

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

*Tesis para acceder al grado académico de Doctora en Ciencias Agrarias*

**EFFECTO DE LA ONTOGENIA DEL CULTIVO SOBRE LA COMPOSICIÓN  
DE LA PARED CELULAR Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE  
LA LIGNINA Y LA CALIDAD FORRAJERA EN MATERIALES DE  
*MEGATHYRSUS MAXIMUS JACQ***

**Ing. Agr. Urys Mileth Hernández Álvarez**

Director: Dra. Eliana López Colomba

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA),

Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales. Unidad de Estudios  
Agropecuarios (INTA-CONICET)

Co-Director: Dra. Andrea Reutemann

Instituto De Botánica Darwinion (IBODA-CONICET)

Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNL)

***Córdoba, 2024***



*Todas las cosas tienen su tiempo, y todo lo que hay debajo del cielo pasa en el término que se le ha prescrito. Y así que he conocido que lo mejor de todo es estar alegre, y hacer buenas obras mientras vivimos. Entiendo, pues, que no hay cosa mejor para el hombre que atender con alegría a sus ocupaciones, y que ésta es su suerte mientras vive. Porque ¿quién podrá ponerlo en estado de conocer lo que ha de acontecer después de sus días?*

*Eclesiastés 3:1;12;22*

*A Dios primeramente por guiarme y darme las fuerzas en esta etapa.*

*A mi familia, Jhan Carlos Burgos Gómez, Eliab David y Emily Sofía por ser pilares en mi vida y por todo el amor que me brindan día a día.*

*A mis padres Miladys y Edilberto y cada uno de mis hermanos y hermanas, porque siempre están para mí.*

*A mi directora Dra. Eliana López Colomba, por su paciencia, sus enseñanzas, acompañamiento y entrega con pasión en todo este camino.*

*A mi Co-Directora Dra Andrea Reutemann por disponer de sus conocimientos y brindarme su ayuda cuando lo necesité.*

*A la Dra. Karina Grunberg, porque desde el primer momento siempre estuvo para apoyarme y guiarme en este proceso, dándome herramientas valiosas para lograr esta meta.*

*A mis compañeros de trabajo Andrea Ribotta, Sabrina Griffa, Exequiel Tommasino, Mariana Quiroga, Edgardo Carloni, Magalí Carrizo, Miguel Sánchez, Mercedes Nisi, Jorge Monjes, Carlos torres y Sergio López de quienes aprendo y quienes me apoyaron en las jornadas de trabajo siendo un gran equipo.*

*A mis compañeros del “INTA- CIAP” de quienes puedo ver que trabajan genuinamente y con mucho amor por la ciencia.*

*A Graciela Bollati, por compartirme con paciencia y dedicación sus conocimientos.*

*Al Dr. Arnold Álvarez Teran, a la Dra. Nora Jimenez y al Dr. Juan Jaraba Navas por inspirarme a emprender este camino.*

*A mi comunidad de fe por sostenerme en los momentos más difíciles y necesarios, por siempre estar para mí de forma incondicional.*

*Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y al Consejo nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por su respaldo económico, espacio físico y equipamientos que han hecho posible el desarrollo de este trabajo.*

*A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (FCA-UNL).*

*A mi comisión asesora de Tesis.*

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCION GENERAL .....	1
Ganadería en Argentina .....	1
<i>Megathyrus maximus</i> .....	2
Marcadores Moleculares .....	4
Citometría de Flujo .....	5
Calidad Nutritiva en Forrajes .....	6
Lignificación de los tejidos con la ontogenia .....	7
Hipótesis .....	8
Objetivos generales .....	8
Objetivos específicos .....	8
BIBLIOGRAFÍA .....	9
CAPÍTULO 2 .....	21
EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE VARIABILIDAD GENÉTICA PRESENTE EN MATERIALES DE <i>MEGATHYRSUS MAXIMUS</i> MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES INTERMICROSATÉLITES .....	21
INTRODUCCIÓN .....	21
Hipótesis .....	22
Objetivo general .....	22
Objetivos específicos .....	22
MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
Ajuste de la técnica intermicrosatélites (ISSR) y caracterización molecular .....	23
Análisis estadístico .....	25
RESULTADOS .....	26
DISCUSIÓN .....	28
CONCLUSIÓN .....	29
BIBLIOGRAFÍA .....	29
CAPÍTULO 3 .....	35
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ADN PLOIDÍA EN MATERIALES DE <i>MEGATHYRSUS MAXIMUS</i> A TRAVÉS DE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	35
INTRODUCCIÓN .....	35
Hipótesis .....	36
Objetivo general .....	36
Objetivos específicos .....	36
MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
Análisis estadístico .....	38
RESULTADOS .....	38

DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIÓN .....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
CAPÍTULO 4 .....	46
EFECTO DE LA ONTOGENIA EN MATERIALES DE <i>MEGATHYRSUS MAXIMUS</i> SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD FORRAJERA Y DETERMINACIÓN DE CAMBIOS HISTOLÓGICOS DE LOS MATERIALES CONTRASTANTES.....	46
INTRODUCCIÓN.....	46
Hipótesis.....	48
Objetivo General .....	48
Objetivos específicos.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
Variables morfo-agronómicas .....	51
Parámetros de calidad forrajera.....	52
Técnica de infrarrojo cercano (NIRS) .....	52
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (ivDMS) y de la fibra detergente neutra (dFDN) .....	53
Técnica de cortes histológicos.....	54
Análisis estadístico .....	55
RESULTADOS .....	56
Variables morfo-agronómicas .....	56
Variables de calidad forrajera.....	59
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (ivDMS) y de la fibra detergente neutra (dFDN) .....	63
Variables anatómicas.....	65
DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSIÓN .....	72
BIBLIOGRAFIA.....	72
CAPÍTULO 5 .....	80
EVALUACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS CLAVES QUE PARTICIPAN EN LA BIOSÍNTESIS DE LA LIGNINA EN LÁMINAS Y TALLOS DE MATERIALES DE <i>MEGATHYRSUS MAXIMUS</i> CONTRASTANTES EN LA DIGESTIBILIDAD DE LA FDN DE LOS TALLOS .....	80
INTRODUCCIÓN.....	80
Hipótesis.....	82
Objetivo general .....	82
Objetivos específicos.....	82
MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina ....	82

Extracción de ARN y PCR en tiempo real (qPCR).....	83
Análisis estadístico .....	84
RESULTADOS .....	84
DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIÓN .....	89
BIBLIOGRAFIA.....	89
CAPÍTULO 6 .....	97
ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES MORFO-AGRONOMICAS, ANATÓMICAS, DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE CALIDAD FORRAJERA.....	97
INTRODUCCIÓN.....	97
Hipótesis.....	98
Objetivo General .....	98
Objetivos específicos.....	99
MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
Variables morfo-agronómicas .....	99
Variables de calidad forrajera.....	99
Variables anatómicas.....	99
Variables moleculares .....	99
Análisis estadístico .....	99
RESULTADOS .....	100
DISCUSIÓN.....	102
CONCLUSIÓN .....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	104
DISCUSIONES GENERALES.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	113

## ABREVIATURAS

<b>ACP</b>	Análisis de componentes principales
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AL</b>	Ancho de lámina
<b>ANAVA</b>	Análisis de la Variancia
<b>AP</b>	Altura total de planta
<b>ATL</b>	Área total de lámina
<b>BM</b>	Bandas monomórficas
<b>BP</b>	Bandas polimórficas
<b>BT</b>	Bandas totales
<b>C</b>	Clorénquima
<b>CB</b>	Células buliformes
<b>CCoAOMT</b>	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
<b>CCR</b>	Cinamoil-CoA reductasa
<b>CEN</b>	Cenizas
<b>CIAP</b>	Centro de investigaciones agropecuarias
<b>cm</b>	centímetros
<b>CMF</b>	Citometría de flujo
<b>COMT</b>	Ácido cafeico-O-metiltransferasa
<b>cv</b>	Cultivar



<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>DAMS</b>	Digestibilidad aparente de la materia seca
<b>DDT</b>	Días después del trasplante
<b>dFDN</b>	Digestibilidad de la fibra detergente neutra
<b>DMS</b>	Desaparición <i>in situ</i> de la materia seca
<b>EE</b>	Error estándar
<b>Ep.Ad</b>	Epidermis adaxial
<b>Ep.Ab</b>	Epidermis abaxial
<b>Es</b>	Esclerénquima
<b>FDA</b>	Fibra detergente ácida secuencial
<b>FDN</b>	Fibra detergente neutra con amilasa
<b>GA</b>	Gatton Panic
<b>GR</b>	Green Panic
<b>G0, G1, S, G2 y M</b>	Fases del ciclo celular (G0: Fase de reposo, G1: Fase vacía o gap 1, S: Fase de síntesis, G2: Fase vacía o gap 2 y M: Fase mitótica)
<b>H, G y S</b>	Hidroxifenilo lignina, guayacil lignina y siringil lignina
<b>HM</b>	Hojas por macollo principal
<b>IFRGV</b>	Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
<b>ivDMS</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
<b>ISSR</b>	Inter-Secuencias Simples Repetitivas
<b>LDA</b>	Lignina detergente ácida con ácido sulfúrico, libre de cenizas

<b>LL</b>	largo de lámina
<b>MU</b>	Mutale
<b>PAL</b>	Fenilalanina amoniaco liasa
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE</b>	Penquero
<b>PF</b>	Peso fresco
<b>pg</b>	Picogramos
<b>PI</b>	Parénquima incoloro
<b>PIC</b>	Contenido de información polimórfica
<b>PS</b>	Peso seco
<b>TV</b>	Tejido vascular
<b>UCC</b>	Universidad Católica de Córdoba
<b>VE</b>	Vencedor
<b>VK</b>	Vaina de Kranz
<b>4CL</b>	4-cumarato CoA ligasa
<b>UCC</b>	Universidad Católica de Córdoba
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

## RESUMEN

*Megathyrus maximus* es una pastura forrajera originaria de África, ampliamente cultivada en regiones tropicales y subtropicales del mundo y en Argentina se utiliza en sistemas ganaderos pastoriles. Este estudio tuvo como objetivos evaluar la existencia de variabilidad genética entre diferentes genotipos de *M. maximus* (Gatton Panic, Green Panic, Vencedor, Penquero y Mutale) a través de marcadores intermicrosatelites (ISSR) e inferir su nivel de ploidía, determinar el efecto de la madurez en características morfo-agronómicas, de composición química, histológicas y de expresión de genes asociados al metabolismo de la lignina, y correlacionar la anatomía de láminas y tallos con su valor nutritivo. Los ensayos se establecieron en dos sitios experimentales (Campus UCC e INTA Manfredi), en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Se realizaron tres cortes cada 35 días en forma mecánica. El análisis por ISSR confirmó que los cinco genotipos eran distantes genéticamente y por otra parte presentaron igual nivel de ploidía. A nivel de láminas, la proporción de esclerénquima aumentó a medida que se alcanzó la madurez, lo que no se correspondió con la acumulación de Lignina Detergente Ácida (LDA), que fue diferente entre genotipos y permaneció sin cambios con el avance de la madurez en Gatton Panic, Green Panic y Mutale. Hubo asociación positiva entre los genes de la biosíntesis de la lignina, *O-metiltransferasa del ácido cafeico*, *cinamoil CoA reductasa* y *cafeoil-CoA O-metiltransferasa*, que habían incrementado su expresión del primer al tercer corte, con las variables LDA y Fibra Detergente Neutra (FDN) en torno al genotipo Vencedor para el tercer corte. En tallos, hubo asociación positiva entre FDN y FDA con la expresión de genes de la biosíntesis de la lignina. El uso de marcadores ISSR logró identificar variabilidad genética y el estudio por citometría de flujo permitió inferir el nivel de ploidía de los cinco genotipos. La madurez tuvo efecto negativo en la calidad del forraje de láminas y tallos y mayormente en el genotipo Vencedor.

Palabras claves: *Megathyrus maximus*, ploidía, variabilidad, madurez, fibra, lignina, características nutricionales, calidad, forraje, expresión genica.

## ABSTRACT

*Megathyrsus maximus* is a forage grass native to Africa, widely cultivated in tropical and subtropical regions of the world and it is used in pastoral livestock systems in Argentina. The aim of this study was to evaluate the existence of genetic variability between different genotypes of *M. maximus* (Gatton Panic, Green Panic, Vencedor, Penquero and Mutale) through intermicrosatellite molecular markers (ISSR) and infer its level of ploidy, to determine the effect of plant maturity on morphoagronomic traits, chemical composition, histological characteristics and the expression of genes associated with lignin metabolism and to correlate the anatomy of leaf blades and stems with their nutritional value. The assays were carried out in two different experimental sites (Campus UCC and INTA Manfredi), in a randomized block design with three replications. The cuts were made three times every 35 days by cutting the plots mechanically. The ISSR analysis confirmed that the genotypes evaluated in this study were genetically distant and on the other hand presented the same level of ploidy. The leaf blades showed the proportion of sclerenchyma tissues increased as maturity was reached, which did not correspond to the accumulation of Acid Detergent Lignin (ADL), being it different between genotypes. This parameter remained unchanged in Gatton, Green Panic and Mutale. There was a positive correlation between the genes related to lignin biosynthesis, caffeic acid O-methyltransferase, cinnamoyl CoA reductase and caffeoyl-CoA O-methyltransferase, that had differentially increased their expression from the first to the third cut, with the variables ADL and Neutral Detergent Fiber (NDF) in Vencedor genotype for the third cutting. Regarding stems, there was a positive association between NDF and ADF with the expression of genes associated with lignin biosynthesis. The use of ISSR allowed identify genetic variability and the flow cytometry study allowed infer the level of ploidy of the five genotypes. The maturity had a negative effect on the forage nutritive value of blades and stems mainly in Vencedor genotype.

Keywords: *Megathyrsus maximus*, ploidy, variability, maturity, fiber, lignin, nutritional characteristics, quality, forage, gene expression.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCION GENERAL

### Ganadería en Argentina

La ganadería en Argentina actualmente cuenta con 53 millones de cabezas de ganado vacuno (Ministerio de Economía, 2021), las cuales se encuentran distribuidas en las cinco zonas agroecológicas del país (región pampeana, noreste, noroeste, semiárida central y patagónica); dichas regiones exhiben marcadas diferencias en clima, suelo y vegetación. En la última década, la importancia de la carne bovina en Argentina, puede explicarse por su elevada participación en la producción agropecuaria y el elevado consumo interno, siendo el país con mayor consumo per cápita de carne en el mundo según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2007). Sin embargo, en los últimos 30 años se han generado cambios en la producción de carne bovina en el país, los cuales son el resultado de la competencia del ganado con otros productos agrícolas; por la tierra, recursos naturales, severas restricciones climáticas, cambios en los sistemas de producción, lenta adopción de tecnología y la incapacidad de generar un conjunto de políticas útiles para sostener y mejorar la productividad, así como un sostenible desarrollo de la industria (Arelovich *et al.*, 2011). Todos estos cambios estructurales y geográficos que han surgido como consecuencia de la transformación del sector agropecuario conllevan a una reducción del número de cabezas del stock nacional.

La mayoría de la producción de carne bovina se encuentra en la región Pampeana (64% del inventario total de ganado), que es también la zona más relevante para la producción de cereales y oleaginosas. A lo largo de los siglos XX y XXI, el uso inadecuado de la tierra como por ejemplo prácticas de cultivo inadecuadas, deforestación y sobrepastoreo, así como las sequías contribuyeron a la erosión y al deterioro de los recursos naturales, particularmente en las áreas semiáridas más lábiles de estas zonas (Arelovich *et al.*, 2011).

La región del Noroeste Argentino que abarca las provincias geográficas de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del estero, Catamarca y la Rioja es también una región abocada a la producción de carne bovina. En los últimos años y fundamentalmente a partir del avance de la frontera agrícola se ha registrado en la zona un proceso de concentración productiva de cría y recría de ganado bovino, la cual se desarrolla principalmente sobre pasturas naturales y en menor proporción sobre pasturas implantadas, siendo la limitante más importante la baja productividad de los pastizales y la consecuente reducción en la carga animal debido a las limitaciones edafo-climáticas de la región. Por lo antes expuesto se enfrenta el desafío de producir y utilizar pastos sembrados y nativos de forma sostenible. A pesar de ello, el forraje pastoreado seguirá siendo un componente clave de la dieta del ganado (Rearte, 2011). Bajo este contexto, *Megathyrus maximus* es una de las principales especies forrajeras cultivadas en esta zona (Brizuela & Cangiano, 2011) la cual es una gramínea promisoría por su valor nutritivo y por mostrar diversidad entre cultivares en cuanto a rendimiento, calidad forrajera y respuesta a la fertilización con nutrientes (Benabderrahim & Elfalleh, 2021).

