.F. (2015). Evaluation and improvement of the ecogeographical representativeness of a collection of the genus *Trichloris* in Argentina. *Genet. Resour. Crop Ev.*, 62(4): 593-604.
- Marinoni L.; Zabala J.M.; Exner E.; Pensiero J.F. (2013) Comportamiento germinativo y potencial forrajero de *Setaria magna* (Poaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 48 (2). http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722013000200007
- Martin A.C. (1946). The comparative internal morphology of seeds. *Am. Midl. Nat.*, 513-660.
- Masuda M.; Yahara T.; Maki M. (2001). An ESS model for the mixed production of cleistogamous and chasmogamous flowers in a facultative cleistogamous plant. *Evol. Ecol. Res.*, 3: 429-439.
- Mc Gregor R.L. (1990). Seed Dormancy and Germination in the annual cleistogamous Species of *Sporobolus* (Poaceae). *Trans. Kansas Acad. Sci.*, 93(1-2): 8-11.

- Mcferson J.R. (1998). From in situ to ex situ and back: the importance of characterizing germplasm collections. *HortScience*, 33: 1134-1135.
- Méndez D.G.; Frigerio K.; Costa M.; Mattera J.; Romero N.; Fontana L.; Romero L.; Barbera P.; Miñón D.; Ré A.; Moreyra F.; Otondo J.; Cicchino M.; Bailleres M.; Melani E.; Esquiaga J.; Amigone M.; Lavandera J.; Gallego G.A.J.J. (2013). *Avances en Raigrass - Red de Evaluacion de Cultivares de Raigras*. INTA, Buenos Aires.
- Mnif L.; Derbel S.; Chaieb M. (2005). Las Poáceas perennes: una alternativa para la rehabilitación y la restauración de pastos degradados en el Túnez presahariano. *Ecosistemas*, 14(3): 57-66.
- Monti M.E.; Delgado G.J. (2013). *Manejo de Pastos y Forrajes Tropicales - Cuadernos Científicos. Uso de pasturas megatérmicas en sistemas pastoriles*. (Girarz Perozzo Bravo A.) Fundación Girarz. Ediciones Astro Data S.A., Maracaibo. 263-271.
- Morris E.C.; Tieu A.; Dixon K. (2000). Seed coat dormancy in two species of *Grevillea* (Proteaceae). *Ann. Bot.*, 86(4): 771-775.
- Muir J.P.; Pitman W.D.; Foster J.L. (2011). Sustainable, low-input, warm-season, grass-legume grassland mixtures: mission (nearly) impossible?. *Grass Forage Sci.*, 66: 301-315.
- Namkoong, G. (1986). Genetics and the forests of the future. *Unasyuva*, 38(152): 2-18.
- Nicora E.; Rúgolo De Agrasar Z. (1987). *Los géneros de gramíneas de América austral*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Nikolaeva M.G. (1969). *Physiology of deep dormancy in seeds*. Jerusalem, Israel: Program for Scientific Translations.
- Ornduff R. (1969). Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon*, 121-133.

- Parodi L.R. (1928). Revisión de las especies argentinas del género *Sporobolus*. Rev. Fac. Agr. y Vet., 6(2): 115-168.
- Pensiero J.F. (1995). Sinopsis morfológica y taxonómica de las especies sudamericanas del género *Setaria* (Poaceae, Paniceae). Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Pensiero J.F.; Gutiérrez H.F., Exner E.L.; Zabala J.M. (2011). Variación en caracteres de interés agronómico en poblaciones de *Setaria lachnea* (Ness) Kunth. Agrociencia, 45: 699-709.
- Pensiero J.F.; Marino G.D.; Schrauf G.E. (1995). Características reproductivas de *Setaria lachnea* (Nees) Kunth (Poaceae, Paniceae). Revista Fac. Agron. Veterin., 15: 59-66.
- Pensiero, J.F.; Gutiérrez H.F.; Exner E. (2005). Sistema de polinización y su efecto sobre la producción y el peso de semillas en nueve especies sudamericanas del género *Setaria*. Interciencia, 30: 495-500.
- Persad N.K. (1980). *Sporobolus* – A serious weed in improved tropical and sub-tropical pastures. Trop. Sci. 26: 430-433.
- Peterson P.M.; Columbus T.; Pennington S. (2007). Classification and biogeography of New World grasses: Chloridoideae. Aliso, 23(1): 580-594.
- Peterson P.M.; Hatch S.; Weakley A. (2003). Flora of North America Editorial Committee, Flora of North America. *Sporobolus* R. Br. (Barkworth M.; Capels K.; Long S.; Piep M.). Oxford University Press, New York. 115–139.
- Peterson P.M.; Romaschenko K.; Herrera Arrieta Y.; Saarela J.M. (2014). A molecular phylogeny and new subgeneric classification of *Sporobolus* (Poaceae: Chloridoideae: Sporobolinae). Taxon, 63: 1212-1243.
- Peterson P.M.; Saarela J.M.; Romaschenko K. (2015). New combinations in *Sporobolus* (Poaceae: Chloridoideae). Phytoneuron, 20: 1-2.