### ***Megathyrus maximus***

*Megathyrus maximus* (Jacq.) B. K. Simon & S. W. L. Jacobs (syn. *Panicum maximum* Jacq.) es una pastura forrajera nativa de África que ha sido introducida y ampliamente cultivada en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta especie pertenece a la familia Poaceae (gramíneas), subfamilia Panicoideae, tribu Paniceae (Muir & Jank, 2004). Se reproduce por apomixis facultativa, con ocurrencia de aposporia y pseudogamia, y un 2-3% de reproducción sexual, efectuada por autofecundación o fecundación cruzada (Bluma-Marques *et al.*, 2014; Jank *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2011b). Presenta como número cromosómico básico  $x = 8$  (Nakajima *et al.*, 1979), siendo la mayoría de los genotipos apomícticos autotetraploides ( $2n = 4x = 32$ ); sin embargo, las formas sexuales son diploides ( $2n = 2x = 16$ ) (Jank *et al.*, 2011; Nakajima *et al.*, 1979; Sousa *et al.*, 2011b). Asimismo, *Megathyrus maximus* forma un complejo agámico con las especies botánicas *Panicum infestum* Anders y *Panicum trichocladum* K. Schum (Muir & Jank, 2004). Las tres especies poseen el mismo número cromosómico y se inter cruzan libremente, por lo tanto, es posible encontrar materiales híbridos en poblaciones naturales del este de África (Savidan & Pernès, 1982).

*M. maximus* es una especie de ciclo primavera-estival, produce gran cantidad de forraje (8-14 t de materia seca/ha), de buen rebrote, alta palatabilidad y alto valor proteico (8 a 10% de proteína bruta en verde) (Kunst *et al.*, 2014; Pérez, 2005). Fue introducida en América y naturalizada en Brasil y el norte de Argentina (Parodi, 1987; Skerman *et al.*, 1991) y debido al cambio climático global, el uso de este tipo de gramíneas C4 se ha ampliado notablemente (Giordano *et al.*, 2014). Además, es creciente el interés como materia prima para la producción de biocombustibles lignocelulósicos por su enorme potencial para producir materia seca (Byrt *et al.*, 2011; Hatfield *et al.*, 2009). No obstante, presenta rápida elongación de tallos y disminución de la calidad del forraje con el avance de la madurez (Stabile *et al.*, 2011).

En nuestro país, principalmente en regiones del noroeste y noreste forma parte de la cadena alimentaria de pastoreo tendiente a incrementar la productividad y rentabilidad de sistemas ganaderos de cría y recria. En este contexto, la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UCC y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) han comenzado a desarrollar investigaciones sobre las características forrajeras y la adaptabilidad de diversos materiales introducidos para determinar potencialidades de uso productivo. De esta manera, en el año 2016 se propagaron agamicamente cinco genotipos pertenecientes al Jardín de Introducción, sito en el campo experimental de dicha Facultad. Los genotipos fueron: Gatton Panic, Green Panic, Mutale, Vencedor y Penquero. Aganga & Tshwenyane, (2004) describieron estos genotipos de la siguiente manera: 1) *Megathyrsus maximus* cv. Gatton; es un genotipo de altura media originalmente de Zimbabue (Humphreys & Patridge, 1995). Tiene hojas de color verde oscuro y nudos de tallo lisos. Se establece más rápidamente que Green panic y tiene buen rendimiento en la primera temporada, mostrando buen comportamiento para el manejo de pastoreo. 2) O'Reilly, (1975) describió el cv. Green Panic (*Megathyrsus maximus* var. *Trichoglume*) como nativo de África. También es una planta perenne alta, con macollos, que crece en verano. Green panic es más claro en apariencia y de porte más alto. 3) cv. Mutale es un genotipo local de Sudáfrica del norte de Transvaal. 4) cv. Vencedor fue mejorado para la tolerancia al frío en América del Sur. Por otra parte, en este trabajo se utilizó el material 5) Penquero que es un ecotipo obtenido a partir de una vieja población de Gatton Panic cultivada en el área del Noroeste de Argentina.

A nivel mundial se han descrito numerosos materiales genéticos (Muir & Jank, 2004), la mayoría de ellos, ecotipos selectos a partir de la amplia diversidad natural (Hacker & Jank, 1998). No obstante, en nuestro país son pocos los genotipos disponibles, siendo *gatton panic* el de mayor difusión (6,5 y 9 t/ha/año) (Peman *et al.*, 2003). Lo anteriormente expresado, revela la existencia de gran diversidad genética y citológica presente en la especie y manifiesta la importancia de su conocimiento para el desarrollo de estrategias de mejoramiento y la conservación de estas fuentes de germoplasma.

### **Marcadores Moleculares**

Históricamente, la caracterización del germoplasma se ha basado principalmente en características de alta y baja heredabilidad, medidas por el fenotipo. Sin embargo, las principales limitantes de esta caracterización son la influencia ambiental, el tiempo requerido para coleccionar los datos y el número de genes involucrados en este proceso. A partir de la década del 50, la electroforesis comenzó a ser utilizada en estudios de diversidad genética y actualmente, los avances en biología molecular han incorporado nuevos marcadores, de naturaleza molecular y de mayor sensibilidad para detectar cambios en el genotipo de los individuos, situación que ha permitido grandes avances en este tipo de estudios (Becerra & Paredes, 2000).

Existen diversas estrategias para poder evaluar variabilidad genética, entre ellas la utilización de marcadores moleculares, exitosamente implementados en numerosas especies vegetales (Agarwal *et al.*, 2008) tales como *Chrysanthemum morifolium* (Shao *et al.*, 2010), *Cynodon arcuatus* (Huang *et al.*, 2013), *Melilotus albus* (Tomas *et al.*, 2017) y *Chloris gayana* (Ribotta *et al.*, 2019); Los marcadores más usados son: *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) y *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Vos *et al.*, 1995). Estos son marcadores de tipo dominante y no requieren conocimiento previo de la secuencia del genoma. No obstante, se citan problemas de repetitividad para el primero y de tipo laborioso para el segundo (Agarwal *et al.*, 2008). Asimismo, en función de caracterizar la diversidad genética con fines de mejoramiento, se han desarrollado marcadores tipo microsatélites (SSR) (Chandra & Tiwari, 2010; Sousa *et al.*, 2011a). En la actualidad, se busca implementar herramientas moleculares de bajo costo y rapidez, manteniendo la repetitividad, como lo son Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSRs) (Singh *et al.*, 2014). Su iniciador



para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está compuesto de una secuencia microsatélite como  $(GACA)_n$  anclada al extremo 3' o 5' por dos a cuatro nucleótidos arbitrarios usualmente degenerados (Zietkiewicz *et al.*, 1994). De esta manera, se amplifica una región situada entre dos microsatélites cercanos que incluyan los nucleótidos complementarios. Estos marcadores son polimórficos en la naturaleza, abundantes en el genoma, y combinan los beneficios de los marcadores AFLP y SSR con la universalidad de los marcadores RAPD (Henareh *et al.*, 2016). Los marcadores ISSR son informativos sobre las especies de las que no se dispone de secuencias del genoma, presentan alta reproducibilidad (Morillo *et al.*, 2018), y muestran capacidad de examinar y diferenciar rápidamente entre individuos estrechamente relacionados entre sí (Zietkiewicz *et al.*, 1994). No obstante, hasta la fecha, no hay antecedentes de la implementación de esta técnica en *Megathyrsus maximus*.

### **Citometría de Flujo**

La citometría de flujo (CMF) es una técnica que permite el análisis de las propiedades ópticas (dispersión de la luz y fluorescencia) de partículas que fluyen en una suspensión líquida. Esta medición en flujo es efectuada a alta velocidad (e.g., análisis de 100- 1000 partículas por segundo) y garantiza un análisis objetivo de las partículas que constituyen la población de interés (Doležel, 1998). Dicha técnica permite cuantificar el contenido de ADN nuclear de una planta (valor 2C) e inferir a partir de ello el nivel de ADN ploidía (Doležel *et al.*, 2007; Greilhuber *et al.*, 2005). La interpretación de los resultados, en términos de ADN ploidía, se realiza a partir del estudio del contenido de ADN nuclear (valor 2C) obtenido del análisis conjunto de la muestra incógnita con un estándar de referencia (Galbraith *et al.*, 2002). Una de las principales ventajas de la CMF, con respecto al método tradicional del conteo de cromosomas en metafase, es que no necesita células en división del material vegetal (Doležel & Bartos, 2005). Además, los protocolos utilizados para el aislamiento de los núcleos vegetales son sencillos y rápidos, lo que permite el análisis de numerosas muestras por día (Doležel & Bartos, 2005; Loureiro *et al.*, 2006; Otto, 1990).

La implementación de dicha técnica ha permitido la determinación del tamaño genómico y niveles de ADN ploidía en diferentes materiales de pasturas forrajeras (Akiyama *et al.*, 2008; Burson *et al.*, 2012; Carloni *et al.*, 2014; Kaushal *et al.*, 2018; Kharrat-Souissi *et al.*, 2012).

## Calidad Nutritiva en Forrajes

La evaluación de la calidad del forraje es de gran utilidad para explicar los valores nutritivos y la capacidad de pastoreo del ganado (Arzani & Naseri, 2007; Baumont *et al.*, 2008). El valor nutritivo de una pastura está altamente asociado con su anatomía foliar (es decir, con los tejidos constituyentes de sus hojas, que presentan marcadas variaciones en la composición química y rigidez de las paredes de sus células), con las condiciones ambientales y con su estado de crecimiento (Batistoti *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2010). Al respecto, las características anatómicas de las hojas se citan como indicadores de adaptación al ambiente (Al-Maskri *et al.*, 2014; Hameed *et al.*, 2010, 2012) e influyen en la calidad de una pastura (Batistoti *et al.*, 2012).

Determinar el valor nutritivo de los forrajes es importante en la nutrición del ganado, porque una producción ganadera eficiente se relaciona con la cantidad de nutrientes en el forraje (Schut *et al.*, 2010). El valor nutricional del forraje depende de la cantidad de proteínas y carbohidratos digeribles (France *et al.*, 2000). Entre los indicadores usados de calidad forrajera, se encuentran la Proteína bruta (PB) y la energía metabólica (EM) (Pinkerton, 2005; White & Wight, 1984). La fibra detergente neutro (FDN) y la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) también son parámetros que indican calidad forrajera; éstos se acoplan directamente a la dinámica fenológica-productiva (Johnson *et al.*, 2008; McCall & Bishop-Hurley, 2003). Estudios recientes han demostrado que la digestibilidad de la FDN (dFDN) de las pasturas en estado vegetativo decrece continuamente durante todo el rebrote posterior a una defoliación por corte o pastoreo. Esta caída de calidad no está simplemente relacionada con la biomasa que se acumula durante el rebrote, sino que también guarda estrecha asociación con la edad y el tamaño de las hojas que componen esa biomasa (Agnusdei *et al.*, 2011; Di Marco *et al.*, 2013; Groot & Neuteboom, 1997; Insua *et al.*, 2012, 2013, 2014, 2016). Por otra parte, cenizas, lignina, celulosa y algunos otros compuestos químicos vegetales también se miden como indicadores de la calidad del forraje (El-Waziry, 2007), considerándose la digestibilidad de la materia seca como uno de los principales índices que determinan la calidad del forraje (Rhodes & Sharrow, 1990). Estudios de Van Soest, (1991, 1994) han demostrado que la fibra detergente ácida (FDA) es el mejor indicador para determinar el valor nutricional en comparación con la fibra cruda, porque FDA contiene celulosa y lignina, y la digestibilidad de la materia seca disminuye significativamente con el aumento de

la lignina. Por otra parte, el porcentaje de hojas y la relación hoja/tallo han sido usados en *M. maximus* como importantes indicadores de selección asociados a calidad forrajera (Stabile *et al.*, 2010).

### **Lignificación de los tejidos con la ontogenia**

La pared celular en las células de las plantas superiores son ensamblajes moleculares complejos que incluyen principalmente polisacáridos (celulosa, pectina y hemicelulosa) y componentes fenólicos (lignina y ácidos p-hidroxicinámico). Al respecto, la lignina es un heteropolímero aromático que actúa como una barrera física para las enzimas microbianas que digieren polisacáridos (Giordano *et al.*, 2014; Jung & Casler, 2006 a, b), lo que limita el acceso a los azúcares de la pared celular y afecta negativamente la utilización de biomasa para alimentación de ganado, fabricación de papel y lignocelulosa y producción de biocombustibles (Chapple *et al.*, 2007). Además, de manera indirecta, reduce la productividad animal y la eficiencia de conversión en carne o leche (Giordano *et al.*, 2014; Jung & Casler, 2006 a, b). Es por ello, que se ha considerado a la lignina como uno de los factores que correlacionan negativamente con la degradabilidad de las paredes celulares (Barrière *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2011; Fukushima *et al.*, 2015; Stabile *et al.*, 2010). Esto último depende de la cantidad de lignina, composición de monómeros y grupos funcionales y del grado de entrecruzamiento con los polisacáridos de la pared celular (Zhang *et al.*, 2013). Además, se cita en la bibliografía que dicha correlación es mayor cuando se incluyen en el análisis muestras de diferentes estados de maduración (Mechín *et al.*, 2005) y que, además, depende de la metodología empleada para su cuantificación (Fukushima *et al.*, 2015).

El proceso de lignificación es coordinado y regulado por un conjunto de eventos metabólicos que resultan en la biosíntesis de precursores de la lignina (monolignoles). Algunas de las enzimas claves de dicho proceso son: ácido cafeico-O-metiltransferasa (COMT), 4-cumarato CoA ligasa (4CL), cinamoil CoA reductasa (CCR), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y cinamato 4 hidroxilasa (C4H) (Fu *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2010; Stabile *et al.*, 2010). La composición de la lignina varía entre especies de plantas y en tejidos. En general, las ligninas de los helechos y de las gimnospermas se componen básicamente de unidades G: Guayacilo con cantidades menores de unidades H: Hidroxifenilo. Las ligninas de las dicotiledóneas en angiospermas se componen de unidades G y S: Siringilo y pocas cantidades de unidades H, mientras que en las ligninas de las

monocotiledóneas tanto las unidades S como las G están presentes en niveles similares y la cantidad de unidades H es mayor que en las dicotiledóneas (Vanholme *et al.*, 2010a).

En monocotiledóneas y más específicamente en gramíneas, la expresión de genes que codifican enzimas de la ruta de los fenilpropanoides ha demostrado estar involucrada en la modulación de la velocidad de síntesis de la lignina (Ralph *et al.*, 2004) y su expresión se ha asociado negativamente con la digestibilidad (Barrière *et al.*, 2009). No obstante, es escasa la información sobre estas asociaciones en *M. maximus* (Fu *et al.*, 2011).

## Hipótesis

La pérdida de digestibilidad de *Megathyrus maximus* con el avance de la madurez está asociada a cambios histológicos, en la composición química de la pared celular y en la expresión de genes de la biosíntesis de la lignina.

## Objetivos generales

Evaluar la variabilidad genética presente en materiales de *Megathyrus maximus* mediante marcadores moleculares ISSR y determinar el contenido de ADN ploidía mediante citometría de flujo.

Evaluar en *Megathyrus maximus* cambios histológicos en hojas y tallos y cambios en la composición química de la pared celular con el avance de la ontogenia del cultivo y su relación con la digestibilidad y la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de la lignina.

## Objetivos específicos

1. Evaluar la variabilidad genética en materiales de *Megathyrus maximus* mediante marcadores moleculares intermicrosatélites (ISSR). (este objetivo se desarrolla en el Capítulo 2).
2. Determinar el contenido de ADN ploidía en materiales de *Megathyrus maximus* a través de citometría de flujo. (este objetivo se desarrolla en el Capítulo 3).
3. Evaluar la existencia de variabilidad genética en relación al efecto de la ontogenia del cultivo sobre parámetros de calidad forrajera en materiales de *Megathyrus maximus* (este objetivo se desarrolla en el Capítulo 4).

4. Clasificar los materiales de *Megathyrsus maximus* en relación al efecto de la ontogenia del cultivo sobre la digestibilidad de la FDN de los tallos (este objetivo se desarrolla en el Capítulo 4).
5. Determinar cambios histológicos con el avance de la madurez en láminas y tallos de aquellos materiales de *Megathyrsus maximus* que resulten ser contrastantes en la digestibilidad de la FDN de los tallos (este objetivo se desarrolla en el Capítulo 4).
6. Evaluar el nivel de expresión génica de enzimas clave que participan en la biosíntesis de la lignina en láminas y tallos de materiales de *Megathyrsus maximus* que resulten ser contrastantes en la digestibilidad de la FDN de los tallos (este objetivo se desarrolla en el Capítulo 5).
7. Correlacionar caracteres moleculares, anatómicos, morfo-agrónomicos y de calidad forrajera evaluados en láminas y tallos de genotipos contrastantes de *M. maximus* en relación al avance de la madurez ontogénica (este objetivo se desarrolla en el Capítulo 6).

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, M., Shrivastava, N & Padh, H. (2008). Avances en técnicas de marcadores moleculares y sus aplicaciones en ciencias vegetales. Informes de células vegetales, 27:617-631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>.
- Agnusdei, M.G., Di Marco, O.N., Nanning, F.R & Aello, M.S. (2011). Leaf blade nutritional quality of rhodes grass (*Chloris gayana*) as affected by leaf age and length. Crop and Pasture Science, 62:1098-1105. <http://dx.doi.org/10.1071/CP11164>.
- Akiyama, Y., Yamada-Akiyama, H., Yamanouchi, H., Takahara, M., EbinaM, Takamizo, T., Sugita, S & Nakagawa, H. (2008). Estimation of genomesize and physical mapping of ribosomal DNA in diploid and tetraploid guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) Japanese Society of Grassland Science, 54:89-97. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-697X.2008.00110.x>.

Al-maskri, A., Hameed, M., Ashraf, M., Khan M., Fatima S., Nawaz T & Batool, R. (2014). Structural Features of Some Wheat (*Triticum* spp.) Landraces/Cultivars Under Drought and Salt Stress, *Arid Land Research and Management*, 28(3):355-370. <http://dx.doi.org/10.1080/15324982.2013.841306>.

Arelovich, H., Bravo, R & Martínez, M. (2011). Development, characteristics, and trends for beef cattle production in Argentina. *Animal Frontiers*, 1(2):37-45. <https://doi.org/10.2527/af.2011-0021>.

Arzani, H & Naseri, K.L. (2007). *Livestock Feeding on Pasture: University of Tehran; (In Persian)*, 299.

Barrière, Y., Alber, D., Dolstra, O., Lapierre, C., Motto, M., Ordas, A., Van Waes, J., Vlaswinkel, L., Welcker, C & Monod, J. P. (2006). Past and prospects of forage maize breeding in europe. II. History, germplasm evolution and correlative agronomic changes. *Maydi-ca*, 51: 435-449.

Barrière, Y., Méchin, V., Lafarguette, F., Manicacci, D., Guillon, F., Wang H., Lauressergues, D., Pichon, M., Bosio, M & Tatout, C. (2009). Toward the discovery of maize cell wall genes involved in silage maize quality and capacity to biofuel production. *Maydi-ca*, 54:161-198. <https://www.researchgate.net/publication/279577405>.

Batistoti, C., Lempp, B., Jank L., das G. Morais M., Cubas A.C., Gomes R.A & Ferreira M.V.B. (2012). Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum*. genotypes *Animal Feed Science and Technology*, 171:173-180. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.11.008>.

Baumont, R., Aufrere, J., Niderkorn, V., Andueza, D., Surault, F., Peccatte, J., Delaby, L & Pelletier, P. (2008). Specific diversity in forages: its consequences on the feeding value. *Fourrages*, 194:189-206.

- Becerra, V & Paredes, C.M. (2000). Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. *Agricultura Técnica*, 60: 270-281. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007>.
- Benabderrahim, M.A & Elfalleh, W. (2021). Forage potential of non-native guinea grass in North African agroecosystems: genetic, agronomic, and adaptive traits. *Agronomy*, 11:1071. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061071>.
- Bluma-Marques, A.C., Chiari, L., Agnes, D.C., Jank, L & Pagliarini, M.S. (2014). Molecular markers linked to apomixis in *Panicum maximum*. *African Journal of Biotechnology*, 13:2198-2202. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.13703>.
- Brizuela, M.A & Cangiano, C.A. (2011). Especies forrajeras cultivadas en Argentina. Pages 31-62. En: *Producción Animal en Pastoreo*. C. A. Cangiano and M. A. Brizuela, ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina.
- Burson, B.L., Actkinson, J.M., Hussey, M.A & Jessup, R.W. (2012). Ploidy determination of buffel grass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. *South African Journal of Botany*, 79:91-95. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.12.003>.
- Byrt, C.S., Grof, C.P & Furbank, R.T. (2011). Plants as biofuel feedstocks: Optimising biomass production and feedstock quality from a lignocellulosic perspective. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53:120-135. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.01023.x>.
- Carloni, E., Ribotta, A., López Colomba, E., Griffa, S., Quiroga, M., Tommasino, E., Luna, C & Grunberg, K. (2014). Somatic embryogenesis from *in vitro* anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117:311-322. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0441-4>.

- Chandra, A & Tiwari, K.K. (2010). "Isolation and characterization of microsatellite markers from guineagrass (*Panicum maximum*) for genetic diversity estimate and cross-species amplification. *Plant breeding*, 129:120-124. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01651.x>.
- Chapple, C., Ladisch, M & Meilan, R. (2007). Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nature Biotechnology*, 25:746-748. <https://htirc.org/wp-content/uploads/2017/03/Nat-Biotech-Meilan-2007.pdf>.
- Di Marco, O.N., Harkes, H & Agnusdei, M.G. (2013). Calidad de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) en estado vegetativo en relación con la edad y longitud de las hojas. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 39:105-110. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86426063008>.
- Doležel, J & Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95:99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L & Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82:17-26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a010312>.
- Doležěl, J., Greilhuber, J & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2:2233-2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>.
- El-Waziry, A.M. (2007). Nutritive value assessment of ensiling or mixing Acacia and Atriplex using *in vitro* gas production technique. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3:605-614. <https://www.researchgate.net/publication/228360606>.
- France, J., Theodorou, M., Lowman, R & Beever, D. (2000). Feed evaluation for animal production. Feeding systems and feed evaluation models. Centre for Agriculture and Biosciences International. Publishing, 12-20.



- Fu, C., Xiao, X., Xi, Y., Ge, Y., Chen, F., Bouton, J., Dixon, R.A & Wang Z-Y. (2011). Downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) leads to improved saccharification efficiency in switchgrass. *BioEnergy Research*, 4:153-164. <https://doi.org/10.1007/s12155-010-9109-z>.
- Fukushima, R.S., Bacha, C.B., Fuzeto, A.P., Port, A.C.R., Herling, V.R & Velásquez, A.V. (2015). Utilization of equations to predict carbohydrate fractions in some tropical grasses. *Animal Feed Science and Technology*, 208: 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.06.016>.
- Galbraith, D.W., Lambert, G.M., Macas, J & Doležel, J. (2002). Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: *Current protocols in cytometry*. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0706s02>.
- Giordano, A., Liu, Z., Panter, S.N., Dimech, A.M., Shang, Y., Wijesinghe, H., Fulgueras, K., Ran, Y., Mouradov, A., Rochfort, S., Patron, N.J & Spangenberg, G.C. (2014). Reduced lignin content and altered lignin composition in the warm season forage grass *Paspalum dilatatum* by down-regulation of a Cinnamoyl CoA reductase gene. *Transgenic Research*, 23: 503-517. <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-014-9784-1>.
- Greilhuber, J., Doležel, J., Lysák, M.A & Bennet, M.D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size", and "C-value" to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 95:255-260. <https://doi.org/10.1093/aob/fci019>.
- Groot, J.C.J & Neuteboom, J.H. (1997). Composition and digestibility during ageing of Italian ryegrass leaves of consecutive insertion levels. *Journal of Science Food Agricultural*, 75:227-236. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199710\)75:2%3C227::AID-JSFA869%3E3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199710)75:2%3C227::AID-JSFA869%3E3.0.CO;2-F).
- Hacker, J.B & Jank, L. (1998). Breeding tropical and subtropical forage plants. In Cherney JH and Cherney DJR. Eds. *Grass for dairy cattle*. CABI, Wallingford, 49-71. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-551-2>.

- Hameed, M., Ashraf, M., Ahmad, M.S.A & Naz, N. (2010). Structural and functional adaptations in plants for sa-linity tolerance. In: Ashraf, M; Ozturk, M; Ahmad, MSA. Eds, Plant Adaptation and Phytoremedia-tion, Springer Science & Business Media BV, 151-170. [http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7_8).
- Hameed, M., Batool, S., Naz, N., Nawaz, T & Ashraf, M. (2012). Leaf structural modifi-cations for drought tolerance in some differentially adapted ecotypes of blue panic (*Panicum antidotale* Retz.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34:1479-1491. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-012-0946-6>.
- Henareh, M., Dursun, A., Abdollahi-Mandoulakani, B & Haliloğlu, K. (2016). Assessment of genetic diversity in tomato landraces using ISSR markers. *Genetika*, 48:25-35. <http://dx.doi.org/10.2298/GENSR1601025H>.
- Hatfield, R.D., Marita, J.M., Frost, K., Grabber, J., Ralph, J., Lu, F.C & Kim, H. (2009). Grass Lignin Acylation: p-Coumaroyl Transferase Activity and Cell Wall Characteristics of C3 and C4 Grasses. *Planta*, 229:1253-1267. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0900-z>.
- Huang, C., Liu, G., Bai, C & Wang, W. (2013). Genetic relationships of *Cynodon arcuatus* from different regions of China revealed by ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 162:172-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.039>.
- Ministerio de Economía. (2021). Informes de cadenas de valor. <https://www.studocu.com/es-ar/document/universidad-siglo-21/produccion-animal/stock/68992591>.
- Insua, J.R., Agnusdei, M.G & Di Marco, O.N. (2012). Calidad nutritiva de láminas de dos cultivares de “festuca alta” (*Festuca arundinacea* Schreb). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 38:190-195. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-23142012000200014&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142012000200014&lng=es&nrm=iso).

- Insua, J.R., Di Marco, O.N & Agnusdei, M.G. (2013). Calidad nutritiva de láminas de “festuca alta” (*Festuca arundinacea* Schreb.) en rebrotes de verano y otoño. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 39:267-272. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-23142013000300009&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142013000300009&lng=es&nrm=iso).
- Insua, J.R., Di Marco, O.N & Agnusdei, M.G. (2014). Longitud de la vaina como determinante de la calidad de hojas de *Festuca arundinacea* durante un período de rebrote. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 40:202-207. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-23142014000200013&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142014000200013&lng=es&nrm=iso).
- Insua, J.R., Agnusdei, M.G., Machado, C.F & Berger, H. (2016). Modelación de la calidad nutritiva de pasturas defoliadas. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 42:317-323. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-23142016000300012&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142016000300012&lng=es&nrm=iso).
- Jank, L., Valle, C & Resende, R. (2011). Breeding tropical forages. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* S, 1:27-34. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332011000500005>.
- Johnson, I.R., Chapman, D.F., Snow, V.O., Eckard, R.J., Parsons, A.J., Lambert, M.G & Cullen, B.R. (2008). DairyMod and EcoMod: biophysical pasture-simulation models for Australia and New Zealand. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48:621-631. <https://doi.org/10.1071/EA07133>.
- Jung, H.G & Casler, M.D. (2006a). Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. *Crop Science*, 46:1793-1800. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.02-0085>.
- Jung, H.G & Casler, M.D. (2006b). Maize stem tissues: Impact of maturation on cell wall degradability. *Crop Science*, 46:1801-1809. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.02-0086>.

- Kaushal, P., Dwivedi, K.K., Radhakrishna, S., Srivastava, M.K., Malaviya, D.R., Roy, A.K., Saxena, S & Paul, S. (2018). Ploidy dependent expression of apomixis and its components in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Euphytica*, 214:152. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-018-2232-1>.
- Kharrat-Souissi, A., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S.C & Chaieb M. (2012). Cytogeography of *Cenchrus ciliaris* (Poaceae) in Tunisia. *Folia Geobotanica*, 48:95-113. <https://doi.org/10.1007/s12224-012-9137-x>.
- Kunst, C., Ledesma, R., Cornacchione, M., Castañares, M., Van Meer, H & Godoy, J. (2014). Yield and growth features of *Panicum maximum* (Jacq.) var *Trichoglume* cv Petrie (Green Panic) under woody cover, Chaco region, Argentina. *Agroforestry Systems*, 88:157-171. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9663-4>.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry *Annals of Botany*, 98:679-689. <https://doi.org/10.1093%2Faob%2Fmcl141>.
- McCall, D.G & Bishop-Hurley, G.P. (2003). A pasture growth model for use in a whole-farm dairy production model. *Agricultural Systems*, 76:1183-1205. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-521X\(02\)00104-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-521X(02)00104-X).
- Méchin, V., Argillier, O., Rocher, F., Hébert, Y., Mila, I., Pollet, B., Barrière, Y & Lapierre, C. (2005). In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53:5872-5881. <https://doi.org/10.1021/jf050722f>.
- Morillo, A.C., González, J & Morillo, Y. (2018). Caracterización de la diversidad genética de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16:26-33. doi: <http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v16n1.631>.

- Moura, J.C., Bonine, C.A., de Oliveira Fernandes, V.J., Dornelas, M.C & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52:360-376. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>.
- Muir, J & Jank, L. (2004). Guineagrass. In: Warm-Season (C4) Grasses. Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE. Eds. *Agronomy Monograph N° 45*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, 589-621. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr45>.
- Nakajima, K., Komatsu, T., Mochizuki, N & Suzuki, S. (1979). Isolation of diploid and tetraploid sexual plants in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Japanese Journal of Breeding*, 29:228-238. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.29.228>.
- Otto, F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: *Methods in cell biology*. Crissman H. A. and Darzynkiewicz Z. Eds. Academic Press Incorporated, 105-110. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60516-6).
- Parodi, L. (1987). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo I. Editorial ACMES. S.A.C.I.
- Peman, O & Asociados S.A. (2003). Gatton panic. Sitio de Producción Animal. [http://www.produccionanimal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pasturas\\_cultivadas\\_megatermicas/03-gatton\\_panic.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/03-gatton_panic.pdf). (acceso 08/02/2017).
- Pérez, H. (2005). Características de las especies forrajeras adaptadas a las condiciones del Noroeste del país. *Forrajes 2005*. Seminario técnico. Producciones Gráficas S.A. Bs As, Capital Federal, 33-41.
- Pinkerton, B. (2005). Forage quality. *Clemson University Cooperative Extension Service*. Forage fact sheet 2. Cooperative Extension Service, Clemson University.

- Rearte, D.H. (2011). El rol de las pasturas cultivadas y pastizales en el nuevo escenario de la ganadería argentina. En: Producción animal en pastoreo. Ed. INTA Balcarce, Argentina, 13-29.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H & Boerjan, W. (2004). Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3:29-60. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4>.
- Rhodes, B.D & Sharrow, S.H. (1990). Effect of grazing by sheep on the quantity and quality of forage available to big game in Oregon's Coast Range. *Journal of Range Management*, 235:237. <http://dx.doi.org/10.2307/3898680>.
- Ribotta, A., López Colomba, E., Bollati G., Striker, G, Carloni, E., Griffa, S., Quiroga, M., Tommasino, E & Grunberg, K. (2019). Agronomic and molecular characterization of *Chloris gayana* cultivars and salinity response during germination and early vegetative growth. *Tropical Grasslands-Forrajeros Tropicales*, 7:14-24. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)14-24](https://doi.org/10.17138/tgft(7)14-24).
- Schut, A., Gherardi, S & Wood, D. (2010). Empirical models to quantify the nutritive characteristics of annual pastures in south-west Western Australia. *Crop and Pasture Science*, 61:32-43. <http://doi.org/10.1071/CP08438>.
- Shao, Q.S., Guo, Q.S., Deng, Y.M & Guo, H.P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38:1160-1169. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.11.002>.
- Singh, P.K.H., Sharam, N., Srivastava & Bhagyawant, S. (2014). Analysis of genetic diversity among wild and cultivated chickpea genotypes employing ISSR and RAPD markers. *American Journal of Plant Sciences*, 5:676-682. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.55082>.

- Skerman, P., Cameron, D & Riveros, F. (1991). Gramíneas Tropicales. Colección de la FAO: Producción y protección vegetal, 12:707.
- Stabile, S.S., Salazar, D.R., Jank, L., Renno, F.P & Silva, L.F.P. (2010). Characteristics of nutritional quality and production of genotypes of guineagrass harvested in three maturity stages. *Brazilian Journal of Animal Science*, 39:1418-1428. [www.sbz.org.br](http://www.sbz.org.br).
- Savidan, Y & Pernès, J. (1982). Diploid-tetraploid-haploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution*, 36:596-600. <https://doi.org/10.2307/2408104>.
- Sousa, A.C.B., Jungmann, L., Campos, T., Sforça, D.A., Boaventura, L.R., Silva, G.M.B., Zucchi, M.I., Jank, L & de Souza, A.P. (2011a). Development of microsatellite markers in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species. *Plant Breeding*, 130:104-108. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2010.01779.x>.
- Sousa, A.C.B., Jank, L., de Campos, T., Sforça, D.A., Zucchi, M.I & de Souza, A.P. (2011b). Molecular diversity and genetic structure of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.), a tropical pasture grass. *Tropical Plant Biology*, 4:185-202. <http://dx.doi.org/10.1007/s12042-011-9081-6>.
- Tomas, P.A, Rivero, M.N, & Tomás, M.A. (2017). Caracterización de la variabilidad genética en germoplasma de *Melilotus albus* mediante marcadores moleculares ISSR y SSR. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 28(1), 27-39. Recuperado en 12 de abril de 2024, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-62332017000100003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-62332017000100003&lng=es&tlng=es).
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J & Boerjan, W. (2010a) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153:895-905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>.