- Peterson P.M.; Soreng R.; Davidse G.; Filgueiras T.; Zuloaga F.; Judziewicz E. (2001). Catalogue of New World grasses (Poaceae): II. Subfamily Chloridoideae. *Contr. U. S. Natl. Herb.*, 41: 1-255.
- Plitmann U. (1995). Distributions of dimorphic flowers as related to other elements of the reproductive strategy. *Plant Species Biol.*, 10: 53-80.
- Plucknett D.L.; Williams J.T.; Smith N.J.R.; Murty N.A. (1992). Los bancos genéticos y la alimentación mundial [Gen Banks and the World' Food]. IICA, CIAT, San José de Costa Rica.
- PROCISUR, (2010). Estrategia en los recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. IICA Montevideo. http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-estrategia_enrrgprocisur.pdf
- Quiroga A.; Correa R.J. (2011). Gramíneas forrajeras presentes en el Chaco Árido de Catamarca. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial Revista*, 16. <http://www.agrariasvirtual.com.ar/fca/sivitec/revistas-redita/redita-revista16.pdf>
- Quiroga E, Blanco L, Oriente E (2009) Evaluación de estrategias de rehabilitación de pastizales áridos. *Ecol. Aust.*, 19: 107-117.
- Raimundez U.E.; Ramirez N. (1998). Estrategia reproductiva de una hierba perenne: *Hypoxis decumbens* (Hypoxidaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 46(3): 555-565.
- Rao A.N.; Johnson D.E.; Sivaprasad B.; Ladha J.K.; Mortimer A.M. (2007). Weed management in direct seeded rice. *Adv. Agron.*, 93: 153-255.
- Rao V.R., Hodgkin T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 68: 1-19.
- Redbo-Torstensson P.; Berg H. (1995). Seasonal cleistogamy: a conditional strategy to provide reproductive assurance. *Acta Bot. Neerl.*, 44: 247-256.

- Richards A. (1986). Plant Breeding Systems. George Allen and Unwin Publisher, London.
- Riggins R. (1977). A biosystematic study of the *Sporobolus asper* Complex (Gramineae). Iowa State J. Res., 51(3): 287-321
- Rivas M. (2001). Los recursos fitogenéticos del género Bromus en el Cono Sur. Modo de reproducción y estructura genética de poblaciones de Bromus auleticus Trinius ex Nees (Poaceae): I. Biología reproductiva y variación fenotípica. IICA PROCISUR Diálogo, Montevideo. 45-49.
- Rogers M.E.; Craig A.D.; Munns R.; Colmer T.D.; Nichols P.G.H.; Malcolm C.V.; Barrett-Lennard E.G.; Brown A.J.; Semple W.S.; Evans P.M.; Cowley K.; Hughes S.J.; Snowball R.; Bennett S.J.; Sweeney G.C.; Dear B.S.; Ewing M.A. (2005). The potential for developing fodder plants for the salt-affected areas of southern and eastern Australia: an overview. Aust. J. Exp. Agr., 45(4): 301-329.
- Rosengurtt B. (1984). Gramíneas cleistógamas del Uruguay. Bol. Fac. Agron. Univ. Rep. Montevideo, 134: 1-28.
- Rosengurtt B.; Arrillaga de Maffei B.R. (1961). Flores cleistógamas en gramíneas uruguayas. Bol. Fac. Agron. Univ. Rep. Montevideo, 57: 1-12.
- Ruzin S.E. (1999). Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press, New York.
- Satyamurty T.V.C. (1983). Structure and development of the caryopsis in *Sporobolus coromandelianus*. Curr. Sci., 52(11): 549-550.
- Schoen D.J. (1984). Cleistogamy in *Microlaena polynoda* (Gramineae): an examination of some model predictions. Am. J. Bot., 71: 711-719.
- Schoen D.J.; Busch J.W. (2008). On the evolution of self-fertilization in a metapopulation. Int. J. Pl. Sci., 169(1): 119-127.