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Van Soest, P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University, Ithaca. 476. <https://doi.org/10.7591/9781501732355>.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M & Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>.
- White, L.M & Wight, J.R. (1984). Forage yield and quality of dryland grasses and legumes. *Journal of Range Management*, 37:233-236. <http://dx.doi.org/10.2307/3899144>.
- Williams, J.G.K., A. Kubelik, K., Livak, J., Rafalski & Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
- Zhang, Y., Legay, S., Barrière, Y., Méchin, V & Legland, D. (2013). Color quantification of stained maize stem section describes lignin spatial distribution within the whole stem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:3186-3192. <https://doi.org/10.1021/jf400912s>.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A & Labuda, D. (1994) Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20:176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>.



## CAPÍTULO 2

# EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE VARIABILIDAD GENÉTICA PRESENTE EN MATERIALES DE *MEGATHYRSUS MAXIMUS* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES INTERMICROSATÉLITES

## INTRODUCCIÓN

Al iniciar un proceso de mejoramiento genético es necesario contar con variabilidad genética. La existencia de diferencias puede ser verificada a través de marcadores morfo-agronómicos y/o moleculares. En el primer caso se utilizan caracteres de fácil identificación fenotípica y no correlacionados para diferenciar los materiales (Nadeem *et al.*, 2018; Salgotra & Stewart, 2020). Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones en cuanto al número de caracteres y la complejidad y el momento ontogénico para poder llevar a cabo estas determinaciones. En la actualidad, con el advenimiento de la biología molecular, es posible discriminar genotipos a través de marcadores moleculares como *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) y *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Vos *et al.*, 1995). Estos son marcadores de tipo dominante debido a que se citan problemas de repetitividad para el primero y de tipo laborioso para el segundo (Agarwal *et al.*, 2008) y en función de caracterizar la diversidad genética con fines de mejoramiento, se han desarrollado marcadores tipo microsatélites (SSR) (Chandra & Tiwari, 2010; Sousa *et al.*, 2011b).

Los *Intermicrosatélites* (ISSR) son un tipo de marcador genético de naturaleza dominante que permite obtener niveles de variación en regiones de microsatélites; estas regiones consisten en repeticiones en *tandem* de motivos simples como  $(CT)_n$  ó  $(CA)_n$ , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). Esta técnica se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su iniciador está compuesto de una

secuencia microsatélite como (GACA)<sub>n</sub> anclada al extremo 3' o 5' por dos a cuatro nucleótidos usualmente degenerados (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los ISSRs se han utilizado ampliamente por su rápida implementación y su bajo costo, con la finalidad de establecer diversidad genética en una serie de cultivos como arroz, frijoles, plátanos y papas (Awasthi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2003; Pradeep Reddy *et al.*, 2002; Zizumbo *et al.*, 2005), identificar cultivares estrechamente relacionados (Carvalho *et al.*, 2004; González *et al.*, 2005) y para estudiar procesos evolutivos y ecológicos (Liston *et al.*, 2003; Wallace, 2003).

La interpretación de este tipo de marcadores se realiza con la lectura de geles donde las secuencias repetitivas idénticas con secuencias de anclaje diferentes proporcionan patrones diferentes (Wolfe & Liston, 1998). ISSR combina las ventajas de AFLP y análisis de microsatélites (SSR) pero, a diferencia de este último, la información de la secuencia previa para el diseño del cebador no es requerido (Pradeep Reddy *et al.*, 2002) y se considera como un técnica sencilla y económica, pero fiable para la evaluación de la diversidad genética en pastos (Paáakinskie *et al.*, 2000). En *Panicum coloratum* dicho marcador ha permitido la discriminación genética de materiales (Pittaro *et al.*, 2012 a, b, c) y también en poblaciones de *Chloris gayana* (Ribotta *et al.*, 2019).

## **Hipótesis**

Existe variabilidad genética en materiales de *Megathyrsus maximus* detectable mediante marcadores moleculares intermicrosatélites (ISSR).

## **Objetivo general**

Evaluar la existencia de variabilidad genética presente en materiales de *M. maximus* mediante marcadores moleculares intermicrosatélites (ISSR).

## **Objetivos específicos**

Ajustar la técnica de intermicrosatélites (ISSR) en materiales de *M. maximus*.

Caracterizar molecularmente los materiales de *M. maximus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo de tesis se utilizaron plantas del jardín de introducción de la UCC que correspondían a los genotipos Gatton Panic (GA), Green Panic (GR), Mutale (MU), Penquero (PE) y Vencedor (VE).

Estos genotipos fueron descritos por Aganga & Tshwenyane, (2004) de la siguiente manera: 1) *Megathyrsus maximus* cv. Gatton; es un genotipo de altura media originalmente de Zimbabue (Humphreys & Patridge, 1995). 2) O'Reilly, (1975) describió el cv. Green Panic (*Megathyrsus maximus* var. *Trichoglume*) como nativo de África. También es una planta perenne alta, con macollos, que crece en verano. Green panic es más claro en apariencia y de porte más alto. 3) cv. Mutale es un genotipo local de Sudáfrica del norte de la provincia de Transvaal. 4) cv. Vencedor fue mejorado para la tolerancia al frío en América del Sur. 5) Penquero que es un ecotipo obtenido a partir de una vieja población de Gatton Panic.

En primer término, se llevó a cabo la caracterización molecular de ocho clones del genotipo Vencedor, 15 de Gatton, 17 de Green Panic, 16 de Penquero y 26 del genotipo Mutale de *Megathyrsus maximus* debido a que los materiales provenían de propagación agámica. Luego de confirmar que los patrones de bandeo correspondientes a todos los clones evaluados por los genotipos eran idénticos, se procedió a hacer un pool de ADN por cada una para evaluar diferencias en los patrones de bandeo entre los genotipos evaluados.

### **Ajuste de la técnica intermicrosatélites (ISSR) y caracterización molecular**

#### ***Extracción de ADN genómico total***

Aproximadamente 100mg de hojas frescas en estado vegetativo completamente expandidas de cada uno de los materiales fueron muestreados en un único momento; las repeticiones correspondieron al número de clones por cada genotipo. Se tomaron segmentos de 4 cm desde la base de la tercera y cuarta lámina completamente expandida, los cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Posteriormente, se molieron con aire líquido en morteros de porcelana y se realizó

la extracción del ADN siguiendo las instrucciones detalladas en el protocolo del *Kit Phytopure* (Amersham, Pharmacia). El ADN fue resuspendido en agua tipo miliQ deionizada tratada con luz UV, sin autoclavar. El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotómetro (ND1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA) y se sembró en geles de agarosa al 0,8% (p/v), realizando la corrida en cuba de electroforesis en solución tampón TBE 0,5X a 50 Voltios durante 1 hora. Posteriormente, el gel se reveló con Gel Red bajo analizador de imágenes (BIORAD, Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (USA)). Los morteros, pilones, placas de Petri, pinzas, espátulas y todo el material de vidrio utilizado se esterilizaron en estufa a 180°C durante 4 horas.

### ***Protocolo de la técnica ISSR***

La caracterización molecular se realizó mediante la técnica ISSR (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). Se emplearon diferentes repeticiones de secuencias simples universales (obtenidas a partir de *The University of British Columbia primer set 9* y de otras especies cultivadas) (Gutiérrez-Ozuna *et al.*, 2009; Vaillancourt *et al.*, 2008) en la búsqueda de polimorfismos en los clones bajo estudio. Las mezclas de reacción se realizaron en cámara de flujo laminar (Fig. 1) y las condiciones de ciclado se realizaron según el protocolo propuesto por Ribotta *et al.*, (2019). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Master Cycler Gradient Eppendorf AG 22331, Eppendorf, Germany) con los siguientes parámetros: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 93°C por 30 s, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min 30 s, seguido de un período de extensión final de 72°C por 5 min. Posteriormente, los productos de amplificación se sembraron en geles de agarosa al 2% (p/v) sobre TBE 0,5X [Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM (pH 8,3)]. Se sembró un volumen de 10 µl de muestra por calle, respetando siempre el mismo orden en el gel. Conjuntamente, se sembró un marcador de peso molecular *GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder* (ThermoScientific Inc.) como marcador de referencia. Las muestras se corrieron en cuba de electroforesis con TBE 0,5X a 50 Voltios durante 1:30 h y a 100 Voltios durante 1h. Los geles se tiñeron con Gel Red y la presencia o ausencia de bandas se observó bajo luz ultravioleta, en analizador de imágenes (BIORAD, Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (USA)).

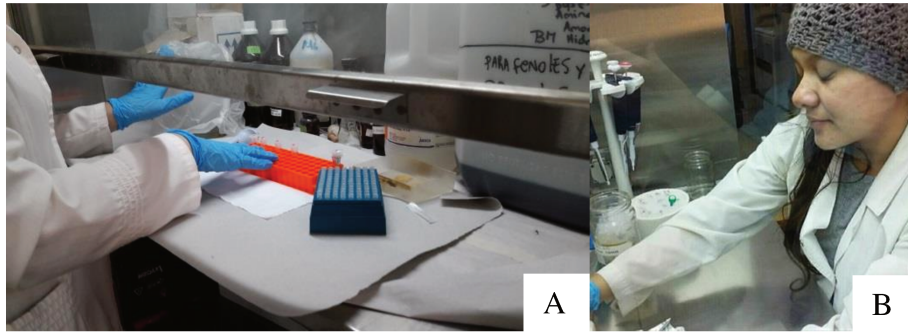


Fig. 1. Técnica de extracción de ADN y amplificación por Intermicrosatélites. A. Extracción de ADN. B. Mezclas de reacción en cámara de flujo laminar para la amplificación por intermicrosatélites.

Todos los cebadores analizados generaron patrones de bandeo con bandas claras y repetibles, obteniendo fragmentos amplificados de ADN que oscilaban entre los 180-3000 pb (Tabla 1).

**Tabla 1.** Lista de los cebadores tipo ISSR seleccionados para la amplificación de ADN, de los cinco genotipos de *Megathyrus maximus*, Secuencia (5'-3') y longitud de las bandas amplificadas a una temperatura de melting de 55°C.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud de las bandas amplificadas (pb)
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAT	500-2500
UBC816	CACACACACACACAT	180-2000
UBC825	ACACACACACACACT	200-1800
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGCT	200-3000
UBC840A	GAGAGAGAGAGAGACT	200-2500

### Análisis estadístico

Las diferencias en el patrón de bandas generado entre cada clon fueron determinadas por comparación en el gel para cada uno de los cebadores, utilizando el marcador de referencia. Las bandas generadas con los diferentes cebadores para cada uno de los materiales bajo estudio, que presentaran patrones reproducibles, se usaron para construir una matriz binaria, tomando como 1 a cada banda presente y 0 si la banda estuvo ausente, considerando bandas iguales a las que presentan la misma movilidad en el gel (igual peso molecular). A partir de la misma, se construyó una matriz de distancias y un dendrograma. Asimismo, se calcularon el número de bandas totales, el número de bandas polimórficas y monomórficas y el contenido de información polimórfica para cada uno de los cebadores. Todos estos

análisis se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico *InfoGen* (Balzarini & Di Rienzo, 2013).

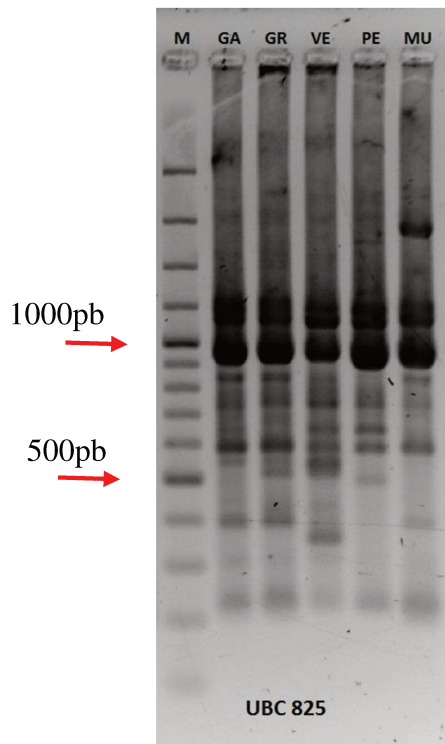
## RESULTADOS

Los cinco cebadores de ISSR permitieron evidenciar variabilidad genética en los cinco materiales de *Megathyrus maximus*. Los resultados estadísticos son mostrados en la Tabla 2.

Los intermicrosatelites que más bandas amplificaron fueron UBS840A, UBC834 y UBC825 con 19 bandas cada uno y tuvieron los mayores valores de contenido de información polimórfica. Se muestra en la Fig. 2 el patrón de amplificación del marcador ISSR UBC825. Por otro lado, el marcador que tuvo menos bandas polimórficas fue el UBC810. Sin embargo, los cinco intermicrosatelites usados en este estudio tuvieron valores que superan la mitad del recorrido o rango esperado para el contenido de información polimórfica (0,01 a 0,05), lo que indica que estos marcadores fueron muy informativos (Tabla 2).

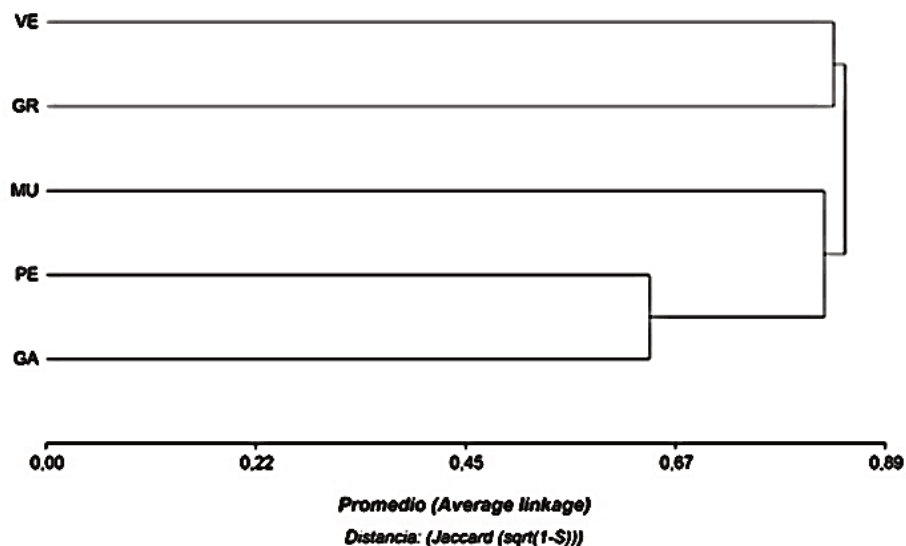
**Tabla 2.** Número de bandas polimórficas (BP), número de bandas monomórficas (BM) y número de bandas totales (BT), contenido de información polimórfica (PIC) y error estándar del PIC (EE), obtenidos con los cinco cebadores ISSR en los cinco genotipos de *M. maximus*.

Cebador	BP	BM	BT	PIC	E.E.
UBC840A	18	1	19	0,32	0,01
UBC810	8	1	9	0,30	0,01
UBC816	13	3	16	0,30	0,01
UBC834	18	1	19	0,32	0,01
UBC825	18	1	19	0,32	0,01
<b>Total</b>	75	7	82	-	-



**Fig.2.** Perfil de amplificación generado por el cebador ISSR denominado UBC825 para los cinco genotipos de *Megathyrus maximus*: Gatton Panic (GA), Green Panic (GR), Vencedor (VE), Penquero (PE), Mutale (MU). M: marcador de peso molecular *GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder*.

Al realizar el análisis de conglomerados, la medida de distancia que permitió ajustar con mayor precisión los resultados fue Jaccard, a través del algoritmo  $\sqrt{1-S}$ , presentando un coeficiente de correlación cofenética de 0,99. El agrupamiento generado a partir de los fragmentos de ISSR en los cinco genotipos permitió diferenciar dos grandes grupos. Por un lado, Vencedor y Green Panic y por el otro, Mutale, Gatton Panic y Penquero, siendo estos últimos los más estrechamente relacionados (Fig. 3).



**Fig. 3.** Dendrograma de los cinco genotipos de *Megathyrus maximus* (Gatton Panic (GA), Green Panic (GR), Vencedor (VE), Penquero (PE), Mutale (MU)) conformado a partir de la matriz de distancias obtenida con cinco cebadores ISSR (UBC840A, UBC834, UBC825, UBC810 y UBC816).