- Schoen D.J.; Lloyd D.G. (1984). The selection of cleistogamy and heteromorphic diaspores. *Biol. Linn. Soc.*, 23:,303-22.
- Schoen D.J.; Lloyd D.G. (1992). Self-and cross-fertilization in plants. III. Methods for studying modes and functional aspects of self-fertilization. *Int. J. Pl. Sci.*, 153(3): 381-393.
- Schoen D.J.; Morgan M.T.; Bataillon T. (1996). How does self-pollination evolve? Inferences from floral ecology and molecular genetic variation. *Philos. Trans. R. Soc., Ser. B*, 351: 1281-1290.
- Schrauf G.E.; Martino A.; Giavedoni J.; Pensiero J.F. (1998). Efectos genéticos y ambientales sobre el comportamiento germinativo de poblaciones de *Moha perenne*. *Ecología Austral*, 8: 49-56.
- Sharif-Zadeh F.; Murdoch A.J. (2001). The effects of temperature and moisture on after-ripening of *Cenchrus ciliaris* seeds. *J. Arid. Environ.*, 49(4): 823-831.
- Sicard A.; Lenhard M. (2011). The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *Ann. Bot.*, 107(9): 1433-1443.
- Simon B.; Jacobs S. (1999). Revision of the genus *Sporobolus* (Poaceae, Chloridoideae) in Australia. *Australian Syst. Bot.*, 12: 375-448.
- Simon, B.K. (2014) GrassWorld. An online information system of the world's grasses derived from a DELTA dataset. Accessed 2 Feb 2015. <http://grassworld.myspecies.info/en>
- Simpson G.M. (2007). Seed dormancy in grasses. Second Edition. Cambridge University Press.
- Smith-White A.R. (1988). *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth in Coastal Australia: The reproductive behaviour and the distribution of morphological types and chromosome races. *Austr. J. Bot.*, 36: 23-39.

- Solbrig O.T. (1976). On the relative advantages of cross- and self-fertilization. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 63: 262-276.
- Steibel P.; Rúgolo de Agrasar Z.; Troiani H.; Martínez O. (1997). Sinopsis de las gramíneas (Gramineae Juss.) de la Provincia de La Pampa, República Argentina. *Revista Fac. Agron. Univ. Nac. La Pampa*, 9: 1-122.
- Stinson K.A. (2004). Natural selection favors rapid reproductive phenology in *Potentilla pukherrima* (Rosaceae) at opposite ends of a subalpine snowmelt gradient. *Am. J. Bot.*, 91: 531-539.
- Sutherland S.; Delph L.F. (1984). On the importance of male fitness in plants: Patterns of fruitset. *Ecology*, 65: 1093-1104.
- Tel-Zur N.; Schneider B. (2009). Floral biology of *Ziziphus mauritiana* (Rhamnaceae). *Sex. Plant. Reprod.*, 22: 73-85.
- Thompson J.N. (1997). Evaluating the dynamics of coevolution among geographically structured populations. *Ecology*, 78: 1619-1623.
- Tomas P.A.; Gottlieb A.M.; Schrauf G.E.; Poggio L. (2013). Utilización de marcadores morfológicos y moleculares AFLP en la identificación de germo plasma nativo y cultivado de *Elymus scabrifolius* (Poaceae). *Rev. Fac. Cienc. Agrar., Univ. Nac. Cuyo*, 45(2).
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652013000200007
- Tomas R.A.; Giavedoni J.A.; Zabala J.M.; Schrauf G.E. (2012). Variación Morfo-Agronómica en Accesiones de *Elymus Scabrifolius* del Centro-Norte de Santa Fe. *FAVE Secc. Cienc. Agrar.*, 11(1).
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1666-77192012000100004&script=sci_arttext
- Toniutti M.A.; Fornasero L.V. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria Lachnea* (Nees) Kunth. *F AVE Secc. Cienc. Agrar.*, 7(1-2).

<http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FAVEAgrarias/article/viewFile/1326/2094>

- Toole V.K. (1941). Factors affecting the germination of various Dropseed grasses (*Sporobolus* spp.). Aust. J. Agric. Res., 62: 691-715.
- Travis J. (1996). The significance of geographical variation in species interaction. Am. Nat., 148: 1-8.
- Tyler B.F.; Hayes J.D.; Davies W.E. (1985). Descriptor List for forage grasses. IPGRI, Rome.
- Veasey E.A.; Karasawa M.G.; Santos P.P.; Rosa M.S.; Mamani E.; Ollveira G.C. (2004). Variation in the loss of seed dormancy during after-ripening of wild and cultivated rice species. Ann. Bot., 94: 875-882.
- Vogler W.D.; Bahnisch L.M. (2006). Effect of growing site, moisture stress and seed size on viability and dormancy of *Sporobolus pyramidalis* (giant rats tail grass) seed. Anim. Prod. Sci., 46(11): 1473-1479.
- Weaver J.E. (1954). North American prairie. Johnsen Publishing Company, Lincoln, Nebraska.
- Wood J.N.; Gaff D.F. (1989). Salinity studies with drought-resistant species of *Sporobolus*. Oecologia, 78: 559-56.
- Wright J.W.; Meagher T. (2003). Pollination and seed predation drive flowering phenology in *Silene latifolia* (Caryophyllaceae). Ecology, 84: 2062-2073.
- Zabala J.M.; Giavedoni J.; Tomas P.A.; Budini E.A. (2010). Variabilidad en caracteres morfológicos relacionados con la implantación de *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. y *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart. Agriscientia 27 (2): 97-105