## DISCUSIÓN

En los últimos años, los marcadores ISSR han sido reconocidos como técnicas moleculares útiles y de bajo costo en la selección asistida por marcadores, para la construcción de mapas de ligamiento genético y análisis de diversidad genética (Castonguay *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2010). Nuestros resultados muestran que los ISSR fueron marcadores con gran capacidad para producir bandas polimórficas, lo que está de acuerdo con informes previos en *Chloris gayana* (Ribotta *et al.*, 2019), *Chrysanthemum morifolium* (Shao *et al.*, 2010), *Cynodon arcuatus* (Huang *et al.*, 2013) y *Prunus armeniaca* (Li *et al.*, 2014). En *Panicum coloratum* este tipo de marcadores también sirvió para evaluar diferencias genéticas entre un grupo de genotipos antiguos recolectados de un mismo lugar, los cuales mostraron variabilidad genética (Pittaro *et al.*, 2015). Por otra parte, en colecciones de *Lathyrus sativus*, el marcador ISSR denominado UBC 810, fue considerado uno de los más informativos para distinguir los genotipos (Asadova *et al.*, 2020). El análisis de conglomerados realizado a partir de la técnica ISSR confirmó que los genotipos evaluados en este estudio eran todos diferentes, aunque se detectó proximidad genética entre dos de ellos (GA y PE). Esto podría deberse a que este último genotipo deriva del primero y podría ser el resultado de una adaptación constante a las condiciones ecológicas y



edafoclimáticas a las que están expuestas las plantas. Al respecto, Li *et al.* (2011) sugieren la existencia de un grado de asociación entre el polimorfismo molecular y el origen geográfico, en la que genotipos que crecen en un ambiente similar tienden a agruparse.

## CONCLUSIÓN

Se pudo ajustar la técnica ISSR en genotipos de *Megathyrsus maximus*. Todos los cebadores analizados generaron patrones de bandeo con bandas claras y repetibles, obteniendo fragmentos amplificados de ADN. Por otra parte, el uso de este marcador permitió identificar variabilidad genética, lo que sugiere que podrían ser útiles para identificación varietal dentro de un programa de mejoramiento y análisis de progenies obtenidas de cruzamientos o nuevo germoplasma obtenido en la especie. Dos de los genotipos evaluados. Penquero y Gatton Panic, mostraron estrecha relación genética.

## BIBLIOGRAFÍA

Aganga, A.A & Tshwenyane, S. (2004). Potentials of Guinea Grass (*Panicum maximum*) as Forage Crop in Livestock Production. Pakistan Journal of Nutrition, 3:1-4. <https://doi.org/10.3923/pjn.2004.1.4>.

Agarwal, M., Shrivastava, N & Padh, H. (2008). Avances en técnicas de marcadores moleculares y sus aplicaciones en ciencias vegetales. Informes de células vegetales, 27:617-631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>.

Asadova, A., Babayeva, S., Izzatullayeva, V., Akbarova, S., Aghazade, G., Mirzaliyeva, I & Abbasov, M. (2020). Molecular characterization of *L. sativus* L. collection based on ISSR markers. Genetika, 52:777-786. <http://dx.doi.org/10.2298/GENSR2002777A>.

- Awasthi, A.K., Nagarajal G.M., Naik G.V., Kanginakudru S., Thangavelu K & Nagaraju, J. (2004). Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics*, 5:1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-5-1>.
- Balzarini, M.G & Di Rienzo, J.A. InfoGen versión. (2013). FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.
- Castonguay, Y., Cloutier, J., Bertrand, A., Michaud, R & Laberge S. (2010). SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* ssp. *sativa*). *Theoretical and Applied Genetics*, 120:1611-1619. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1280-2>.
- Carvalho, M., Hopkins, M., Mitchell, S., Kresovich S., Montenegro, J & Ferreira, M. (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, 4:1186-1471. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-11>.
- Chandra, A & Tiwari, K.K. (2010). "Isolation and characterization of microsatellite markers from guineagrass (*Panicum maximum*) for genetic diversity estimate and cross-species amplification. *Plant Breeding*, 129:120-124. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01651.x>.
- González, A., Wong, A., Delgado-Salinas, A & Papa, R.P. (2005). Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. *Crop Science*, 45:606-616. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2005.0606>.
- Gutiérrez-Ozuna, R., Eguiarte, L.E & Molina-Freaner, F. (2009). Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare* L. Link) in north-western Mexico. *Journal of Arid Environments*, 73:26-32. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2008.09.007>.

Huang, C., Liu, G., Bai, C & Wang, W. (2013). Genetic relationships of *Cynodon arcuatus* from different regions of China revealed by ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 162:172-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.039>.

Humphreys, L.R & Partridge, I.J. (1995). A guide to better pastures for the tropics and subtropics. In: *NSW Agriculture*, 31:35. <http://edn.link/cdd6026>.

Jin, Y., He, T & Lu, B.-R. (2003). Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. *New Phytologist*, 159:513-519. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00824.x>.

Li, H., Liu, L., Lou, Y., Hu, T & Fu, J. (2011). Genetic diversity of Chinese natural bermudagrass (*Cynodon dactylon*) germplasm using ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 127:555-561. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.001>.

Li, M., Zhao, Z & Miao, X. (2014). Genetic diversity and relationships of apricot cultivars in North China revealed by ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 173:20-28. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.04.030>.

Liston, A., Wilson B.L., Robinson W.A., Doescher P.S., Harris N.R & Svejcar T. (2003). The relative importance of sexual reproduction versus clonal spread in an aridland bunchgrass. *Oecologia*, 137:216-225. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1332-2>.

Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G & Baloch, F.S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current

status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32:261-285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>.

O'Reilly, M.V. (1975). *Better pastures for de tropices* (Arthur Yates and company pty. Ltd. Queensland Australia).

Pradeep Reddy, M., Sarla, N & Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>.

Paäakinskiene, E.I., Griffiths, C.M., Bettany, A.J.E., Paplauskiene, V & Humphreys, M.W. (2000). Anchored simple-sequence repeats as primers to generate species-specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:384-390. <https://doi.org/10.1007/s001220050050>.

Pittaro, M.G., Tomas, A., Bruno, C & Taleisnik, E. (2012a). Fenotipificación para tolerancia a la salinidad en *Panicum coloratum* var. *coloratum*. Jornadas Latinoamericanas de Recursos Genéticos Mejoramiento y Biotecnología de Especies Forrajeras. UNNOBA, 144. Buenos Aires, Argentina.

Pittaro, M.G., Tomas, A., Bruno, C & Taleisnik, E. (2012b). Fenotipificación para tolerancia a la helada en *Panicum coloratum* var. *coloratum*. Jornadas Latinoamericanas de Recursos Genéticos Mejoramiento y Biotecnología de Especies Forrajeras. UNNOBA, 145. Buenos Aires, Argentina.

Pittaro, M.G., Tomas, A., Bruno, C & Taleisnik, E. (2012c). Correlación entre la evaluación Fenotípica bajo estrés por frio y la caracterización molecular de materiales de *Panicum coloratum* var. *coloratum*. X Congreso Latinoamericano de Sociedades de Estadística. Córdoba, Argentina.

- Pittaro, G., Cáceres, L., Bruno, C., Tomás, A., Bustos, D., Monteoliva, M., Ortega, L. & Taleisnik, E. (2015). Salt tolerance variability among stress-selected *Panicum coloratum* cv. Klein plants. *Grass and Forage Science*, 71:683-698. <https://doi.org/10.1111/gfs.12206>.
- Ribotta, A., López Colomba, E., Bollati G., Striker, G, Carloni, E., Griffa, S., Quiroga, M., Tommasino, E & Grunberg, K. (2019). Agronomic and molecular characterization of *Chloris gayana* cultivars and salinity response during germination and early vegetative growth. *Tropical. Grasslands-Forrajes Tropicales*, 7:14-24. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)14-24](https://doi.org/10.17138/tgft(7)14-24).
- Salgotra, Romesh, K & Stewart, C.N.Jr. (2020). "Functional Markers for Precision Plant Breeding" *International Journal of Molecular Sciences*, 13:4792. <https://doi.org/10.3390/ijms21134792>.
- Shao, Q.S., Guo, Q.S., Deng, Y.M & Guo, H.P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38:1160-1169. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.11.002>.
- Sousa, A.C.B., Jank, L., de Campos, T., Sforça, D.A., Zucchi, M.I & de Souza, A.P. (2011b). Molecular diversity and genetic structure of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.), a tropical pasture grass. *Tropical Plant Biology*, 4:185-202. <http://dx.doi.org/10.1007/s12042-011-9081-6>.
- Vaillancourt, A., Nkongolo, K., Michael, P & Mehes, M. (2008). Identification, characterisation, and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes. *Euphytica*, 159:297-306. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9492-5>.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M & Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>.

Williams, J.G.K., A. Kubelik, K., Livak, J., Rafalski & Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.

Wallace, L.E. (2003). Molecular evidence for allopolyploid speciation and recurrent origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 164:907-916. <https://doi.org/10.1086/378658>.

Wolfe, A.D & Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D. E., P. S. J. J. Doyle, Eds. *Plant Molecular Systematics*. New York. Chapman and Hall, 2:43-86.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20:176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>.

Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-García Marín, P., de la Cruz, E.P., Delgado-Valerio, P & Gepts, P. (2005). Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science*, 45:1073-1083. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0340>.

## CAPÍTULO 3

### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ADN PLOIDÍA EN MATERIALES DE *MEGATHYRSUS MAXIMUS* A TRAVÉS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

#### INTRODUCCIÓN

Debido al tipo de reproducción de *Megathyrus maximus* (apomixis facultativa) es posible hallar una amplia diversidad genómica y citológica. En este contexto, previo a establecer una estrategia de mejoramiento, surge la necesidad de conocer el nivel de ploidía de los diferentes materiales introducidos.

El nivel de ploidía ha sido evaluado rutinariamente utilizando citometría de flujo como un método indirecto del conteo de cromosomas, ya que esta última técnica es laboriosa (Ollitrault-Sammarcelli *et al.*, 1994). La citometría de flujo mide el contenido de ADN de células somáticas, que se utiliza para inferir el número de cromosomas y nivel de ploidía (Arumuganathan & Earle, 1991). Con las debidas restricciones esta técnica permite una discriminación eficaz y precisa de la cantidad de núcleos (previamente aislados y marcados con un fluorocromo) existentes en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M). Una vez que las medidas de fluorescencia de los núcleos son expresadas en una escala arbitraria, la obtención de estimaciones del contenido en ADN nuclear de un determinado tejido requiere la comparación con la fluorescencia de núcleos aislados de un estándar de referencia con tamaño de genoma conocido. Este tipo de análisis está teniendo un impacto elevado en diversas áreas de la biología vegetal, especialmente en disciplinas como la biosistemática, la biotecnología y mejora de plantas, la biología de poblaciones y la ecología (Loureiro, 2009). Más aún, en poblaciones numerosas donde resulta dificultoso cuantificar el número cromosómico (Ollitrault-Sammarcelli *et al.*, 1994), varios autores han propuesto determinar el contenido de ADN mediante citometría de flujo (Berthaud, 2001).

Asimismo, diversos trabajos mencionan que el contenido de ADN nuclear se ha utilizado para medir el nivel de ploidía (Arumuganathan & Earle, 1991) ya que el contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidía están relacionados (Bennett, 1987).

En este estudio, se utilizó la técnica de citometría de flujo para inferir el nivel de ADN ploidía de nuestros materiales ya que, en la actualidad, numerosos trabajos han demostrado la utilidad de la citometría de flujo (CMF) en estudios taxonómicos (Lysák & Doležel, 1998; Marie & Brown, 1993) y en estudios de identificación de la ploidía de variedades híbridas de esta especie (Clayton & Renvoize, 1982; Savidan & Pernès, 1982).

### **Hipótesis**

Existen cambios en el contenido de ADN ploidía en materiales de *Megathyrsus maximus* detectables mediante la técnica de citometría de flujo.

### **Objetivo general**

Determinar el contenido de ADN ploidía en materiales de *Megathyrsus maximus* a través de citometría de flujo.

### **Objetivos específicos**

Analizar mediante citometría de flujo el contenido de ADN ploidía en cinco materiales de *Megathyrsus maximus*.

Establecer la existencia de diferencias en el contenido de ADN ploidía en los materiales de *Megathyrsus maximus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El análisis de CMF se realizó en un citómetro BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San Jose, California, USA) a partir de hojas frescas en estado vegetativo. Las hojas fueron colectadas de plantas establecidas en macetas, provenientes de división agámica de las plantas del jardín de introducción de la Universidad Católica de Córdoba de los cinco materiales de *Megathyrsus*



*maximus* (Gatton Panic, Green Panic, Vencedor, Mutale y Penquero). Las muestras se procesaron utilizando el protocolo de Doležel *et al.* (2007) con pequeñas modificaciones (Carloni *et al.*, 2014). Segmentos de hojas de 4 - 6 cm<sup>2</sup> de *M. maximus* y del estándar de referencia [*Solanum lycopersicum* L. “Stupicképolníráné” (2C = 1,96 pg. ADN)] (Doležel *et al.*, 1992) fueron cortadas manualmente con cuchilla en forma conjunta en 1 ml de solución tampón Otto I (0,1 M ácido cítrico monohidratado, 0,5% Tween 20) (Otto, 1990). Luego de filtrar las muestras por una malla de 30 µm, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min y el sobrenadante fue eliminado teniendo la precaución de dejar 100 µl en cada tubo de 1,5 ml. Las muestras se resuspendieron en 100 µl de solución tampón Otto I con agitación suave. De esta mezcla se sacaron 50 µl y posteriormente se le agregó 125µl de solución tampón Otto II (0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O), 50 µg/ml de ioduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y 50 µg/ml de RNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El IP y la RNase se utilizaron para marcar al ADN nuclear y evitar fluorescencia del ARN de doble cadena, respectivamente. Las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, para luego ser corridas en un CMF. Los histogramas de intensidad de fluorescencia relativa (FL) fueron evaluados con el programa Flowing Software ver. 2.5.1. (Perttu Terho), descargado de la siguiente página: <http://www.flowingsoftware.com/index.php?page=31>. Los núcleos obtenidos en los histogramas de FL en la fase lineal fueron encerrados en una región y ambos picos G0/G1 del estándar y de la muestra, fueron evaluados.

Para cada genotipo se realizaron tres repeticiones, obtenidas en dos días diferentes. Esta metodología es recomendada por Doležel & Bartos, (2005) y se realiza para evitar posibles diferencias que se observan en los análisis efectuados en diferentes días (Loureiro *et al.*, 2006). El contenido de ADN nuclear relativo de las plantas se expresó mediante un índice de fluorescencia (ID) teniendo en cuenta al estándar de referencia ( $ID = 2C_{Megathyrus\ maximus} / 2C_{S.\ lycopersicum}$ ).

El valor 2C es promedio del número de veces que se analizó la muestra (n) y está expresado en picogramos (pg). Los valores fueron obtenidos por el análisis conjunto de núcleos aislados de *M. maximus* y *S. lycopersicum* (2C = 1,96 pg ADN) como estándar de referencia.

El tamaño del genoma de cada individuo en pg (2C, revisado por Greilhuber *et al.*, 2005) fue estimado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido 2C de } M. \textit{maximus} \text{ (pg)} = \frac{\text{Media del pico G0/G1 de } M. \textit{maximus}}{\text{Media del pico G0/G1 de } S. \textit{lycopersicum}} \times 1,96$$

Donde 2C es el contenido de ADN nuclear; G0/G1 es la posición media de los picos en fase de reposo (G0) y fase vacía (G1) de cada especie y 1,96 es el contenido de ADN nuclear en pg de *Solanum lycopersicum* L.

### **Análisis estadístico**

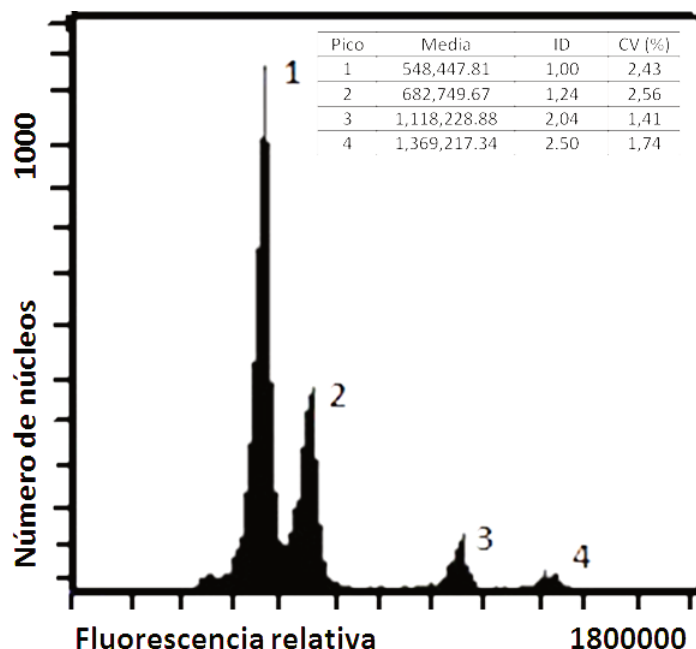
Para determinar diferencias de medias del contenido de ADN nuclear (valor 2C), se aplicó ANAVA a una vía de clasificación. Se realizó una prueba de DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) con un nivel de significancia del 5% ( $p \leq 0,05$ ) utilizando el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

## **RESULTADOS**

En la Fig. 4 se observa el histograma de intensidad de fluorescencia relativa (FL) de un material de *M. maximus* analizados en conjunto con un estándar de referencia *S. lycopersicum*. Los análisis de las muestras vegetales mostraron cuatro picos: dos representando el contenido relativo de ADN nuclear de *M. maximus* y los otros dos de *S. lycopersicum*. Los picos dominantes corresponden a los núcleos en la fase G0/G1 (contenido de ADN nuclear, 2C), mientras que los picos menores corresponden a los núcleos en la fase G2 del ciclo celular (contenido de ADN nuclear, 4C). La ausencia de solapamiento de los picos generados indica que el estándar interno fue adecuado.

Asimismo, se observó que los coeficientes de variación (CVs) de los picos generados en la fase G0/G1 fueron bajos. Para *M. maximus* el CV fue de  $3,23 \pm 0,23$  (n=28). En el análisis de CMF los CVs son importantes ya que reflejan parámetros de calidad y por lo general, se consideran como aceptables valores menores al 3% (Marie & Brown 1993) o en algunas especies difíciles  $\leq$  al 5% (Galbraith *et al.*, 2002).

El valor medio estimado de ID no fue variable, se encontraron valores que oscilan entre 1,18 (Green Panic) a 1,20 (Penquero y Mutale) (Tabla 3). El resultado del contenido de ADN nuclear (valor 2C) para cada uno de los materiales se muestran en la Tabla 4.



**Fig. 4.** Histograma de intensidad de fluorescencia relativa obtenido del análisis simultáneo de núcleos aislados de hojas de *Megathyrsus maximus* y *Solanum lycopersicum* L. “Stupicképolniráné” (2C = 1,96 pg ADN) como estándar de referencia. Los picos 1 y 2 corresponden a los núcleos en la fase G0/G1 de *S. lycopersicum* (1) y *M. maximus* (2), mientras que los picos 3 y 4 corresponden a los núcleos en la fase G2 de *S. lycopersicum* (3) y de *M. maximus* (4).

**Tabla 3.** Promedio de índice de fluorescencia (ID) para cinco genotipos de *Megathyrsus maximus*. n: número de repeticiones. E.E. error estándar.

Genotipo	ID	n	E. E.
Penquero	1,20	6	0,01
Mutale	1,20	4	0,01
Vencedor	1,19	6	0,01
Gatton	1,19	9	0,01
Green	1,18	3	0,01

El análisis estadístico no detectó diferencias significativas en los valores de ADN nuclear 2C pg ADN (Tabla 4) por lo que los cinco materiales de *M. maximus* usados en este estudio presentan el mismo nivel de ADN ploidía.

**Tabla 4.** Contenido de ADN nuclear (valor 2C) y coeficiente de variación (CV) determinado por citometría de flujo en los materiales de *Megathyrsus maximus* (Penquero, Mutale, Vencedor, Gatton Panic y Green Panic).

Genotipo	2C*(pg)	n	E. E	CV (%)	E. E
Penquero	2,36 a	6	0,01	3,52	0,21
Mutale	2,34 a	4	0,02	3,86	0,26
Vencedor	2,34 a	6	0,01	3,24	0,21
Gatton	2,34 a	9	0,01	2,76	0,18
Green	2,32 a	3	0,02	2,77	0,30

El valor 2C es promedio del número de veces que se analizó la muestra (n) y está expresado en picogramos (pg). (CV, E.E.) de la intensidad de fluorescencia de los núcleos en la fase G0/G1 de *M. maximus*. E.E. = error estándar. Medias con igual letra no son significativamente diferentes (DGC,  $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los cinco genotipos apomícticos evaluados en este estudio que se encuentran en el jardín de introducción de la Universidad Católica de Córdoba presentan igual nivel de ploidía. Los valores 2C de DNA estuvieron en un rango de 2,32-2,36 pg, en correspondencia con los resultados encontrados por Karlsson & Vasil, (1986) en esta misma especie. Asimismo, estudios realizados en *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. (pasto banderita), permitieron establecer que los materiales tetraploides tuvieron valores que concuerdan con los de este estudio (2,27 a 2,63 pg) (Quero *et al.*, 2007). Resultados similares se registraron en genotipos tetraploides de *Panicum virgatum* L. (Hopkins *et al.*, 1996). Hubo poca variación intra-específica en el contenido de ADN nuclear en los cinco genotipos evaluados; esta variación debería ser interpretada con cautela, sin considerar a éste como un cambio en el nivel de ADN ploidía, ya que esto ha sido observado en otras

gramíneas (Burson *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 1998). Es posible que las pequeñas diferencias en los valores obtenidos mediante el empleo de la técnica de citometría de flujo se deban a las diferentes metodologías aplicadas entre los laboratorios (Doležěl *et al.*, 1998). Al respecto, cuando se determina el contenido de ADN nuclear se realiza una estandarización interna con un material vegetal (estándar) de genoma conocido (Doležěl & Bartos, 2005) que en nuestro caso fue *Solanum lycopersicum* L., cuyo genoma no difirió más del doble de tamaño respecto a nuestra muestra de estudio como es indicado por Burson *et al.* (2012) para evitar solapamiento y no incurrir en errores. Otro parámetro diferente en la metodología aplicada con otros laboratorios es el fluorocromo empleado. En nuestro análisis de ploidía, utilizamos yoduro de propidio (IP), IP es un agente intercalante en la doble cadena de ADN, recomendado en la medición de ADN nuclear (Doležěl *et al.*, 1998); es uno de los reactivos de fluorescencia más utilizados en la citometría de flujo que se une al ADN mediante la intercalación entre las bases del ADN y no muestra preferencia por AT o GC. El yoduro de propidio también se une al ARN, mostrando una fluorescencia mejorada (con un color fluorescente ligeramente diferente), por lo que para la tinción nuclear agregamos RNasa al tampón. Otro fluorocromo empleado para estimar el contenido de ADN es DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Kaushal *et al.*, 2018). La solución tampón de aislamiento de núcleos es otro de los parámetros que podría causar alguna divergencia entre laboratorios (Loureiro, 2009). En nuestro caso, la liberación de los núcleos se produjo con el tampón Otto (Otto, 1990) permitiendo valores aceptables de CV menores de 4%. Similares resultados fueron obtenidos por Carloni *et al.* (2014) en *Cenchrus ciliaris* L. No obstante, en el trabajo de Kaushal *et al.* (2018) esos valores se obtuvieron con el uso de un tampón diferente.

## CONCLUSIÓN

Los materiales de *M. maximus* evaluados en este trabajo, presentaron igual nivel de ploidía y hubo poca variación intra-específica en el contenido de ADN nuclear. Se sugiere continuar con estudios citológicos en los que se pueda determinar el número cromosómico de los genotipos en estudio, ya que, aunque la citometría de flujo es un método confiable y una herramienta de investigación de uso común en la investigación genética de plantas, la citología y el recuento de

cromosomas siguen siendo los métodos más precisos para sacar conclusiones definitivas, ya que el conocimiento del nivel de ploidía de cada citotipo es de mucha importancia para la planificación y manejo de los materiales en un programa de mejoramiento genético.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Arumuganathan, K & Earle, E.D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9:208-218. <https://doi.org/10.1007/BF02672069>.

Bennett, M.D. (1987). Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist*, 106:177-200. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04689.x>.

Berthaud, J. (2001). Apomixis and the management of genetic diversity. In: Savidan Y, Carman J.G, Dresselhaus T editors. *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Mexico, DF. CIMMYT, IRD, European Comission DG VI (FAIR), 8-23. <http://hdl.handle.net/10883/588>.

Burson, B.L., Actkinson, J.M., Hussey, M.A & Jessup, R.W. (2012). Ploidy determination of buffel grass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. *South African Journal of Botany*, 79:91-95. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.12.003>.

Carlioni, E., Ribotta, A., López Colomba, E., Griffa, S., Quiroga, M., Tommasino, E., Luna, C & Grunberg, K. (2014). Somatic embryogenesis from *in vitro* anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117:311-322. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0441-4>.

Clayton, W.D & Renvoize, S.A. (1982). Graminae (Part 3). Pages 1-898 in Polhill, RM, ed. *Flora of Tropical East Africa*. Rotterdam: Balkema.

[https://books.google.com.co/books/about/Flora\\_of\\_Tropical\\_East\\_Africa\\_Gramineae.html?id=RikJAQAAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.co/books/about/Flora_of_Tropical_East_Africa_Gramineae.html?id=RikJAQAAMAAJ&redir_esc=y).

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M & Robledo, C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Doležel, J., Sgorbati, S & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow-cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85:625-631. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x>.

Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M.A., Nardi, L & Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82:17-26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a010312>.

Doležel, J & Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95:99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>.

Doležel, J., Greilhuber, J & Suda J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233-2244.

Galbraith, D.W., Lambert, G.M., Macas, J & Doležel, J. (2002). Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: *Current protocols in cytometry*. Robinson J. P., Darzynkiewicz Z., Dean P. N., Dressler L. G., Rabinovitch P. S., Stewart C.V., Tanke H. J., Wheelless L. L. Eds. New York: John Wiley & Sons, 7.6.1-7.6.22. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0706s02>.

Greilhuber J., Doležel J., Lysák M.A & Bennet M.D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size", and "C-value" to

describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 95:255-260.  
<https://doi.org/10.1093%2Faob%2Fmci019>.

Hopkins, A.A., Taliaferro, C.M & Christian, C.D. (1996). Chromosome number and nuclear DNA content of several switchgrass populations. *Crop Science*, 36:1192-1195.

<https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600050021x>.

Karlson, S.B. & Vasil, I.K. (1986). Morphology and ultrastructure of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* (guinea grass) and *Pennisetum purpureum* (Napier grass). *American Journal of Botany*, 73:894. <https://doi.org/10.2307/2444301>.

Kaushal, P., Dwivedi, K.K., Radhakrishna, A., Saxena, S., Paul, S., Srivastava, M.K., Baig, M. J., Roy, A.K & Malaviya, D. R. (2018). Ploidy dependent expression of apomixis and its components in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Euphytica*, 214:152.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-018-2232-1>.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98:679-689. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl141>.

Loureiro, J. (2009). Flow cytometric approaches to study plant genomes. *Ecosistemas*, 18:103-108.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012144011>.

Lu, K., Kaeppler, S.W., Vogel, K., Arumuganathan, K & Lee, D.J. (1998). Nuclear DNA content and chromosome numbers in switchgrass. *Great Plains Research: A Journal of Natural and Social Sciences*, 8:269-280.  
[https://digitalcommons.unl.edu/greatplainsresearch/396?utm\\_source=digitalcommons.unl.edu%2Fgreatplainsresearch%2F396&utm\\_medium=PDF&utm\\_campaign=PDFCoverPages](https://digitalcommons.unl.edu/greatplainsresearch/396?utm_source=digitalcommons.unl.edu%2Fgreatplainsresearch%2F396&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages).



Lysák, M.A & Doležel, J. (1998). Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poacea). *Caryologia*, 52:123-132. <https://doi.org/10.1080/00087114.1998.10589127>.

Marie, D & Brown, S. (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78:41-51. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90113-S](https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90113-S).

Ollitrault-Sammarcelli, E., Legave, J.M., Michaux-Ferriere, N & Hirsch, A.M. (1994). Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actmidium*. *Scientia Horticulturae*, 57:303-313. <https://doi.org/10.1016/S0304-4238%2894%2990113-9>.

Otto, F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: *Methods in cell biology*. Crissman H. A. and Darzynkiewicz Z. Eds. Academic Press Incorporated, 105-110. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60516-6).

Quero, A.R., Morales, C.R & Avendaño, C.H. (2007). Caracterización de la diversidad nativa del zacate banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], mediante su nivel de ploidía. *Técnica Pecuaria en México*, 45:263-278. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61345302>.

Savidan, Y & Pernès, J. (1982). Diploid-tetraploid-haploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution*, 36:596-600. <https://doi.org/10.2307/2408104>.

## CAPÍTULO 4

# EFECTO DE LA ONTOGENIA EN MATERIALES DE *MEGATHYRSUS MAXIMUS* SOBRE PARÁMETROS DE CALIDAD FORRAJERA Y DETERMINACIÓN DE CAMBIOS HISTOLÓGICOS DE LOS MATERIALES CONTRASTANTES

## INTRODUCCIÓN

*Megathyrsus maximus* es una pastura ampliamente utilizada como alimento forrajero para el ganado ya sea en métodos de pastoreo convencionales o en sistemas silvopastoriles (Barragán-Hernández & Cajas-Girón, 2019; Medinilla-Salinas *et al.*, 2013).

Esta gramínea tiene buena tolerancia a la sombra (Martínez-Mamian *et al.*, 2020; Morales-Velasco *et al.*, 2016) y una adecuada respuesta en asociación con leguminosas forrajeras (Martínez-Mamian *et al.*, 2020). *M. maximus* es una especie perenne de rápido crecimiento, con un buen potencial para la producción de biomasa que conduce a altas tasas de carga animal durante el verano mientras que presenta una rápida elongación de los tallos y una rápida disminución de la calidad del forraje con el avance de la madurez (Benabderrahim & Elfalleh, 2021; Carvalho *et al.*, 2022; Carnevalli *et al.*, 2021; Jayasinghe *et al.*, 2022). Por lo general, el avance de la madurez del forraje se asocia con menor producción de hojas y relación hoja/tallo, siendo los tallos componentes de menor calidad que las hojas. Sin embargo, en genotipos de *Megathyrsus* en estados juveniles, Stabile *et al.* (2010) observaron que la digestibilidad de la fibra de los tallos era mayor que la de las hojas, pero disminuía rápidamente con el avance de la madurez.

La calidad del forraje generalmente se mide por su valor nutritivo, el cual está altamente asociado con la anatomía de la hoja, su composición química, la digestibilidad de sus tejidos y el consumo voluntario por parte de los animales (Batistoti *et al.*, 2012). Anatómicamente, las hojas de las gramíneas se

caracterizan por presentar tejido vascular (compuesto por xilema y floema), tejido de sostén representado por el esclerénquima, tejido de relleno en forma de parénquima incoloro (o parénquima fundamental), tejido asimilatorio representado por clorénquima (o parénquima clorofiliano) y tejido dérmico representado por la epidermis abaxial y adaxial. Algunos tejidos con una pared gruesa y lignificada, como la vaina parenquimatososa de los haces, el esclerénquima y el xilema, pueden permanecer sin digerir incluso después de 46 horas de la ingestión, mientras que otros tejidos no lignificados muestran tasas más altas de digestión ruminal (García *et al.*, 2021; Lista *et al.*, 2020).

La anatomía vegetal cuantitativa se ha convertido en una herramienta importante para la evaluación de la calidad del forraje. Hay numerosos trabajos que utilizan este método como una contribución complementaria para evaluar el potencial de digestibilidad de los tejidos foliares, considerando que algunos tejidos son rápidamente digeribles mientras que otros perjudican la digestibilidad y el consumo. Los análisis de las proporciones entre estos tejidos podrían indicar el potencial de digestibilidad del forraje, por lo que es importante identificar las variedades de gramíneas tropicales con mayor valor nutritivo generando información que pueda ser utilizada en programas de mejora genética (Basso *et al.*, 2014; Lista *et al.* 2020; Santos *et al.*, 2014). Además, la anatomía de los órganos vegetativos aéreos (tallos y hojas), la proporción relativa de tejidos y los valores nutritivos del forraje se han mencionado por mostrar correlaciones altamente significativas con la digestibilidad del forraje (Lista *et al.*, 2020).

La lignina es un componente de las paredes celulares reconocido como el principal factor limitante de la digestión de los polisacáridos de la pared celular en el rumen. Los microorganismos que habitan el rumen de los rumiantes poseen la capacidad de digerir la celulosa, pero no la lignina (Clipes *et al.*, 2010; Marković *et al.*, 2012; Vanholme *et al.*, 2010a). Se menciona que las diferencias específicas en la lignificación de cada tejido pueden ser responsables de la baja correlación entre el contenido de lignina y la digestibilidad de la pared celular en muestras de forraje cosechadas en estados de madurez similares (He *et al.*, 2017).

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la existencia de variabilidad genética en relación al efecto de la ontogenia del cultivo sobre parámetros de calidad forrajera en materiales de *Megathyrsus maximus*, clasificar los materiales de *Megathyrsus maximus* en relación al efecto de la ontogenia del cultivo sobre la digestibilidad de la FDN de los tallos y determinar cambios

histológicos con el avance de la madurez en láminas y tallos de aquellos materiales de *Megathyrsus maximus* que resulten ser contrastantes en la digestibilidad de la FDN de los tallos.

## **Hipótesis**

La pérdida de digestibilidad de *Megathyrsus maximus* está asociada a cambios histológicos y en la composición química de la pared celular en genotipos de *Megathyrsus maximus* contrastantes en caracteres morfo-agronómicos y en la digestibilidad de la FDN en tallos.

## **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la ontogenia sobre la calidad forrajera de genotipos de *Megathyrsus maximus*, y determinar si los cambios en la calidad del forraje se acompañan de cambios en la composición histológica de tallos y láminas foliares en genotipos contrastantes.