- Zabala J.M.; J.F. Pensiero; P.A. Tomas; Giavedoni J.A. (2008). Morphological characterisation of populations of *Desmanthus virgatus* complex from Argentina. *Tropical Grassland*, 42: 229-236.
- Zabala J.M.; Taleisnik E.; Giavedoni J.A.; Pensiero J.F.; Schrauf G.E. (2011), Variability in salt tolerance of native populations of *Elymus scabrifolius* (Döll) J. H. Hunz from Argentina. *Grass Forage Sci.*, 66: 109-122.
- Zabala J.M.; Tomas P.A.; Schrauf G.E.; Giavedoni J. A. (2009). Variation in seed germination between *Elymus scabrifolius* (Döll) JH Hunz. lines from different habitats. *Seed Sci. Technol.*, 37(1): 245-250.
- Zabala J.M.; Widenhorn P.; Pensiero J.F (2011) Germination patterns of species of the genus *Trichloris* in arid and semiarid environments. *Seed. Sci. Technol.*, 39 (2): 338-353.
- Zarlavsky G.E. (2014). *Histología vegetal: técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.
- Zuloaga F.; Morrone O.; Rodríguez D. (1999). Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana*, 27(1): 17-167.

ANEXO

1. Producción científica derivada de esta Tesis

1.1 Publicaciones

Richard G.A.; Pensiero J.F.; Cerino M.C.; Galati B.G.; Gutiérrez H.F. (2015). Reproductive biology of *Sporobolus phleoides* Hack. (Poaceae), an endemic halophyte grass of Argentina. *Plant Systematics and Evolution*, 301(7): 1937-1945.

Richard G.A.; Cerino M.C.; Pensiero J.F.; Zabala J.M. Seed dormancy and germination in *Sporobolus phleoides* (Poaceae: Chloridoideae), a potential resource for saline soils. *Australian Journal of Botany*. Aprobado para su publicación con correcciones el 12 de septiembre de 2015.

1.2 Congresos

Richard, G.; Zabala, J.; Gutiérrez, H.; Pensiero, J. (2012) Efecto de la cubierta seminal sobre la germinación de semillas de *Sporobolus phleoides* con distintos periodos de postcosecha. Jornadas Latinoamericanas de Recursos Genéticos, Mejoramiento y Biotecnología de Especies Forrajeras. Pergamino, Buenos Aires. 7 y 8 de Agosto de 2012.

Richard G.A.; Borgeaud C.; Castañeda J. (2013). Sistema reproductivo de *Sporobolus phleoides* Hack. XXXIV Jornadas de la Sociedad Argentina de Botánica. La Plata, Buenos Aires. 2 al 6 de Septiembre de 2013.

Richard G.A.; Castañeda J.; Borgeaud C.; Rosso R. (2013). Efecto de la estratificación húmeda y nitratos en la germinación de semillas de *Sporobolus phleoides* Hack. XXXIV Jornadas de la Sociedad Argentina de Botánica. La Plata, Buenos Aires. 2 al 6 de Septiembre de 2013.

Rosso R.A. (2014). Efecto De La Temperatura, Iluminación Y Pre-Tratamientos En La Germinación De *Sporobolus Phleoides* Hack. Encuentro de Jóvenes

Investigadores. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. 3 y 4 de Septiembre de 2014.

1.3 Tesinas de grado

Castañeda J. (2014). Efecto de distintos factores sobre la germinación de *Sporobolus phleoides* Hack. (Poaceae): especie halófila endémica de Argentina. Tesina de grado de Licenciatura en Biodiversidad. Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. Directora: Lic. Richard G.A.; Codirectora Dra. Cerino M.C.

Borgeaud C. (2015). Sistema reproductivo de *Sporobolus phleoides* Hack.: una gramínea halófila endémica de Argentina. Tesina de grado de Licenciatura en Biodiversidad. Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral. Directora: Dra. Cerino M.C.; Codirectora: Lic. Richard G.A.