## **Objetivos específicos**

Evaluar la existencia de variabilidad genética en relación al efecto de la ontogenia del cultivo sobre parámetros de calidad forrajera (morfología de la planta, altura, proporción hoja/tallo, composición química y la desaparición de la materia seca (DMS) y Fibra Detergente Neutra (FDN)) en materiales de *Megathyrsus maximus*.

Clasificar los materiales de *Megathyrsus maximus* en relación al efecto de la ontogenia del cultivo sobre la digestibilidad de la FDN de los tallos.

Determinar cambios histológicos con el avance de la madurez en láminas y tallos de aquellos materiales de *Megathyrsus maximus* que resulten ser contrastantes en la digestibilidad de la FDN de los tallos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las evaluaciones se realizaron en dos sitios experimentales de la provincia de Córdoba, Argentina: el campus de la Universidad Católica de Córdoba (UCC), (31°29'18" S; 64°14'33" O), y en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Manfredi, sita en Manfredi (31°51'23,5" S; 63°44'15,1" O). Los ensayos se establecieron en la época estival, en el mes de noviembre del 2018 hasta febrero del 2019.

En la tabla 5 se muestra las características climáticas y de suelo de los dos sitios experimentales: Campus de la Universidad Católica de Córdoba (UCC), el cual se llamará de ahora en adelante Córdoba y Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Manfredi, la cual se llamará Manfredi.

**Tabla 5.** Características climáticas y de suelo de los dos sitios experimentales, (Córdoba y Manfredi).

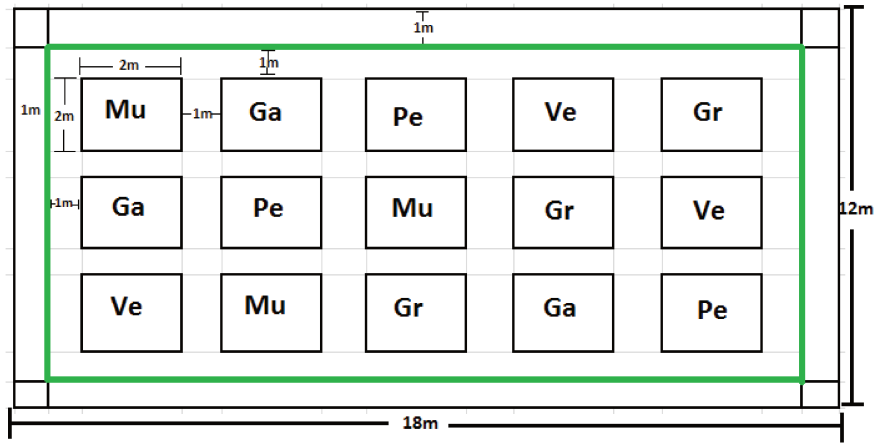
<b>Características</b>	<b>Córdoba</b>	<b>Manfredi</b>
<b>Clima</b>	Temperatura media (23,0 ° C), mínima (16,4°C) y máxima (29,6°C). Precipitación acumulada de 348 mm	Temperatura media (22,9°C), mínima (16,2°C) y máxima (29,5°C). Precipitación acumulada de 604 mm
<b>Suelo (capa de 0 a 20 cm)</b>	Suelo Haplustol éntico, pH 6,90, contenido de materia orgánica 2,88%, contenido de fósforo 41,40 ppm y de nitrógeno total 0,15%.	Suelo Haplustol éntico, pH 6,60, contenido de materia orgánica 2,17%, contenido de fósforo 50,30 ppm y de nitrógeno total 0,12%.

Se tomaron las semillas de cada uno de los genotipos evaluados y en el mes de agosto del 2018 se sembraron en macetas de 2 L y después de 15 días se pasaron a bolsas sopladas con tierra y vermiculita en proporción 2:1. Posteriormente, se pusieron a rusticar bajo invernáculo con mediasombra en el Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). Previo al trasplante, las plántulas fueron cortadas a la misma altura (20 cm). Cuando las plántulas tuvieron 50 cm se llevaron a campo, en los dos sitios experimentales, realizando anteriormente las labores culturales de arado y desmalezado, sin adición de fertilizantes químicos. El trasplante a campo se realizó en noviembre del 2018.

El diseño experimental del ensayo fue en bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones. Las parcelas consistieron en 4 m<sup>2</sup> (2 m \* 2 m) con una distancia de 0,5 m entre plantas y entre hileras con una distancia de 1 m entre parcelas. De esta manera, cada parcela quedó constituida por 25 plantas de cada genotipo dispuestas en cinco hileras con cinco plantas cada una. Se realizaron tres cortes mecánicos durante cada campaña. Se detalla en la Fig. 6 el diseño experimental con la disposición de las unidades experimentales según el diseño mencionado. Las plantas fueron regadas sólo al momento del trasplante. Los ensayos fueron desmalezados cada 30 días después del trasplante, de manera manual.

En la Fig. 7 se presentan fotos de la implantación y seguimiento de las parcelas. La etapa fenológica de cada corte fue: vegetativa para 35 días después del trasplante (DDT), prefloración para 70 DDT y la etapa reproductiva para 105 DDT. Teniendo en cuenta que los genotipos habían acumulado 300 grados días (GDA) para el primer corte, 600 GDA para el segundo corte y 900 GDA para el tercer corte.

Las temperaturas del sitio se registraron cada treinta minutos con un *data logger* para calcular los grados días como un promedio de todos los valores registrados y considerando una temperatura base de 15°C.



**Fig. 6.** Diseño experimental con los cinco genotipos de *Megatyrus maximus* (Vencedor (VE), Green Panic (GR), Gatton Panic (GA), Penquero (PE) y Mutale (MU)).



**Fig. 7.** Implantación, seguimiento y muestreo de ensayos a campo. A. Implantación de ensayo. B. Riego y desmalezado de parcelas. C. Muestreo de altura de plantas en los ensayos.

### VARIABLES MORFO-AGRONÓMICAS

Las variables morfo-agronómicas medidas en cada corte fueron las siguientes: altura total de planta (AP) (cm) medida desde la base hasta el extremo de la planta en el tallo principal, y número de hojas por macollo del tallo principal (HM) (N°). Las plantas se cortaron de forma mecánica y se pesaron en balanza (KRETZ AUS EB30B, Santa Fe, Argentina) determinando el peso fresco (PF) (g). Posteriormente, las muestras fueron llevadas a estufa de aire forzado (INTER UIF797, Ojalvo, Argentina) a 60°C durante tres días para establecer el peso seco (PS) (g) de cada planta.

Por otra parte, se estableció el largo de lámina (LL) (cm), ancho de lámina (AL) (cm) en el sector medio de la lámina y el área total de lámina (ATL) (cm<sup>2</sup>). Para ello, se tomaron imágenes de la cuarta lámina de tres plantas por genotipo,

por bloque y para cada momento de corte y sitio experimental. Las mediciones se llevaron a cabo con el programa HOJA de distribución gratuita (Verga, 2015).

### **Parámetros de calidad forrajera**

Para la determinación de parámetros de calidad forrajera en los diferentes estados ontogénicos (tres cortes) de las plantas colectadas se separaron las láminas, los tallos+vainas, y las inflorescencias (Batistoti *et al.*, 2012). Se estimó la relación lámina/tallo (láminas/tallos+vainas) (L/ T) y la proporción de láminas (láminas / (láminas+tallos+vainas) (PL)) en aproximadamente 200g de materia seca. Posteriormente, cada parte vegetal (láminas y tallos+vainas) por separado fue procesada en molino Willey (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA) a 2 mm.

Las variables químicas medidas según la metodología propuesta por ANKOM (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU.) fueron: Fibra detergente ácida secuencial (FDA) (%) (ANKOM, 2014a), Fibra detergente Neutra con amilasa y por duplicado (FDN) (%) (ANKOM, 2014b; AOAC, 2002) sin sulfito de sodio (Hintz *et al.*, 1996; Van Soest *et al.*, 1991), Lignina Detergente Ácida con ácido sulfúrico, libre de cenizas (LDA) (%) (ANKOM, 2013), Cenizas (CEN) y desaparición *in situ* de la materia seca (DMS) (%). Los resultados de estas variables medidas se utilizaron para la calibración de las curvas de espectroscopía de la técnica de infrarrojo cercano (NIRS).

### **Técnica de infrarrojo cercano (NIRS)**

Muestras de láminas y tallos de los cinco genotipos fueron analizadas por espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS). Esta técnica se basa en la quimiométrica, la cual combina la espectroscopia, la estadística y la computación para desarrollar modelos matemáticos (Jiménez, 2007). Se constituyó un conjunto de calibraciones de muestras que involucraron diferentes etapas fenológicas, condiciones agroecológicas y accesiones de especies subtropicales, como *Cenchrus ciliaris*, *Chloris gayana* (Juan *et al.*, 2012; Juan *et al.*, 2020) y de muestras de tallos y hojas de los resultados de los análisis nutricionales tradicionales (química húmeda) de *Megathyrus maximus*. La absorción de radiación en infrarrojo cercano de cada muestra se recogió por duplicado con un equipo FOSS DS-2500, modo reflectancia, rango 400-2500 nanómetros con



mediciones cada 0,5 nm. Las calibraciones se desarrollaron con el software WINISI IV utilizando Cuadrados Mínimos Parciales Modificados, previa aplicación de tratamientos matemáticos (derivadas, suavizado y corrección por tamaño de partículas) y selección del rango espectral más adecuado (Juan *et al.*, 2020). Los valores de correlación de pendiente y coeficiente (entre paréntesis) entre la química húmeda y el análisis NIRS para NDF, ADL y DMD fueron 0,991 (0,97), 0,992 (0,98), 0,999 (0,98), respectivamente (Juan *et al.*, 2012; Juan *et al.*, 2020). Los resultados que se muestran en este trabajo son los obtenidos por el análisis NIRS, debido a las altas correlaciones con los valores de los análisis nutricionales tradicionales.

### **Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS) y de la fibra detergente neutra (dFDN)**

El procesamiento de estas muestras fue realizado en el Laboratorio de Forrajes de la EEA INTA Rafaela. Las muestras seleccionadas para el análisis fueron los tallos del corte uno y tres. Se eligieron dos cortes porque eran los más contrastantes entre los cultivares teniendo en cuenta las observaciones morfo-agronómicas y de calidad forrajera evaluadas en los dos sitios experimentales. La ivDMS y la dFDN de muestras de tallo se determinaron por el método ANKOM (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU.). Se colocaron aproximadamente 500 mg de cada muestra en la bolsa de filtro (F57; 50 × 55 mm; Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU.), que luego fueron selladas con calor. Las muestras se trataron con acetona durante 5 minutos y se secaron al aire a peso constante, luego se pusieron en bolsas y se incubaron en incubadora Daisy II (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU.) durante 48 h a 39°C. El contenido de rumen se recogió antes de la alimentación de la mañana de dos vacas equipadas con una cánula ruminal. Los animales fueron alimentados con dietas estándar para cumplir con sus requisitos de mantenimiento. Después de purgar con CO<sub>2</sub>, el contenido de rumen extraído de los animales se transportó al laboratorio en un termo, y fue filtrado a través de cuatro capas de tela de queso, mezclada, nuevamente purgada. Finalmente, el contenido de rumen final se vertió a los frascos, previamente llenos de una mezcla calentada (39°C). El equipo Daisy II giró los frascos continuamente en la cámara de incubación. Después de la incubación, los frascos se drenaron y las bolsas se enjuagaron bien con agua fría. Luego se realizó una extracción con una solución de detergente

neutral (DN; Goering & Van Soest, 1970) durante 1 hora a 100°C, en el equipo ANKOM 220 Fiber Analyzer (tecnología Ankom (ANKOM Technology Corporación, Fairport, NY, EE. UU.). Las bolsas con residuos nuevamente se enjuagaron suavemente en agua fría, se secaron en una estufa durante 4 h a 100°C y se pesaron. La DMS se calculó como la materia seca que desapareció del peso inicial y el resultado final fue la media de dos réplicas. Este proceso permite remover restos microbianos y algunos remanentes de fracciones solubles, para obtener resultados en términos de digestibilidad *in vitro* de la materia seca, los que se consideran como estimativos de la digestibilidad real de los alimentos (ANKOM, 2023).

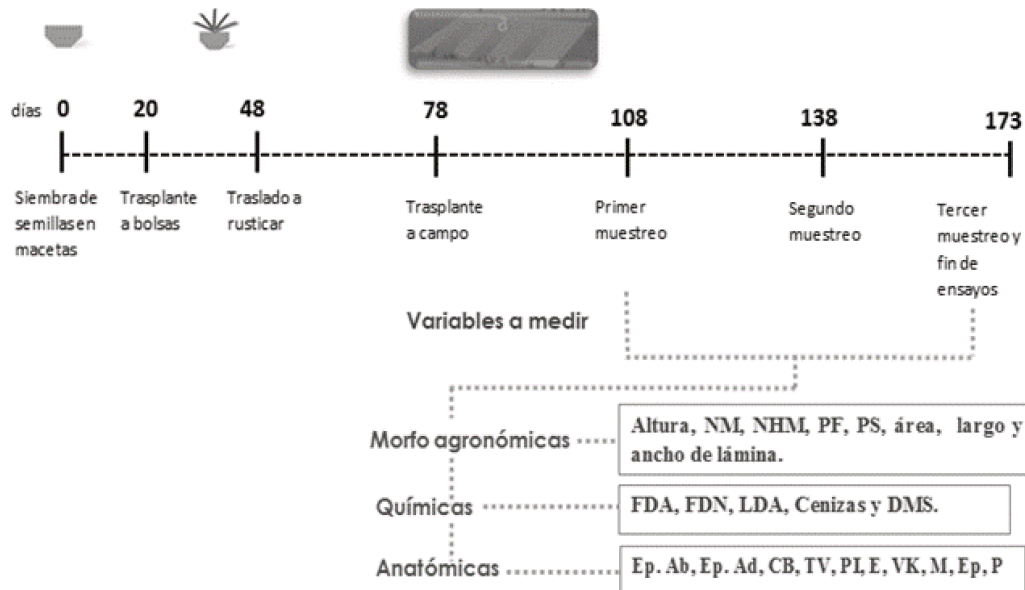
### **Técnica de cortes histológicos**

Se llevó a cabo análisis histológicos en Vencedor y Green Panic basado en el comportamiento contrastante de las variables largo, ancho y área de lámina, y de las variables FDN, LDA y DMS, en láminas y tallos.

Las observaciones de los cortes histológicos fueron realizadas según Carloni *et al.*, (2014). Segmentos de 2 cm desde la base de la tercera hoja completamente expandida y segmentos de 4 cm al nivel del cuarto entrenudo del tallo principal fueron fijados en FAA (50% etanol, 35% agua, 10% formaldehído, 5% ácido acético glacial) por 48 h. Posteriormente, fueron transferidos a etanol 70% (v/v) para su almacenamiento (Ruzin, 1999). Las muestras conservadas en etanol 70% se lavaron con H<sub>2</sub>O, se colocaron en ácido fluorhídrico al 5% durante 48 h y luego se enjuagaron con H<sub>2</sub>O (5 cambios de 20 min c/u). Posteriormente, las mismas fueron deshidratadas en una serie de diluciones de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% v/v) e incluidas en parafina siguiendo la técnica convencional de D`Ambrogio de Argüesio (1986). Las secciones de 15 µm de grosor para láminas y 25-40 µm para tallos obtenidas con un microtomo rotativo (Modelo Accu-Cut® SRM 200 CW), se tiñeron con Safranina y *Fast Green* (1%) y se observaron bajo microscopio confocal Nikon Eclipse TI. Las imágenes, amplificadas a ×10 y ×20 se analizaron empleando el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) (Schneider *et al.*, 2012). Las mediciones se realizaron en muestras correspondientes al corte uno y corte tres para láminas y tallos, en tres repeticiones biológicas (tres secciones transversales por muestra). Para realizar las mediciones y establecer la proporción de tejido relativo de la epidermis adaxial (Ep.Ad), la epidermis abaxial (Ep.Ab), el tejido vascular (TV),

el parénquima incoloro (PI), el esclerénquima (Es), la vaina de kranz (VK), las células buliformes (CB) y el clorénquima (C) se tuvieron en cuenta en el caso de láminas, dos haces vasculares, ambos situados en la parte adyacente a la nervadura central, y para tallos se midió en una porción triangular desde la epidermis hacia la parte central.

En la Fig. 8 se muestra una línea de tiempo donde se detalla desde el momento de la siembra hasta el final del ciclo con las variables medidas en cada fecha de corte.



**Fig. 8.** Línea de tiempo desde la siembra hasta el último muestreo y variables medidas en genotipos de *Megathyrus maximus* (2018-2019).

## Análisis estadístico

Todas las variables agronómicas, nutricionales, morfológicas e histológicas se evaluaron mediante un análisis de varianza de tres vías (ANOVA): los factores principales fueron "genotipo", "sitio" y "corte". Se probó evidencia de una distribución normal y la homogeneidad de las variaciones (Levene, 1960; Shapiro & Wilk, 1965) antes del análisis. En este modelo los genotipos, los sitios y el corte fueron factores fijos, mientras que las repeticiones (bloques) fueron factores aleatorios.

Las diferencias entre las medias se evaluaron utilizando la prueba de comparación múltiple DGC (Di Rienzo, Guzmán & Casanoves, 2002). El análisis se realizó utilizando el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

## RESULTADOS

### Variables morfo-agronómicas

El análisis estadístico de las variables agronómicas mostró diferencias significativas en la interacción triple (genotipo\*sitio \*corte) para altura de planta (AP) ( $p=0,0001$ ), número de hojas por macollo principal (HM) ( $p=0,0336$ ) y Peso Seco (PS) ( $p=0,0066$ ) (Tabla 6). En relación a la variable AP, Mutale fue el genotipo que presentó menor altura en el primer corte para Manfredi (109,4 cm) mientras que Vencedor fue el más alto para el tercer corte en Córdoba (253,4 cm). Con respecto HM, los genotipos que mostraron mayor número fueron Gatton Panic y Penquero para el tercer corte en Manfredi. Mutale para el segundo y tercer corte de Manfredi (10,0 y 9,4, respectivamente) y tercer corte en Córdoba (10,2), mientras que Vencedor presentó el menor número en el primer corte para Manfredi y Córdoba (2,4 y 2,7, respectivamente) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Valores promedios y error estándar para las variables altura de planta, número de hojas por macollo principal y peso seco en cinco genotipos de *Megatyrsus maximus* (Vencedor (VE), Green Panic (GR), Gatton Panic (GA), Penquero (PE) y Mutale (MU)) en tres fechas de corte en los dos sitios experimentales (Córdoba y Manfredi).

<b>CÓRDOBA</b>				
	<b>Genotipo</b>	<b>Corte 1</b>	<b>Corte 2</b>	<b>Corte 3</b>
<b>Altura (cm)</b>	<b>GA</b>	170,8±3,7 D	220,8±3,9 F	208,1±3,9 F
	<b>GR</b>	165,8±3,7 D	183,2±3,7 E	182,3±3,7 E
	<b>VE</b>	119,9±3,7 B	206,2±3,7 F	253,4±3,9 H
	<b>PE</b>	173,6±3,7 D	213,1±3,7 F	204,8±3,7 F
	<b>MU</b>	128,7±3,7 B	238,6±3,7 G	227,9±3,7 G
<b>Número de hojas/ macollo principal</b>	<b>GA</b>	5,0±0,5 B	6,4±0,6 B	9,0±0,6 C
	<b>GR</b>	4,3±0,7 B	6,3±0,5 B	8,0±0,5 C
	<b>VE</b>	2,7±0,5 A	4,7±0,5 B	7,9±0,6 C
	<b>PE</b>	4,6±0,5 B	6,1±0,5 B	8,4±0,5 C
	<b>MU</b>	3,8±0,5 B	6,1±0,5 B	10,2±0,5 D
<b>Peso seco (g)</b>	<b>GA</b>	163,4±17,0 B	307,2±18,1 C	292,7±17,0 C
	<b>GR</b>	123,6±17,0 A	231,2±17,0 C	206,3±17,0 B
	<b>VE</b>	78,8±17,0 A	235,4±18,1 C	376,9±19,3 D
	<b>PE</b>	136,7±17,0 A	315,09±17,0 C	264,7±18,1 C
	<b>MU</b>	114,2±17,0 A	289,9±17,0 C	360,8±17,0 D
<b>MANFREDI</b>				
	<b>Genotipo</b>	<b>Corte 1</b>	<b>Corte 2</b>	<b>Corte 3</b>
<b>Altura (cm)</b>	<b>GA</b>	163,4±3,7 D	205,7±3,7 F	215,6±3,9 F
	<b>GR</b>	152,2±4,5 C	180,4±5,0 E	181,7±5,0 E
	<b>VE</b>	125,4±3,7 B	202,4±3,7 F	239,8±3,9 G
	<b>PE</b>	161,6±3,7 D	212,6±3,9 F	216,6±3,9 F
	<b>MU</b>	109,4±3,7 A	205,9±4,2 F	231,0±3,9 G
<b>Número de hojas/ macollo principal</b>	<b>GA</b>	6,8±0,5 B	7,6±0,6 C	11,0±0,6 D
	<b>GR</b>	5,5±0,5 B	8,6±0,7 C	8,8±0,7 C
	<b>VE</b>	2,4±0,5 A	5,6±0,5 B	8,3±0,6 C
	<b>PE</b>	5,9±0,5 B	8,7±0,6 C	11,3±0,6 D
	<b>MU</b>	4,0±0,5 B	10,0±0,6 D	9,4±0,6 D
<b>Peso seco (g)</b>	<b>GA</b>	123,1±17,0 A	197,5±17,0 B	327,8±17,0 C
	<b>GR</b>	99,5±20,8 A	183,9±20,8 B	262,6±20,8 C
	<b>VE</b>	80,1±17,0 A	252,4±17,0 C	373,3±17,0 D
	<b>PE</b>	113,2±17,0 A	241,9±17,0 C	312,0±18,1 C
	<b>MU</b>	81,3±17,0 A	203,9±18,1 B	271,2±18,1 C

Nota: Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para la interacción triple o de tres vías (genotipo \* corte\* sitio).

En cuanto a PS presentaron los mayores valores Vencedor para el tercer corte en Córdoba y Manfredi (376,9 y 373,3g, respectivamente) y Mutale para el tercer corte en Manfredi (360,8g). A diferencia de esto, los menores pesos se observaron en el primer corte para todos los genotipos (rango entre 78,8g -136,7g) sin diferencias significativas entre ellos con excepción del cultivar Gatton Panic en el primer corte en Córdoba que tuvo un peso promedio de 163,4g. El análisis estadístico de las variables relación lámina/tallo (L/T) y porcentaje de láminas mostró diferencias altamente significativas ( $p<0,0001$ ) en la interacción doble genotipo\*corte. Al respecto, para L/T, Vencedor y Mutale en el primer corte tuvieron los valores más elevados mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos (5,4 y 1,4, respectivamente) (Tabla 7). En relación a PL, Vencedor tuvo el mayor porcentaje de láminas (82,4%) mientras que Green Panic, Gatton Panic y Penquero, en el segundo y tercer corte presentaron los menores valores sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos (valores comprendidos entre 18,4 y 22,3%) (Tabla 7).

Las variables ancho, largo y área de lámina presentaron diferencias altamente significativas ( $p<0,0001$ ) en la interacción doble (genotipo\*corte). Para la variable ancho de lámina, Vencedor en el corte tres tuvo los mayores valores (2,3 cm) mientras que los genotipos con menores valores fueron Green en el corte tres (1,5 cm) y corte uno (1,6 cm) (Tabla 7). En relación a largo de lámina, Vencedor en el corte tres tuvo los mayores valores mientras que los menores valores se presentaron en Green Panic para el corte tres (26,9 cm) y para el corte dos (29,4 cm) (Tabla 7). Con respecto al área de la lámina, Vencedor en el segundo y tercer corte (76,2 y 103,3 cm, respectivamente) tuvo los valores más altos mientras que los menores valores correspondieron a Green Panic en el corte uno (29,2 cm), corte dos (34,4 cm) y corte tres (32,9 cm), a Gatton Panic, Penquero, Mutale y Vencedor en el corte uno (31,6, 34,7, 35,4, y 36,0 cm, respectivamente).

**Tabla 7.** Valores promedio y error estándar para largo, ancho y área de lámina, relación láminas/tallo y porcentajes de láminas foliares en cinco genotipos de *Megatyrsus maximus* (Vencedor (VE), Green Panic (GR), Gatton Panic (GA), Penquero (PE) y Mutale (MU)) evaluados en tres fechas de corte en dos sitios experimentales (Córdoba y Manfredi).

Variabes	Genotipos	Corte 1	Corte 2	Corte 3
<b>Largo de lámina (cm)</b>	GA	33,0±1,0 B	34,1±1,1 B	32,8±1,1 B
	GR	35,2±1,2 B	29,4±1,1 A	26,9±1,0A
	VE	37,5±1,2 C	55,6±1,1 D	61,8±1,3 E
	PE	34,9±1,0 B	32,3±1,0 B	33,5±1,0 B
	MU	36,9±1,1 C	39,3±1,1 C	38,3±1,1 C
<b>Ancho de lámina (cm)</b>	GA	1,7±0,1 B	2,0±0,1 C	1,7±0,1 B
	GR	1,6±0,1 A	1,7±0,1 B	1,5±0,1 A
	VE	1,7±0,1 B	2,0±0,1 C	2,3±0,1 D
	PE	1,7±0,1 B	1,8±0,1 B	1,7±0,1 B
	MU	1,6±0,1 A	1,9±0,1 C	1,9±0,1 C
<b>Área de lámina(cm<sup>2</sup>)</b>	GA	31,6±2,1 A	47,1±2,1 B	43,8±2,2 B
	GR	29,2±2,3 A	34,4±2,1 A	32,9± 2,1 A
	VE	36,0±2,3 A	76,2±2,1 D	103,3±2,7 D
	PE	34,7±2,1 A	39,6±2,1 B	44,0±2,1 B
	MU	35,4±2,0 A	54,2± 2,1 C	59,1± 2,2 C
<b>Relación lámina/tallo</b>	GA	0,6±0,3 A	0,3±0,3 A	0,2±0,3 A
	GR	0,5±0,3 A	0,2±0,1 A	0,2±0,3 A
	VE	5,4±0,3 C	0,8±0,3 A	0,5±0,3 A
	PE	0,6±0,3 A	0,3±0,3 A	0,2±0,3 A
	MU	1,4±0,3 B	0,4±0,3 A	0,4±0,3 A
<b>Porcentaje de láminas (%)</b>	GA	37,3±2,5 C	20,9±2,5 A	18,9±2,5 A
	GR	30,6±2,7 B	18,9±2,7 A	18,4±2,7 A
	VE	82,4±2,5 F	43,3±2,5 D	34,3±2,5 C
	PE	35,4±2,5 C	22,3±2,5 A	18,9±2,5 A
	MU	56,4±2,5 E	28,3±2,5 B	25,16±2,5 B

Nota: Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para la interacción doble (genotipo \* corte).

### Variabes de calidad forrajera

Para láminas foliares, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para la interacción de dos vías (genotipo \* corte) en todas las variables analizadas, sólo se observaron diferencias significativas entre cortes ( $p \leq 0,05$ ). El mayor porcentaje de FDN se presentó en Vencedor para el tercer corte (67,5%) y los valores más bajos se observaron en el primer corte para todos los genotipos en un rango de 57,6%-58,9%, sin diferencias estadísticas entre ellos (Tabla 8). Para la variable FDA, Vencedor mostró el valor más alto (32,5%) en el tercer corte mientras que los valores más bajos se observaron en el primer corte para todos los genotipos en

un rango de 23,1%-24,1% sin diferencias estadísticas entre ellos. En cuanto a LDA, Vencedor tuvo los porcentajes más altos para segundo y tercer corte (4,2% y 4,2%, respectivamente) mientras que el genotipo con menor valor fue Penquero para el primer corte (2,3%); Green Panic, Gatton Panic y Vencedor se mantuvieron sin cambios y sin diferencias estadísticas entre ellos. En relación a DMS, Vencedor tuvo el valor más bajo en el tercer corte (64,1%) mientras que los valores más altos se observaron en el primer corte en un rango de 72,3% - 76,1% en todos los genotipos (Tabla 8).



**TABLA 8.** Valores promedio y error estándar expresados en porcentaje para fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), lignina detergente ácida (LDA) y desaparición en materia seca (DMS) de láminas foliares en cinco genotipos de *M. maximus* (Vencedor (VE), Green Panic (GR), Gatton Panic (GA), Penquero (PE) y Mutale (MU)) evaluados en tres fechas de corte en dos sitios experimentales (Córdoba y Manfredí).

<b>Variables nutricionales</b>	<b>Genotipos</b>	<b>Corte 1</b>	<b>Corte 2</b>	<b>Corte 3</b>
<b>FDN</b>	GA	57,9±0,8 A	62,0±1,0 B	64,7±1,0 C
	GR	58,4±1,2 A	60,7±1,0 B	65,1±1,0 C
	VE	57,6±1,0 A	62,9±1,0 C	67,5±1,0 D
	PE	58,9±1,0 A	61,4±1,0 B	65,8±1,0 C
	MU	58,2±1,0 A	61,9±1,0 B	63,9±1,0 B
<b>FDA</b>	GA	23,1±0,7 A	27,1±0,9 B	27,8±1,0 B
	GR	24,0±1,0 A	26,2±0,9 B	28,2±1,0 B
	VE	23,4±0,9 A	29,5±0,9 B	32,5±1,0 C
	PE	23,9±0,9 A	27,5±0,9 B	28,9±1,0 B
	MU	24,1±0,9 A	27,9±0,9 B	29,1±1,0 B
<b>LDA</b>	GA	2,7±0,2 B	3,2±0,2 B	3,0±0,2 B
	GR	2,8±0,2 B	2,8±0,2 B	3,2±0,2 B
	VE	3,3±0,2 B	4,2±0,2 C	4,2±0,2 C
	PE	2,3±0,2 A	3,2±0,2 B	3,3±0,2 B
	MU	2,8±0,2 B	3,4±0,2 B	3,0±0,2 B
<b>DMS</b>	GA	75,4±1,1 C	73,8±1,3 C	68,7±1,3 B
	GR	75,3±1,6 C	73,5±1,3 C	68,1±1,3 B
	VE	72,3±1,3 C	68,1±1,3 B	64,1±1,3 A
	PE	76,1±1,3 C	73,4±1,3 C	66,6±1,3 B
	MU	75,9±1,3 C	73,9±1,3 C	70,2±1,3 B

Nota: Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre cortes ( $p \leq 0,05$ ) cuando la interacción de dos vías (genotipo \* corte) no fue significativa.

Para tallos, hubo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para la interacción de tres vías (genotipo \* sitio \* corte) en FDN ( $p=0,0226$ ) y LDA ( $p=0,0095$ ) (Tabla 9) mientras que se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para la interacción de dos vías (genotipo \* corte) en FDA ( $p < 0,0001$ ) y DMS ( $p=0,0002$ ) (Tabla 10). A medida que se alcanzó la madurez se observaron valores más altos de FDN. Los valores más altos se presentaron en Vencedor y Mutale con un valor de 82,7% en el tercer corte en Córdoba, mientras que el valor más bajo se presentó en el primer corte en Vencedor y Mutale (68,2% y 69,23% en Córdoba y Manfredí, respectivamente).

**TABLA 9.** Valores promedio y error estándar expresados en porcentaje para fibra detergente neutra (FDN) y lignina detergente ácida (LDA) de tallos en cinco genotipos de *M. maximus* (Vencedor (VE), Green Panic (GR), Gatton Panic (GA), Penquero (PE) y Mutale (MU)) evaluados en tres fechas de corte en los dos sitios experimentales (Córdoba y Manfredi).

<b>CÓRDOBA</b>				
<b>Variables nutricionales</b>	<b>Genotipos</b>	<b>Corte 1</b>	<b>Corte 2</b>	<b>Corte 3</b>
<b>FDN</b>	<b>GA</b>	71,5±0,8 b	80,3±0,8 d	80,9±0,8 d
	<b>GR</b>	72,7±0,8 b	80,1±1,0 d	81,7±0,8 d
	<b>VE</b>	68,2±0,8 a	78,0±0,8 d	82,7±0,8 d
	<b>PE</b>	71,7±0,8 b	80,2±0,8 d	80,5±0,8 d
	<b>MU</b>	70,8±1,0 b	80,6±0,8 d	82,7±0,8 d
<b>LDA</b>	<b>GA</b>	5,5±0,3 a	6,8±0,2 c	7,2±0,2 c
	<b>GR</b>	6,0±0,2 b	7,0±2,6 c	7,3±0,2 c
	<b>VE</b>	5,2±0,2 a	5,9±0,2 b	8,2±0,2 e
	<b>PE</b>	5,4±0,2 a	7,1±0,2 c	6,5±0,2 c
	<b>MU</b>	5,1±0,2 a	6,8±0,2 c	7,5±0,2 d
<b>MANFREDI</b>				
<b>Variables nutricionales</b>	<b>Genotipos</b>	<b>Corte 1</b>	<b>Corte 2</b>	<b>Corte 3</b>
<b>FDN</b>	<b>GA</b>	73,0±0,8 b	80,8±0,8 d	78,2±0,8 d
	<b>GR</b>	73,3±1,0 b	81,0±1,0 d	79,0±1,0 d
	<b>VE</b>	75,6±0,8 c	79,4±0,8 d	78,6±0,8 d
	<b>PE</b>	73,3±0,8 b	80,9±0,8 d	78,6±0,8 d
	<b>MU</b>	69,3±0,8 a	78,6±0,8 d	78,4±0,8 d
<b>LDA</b>	<b>GA</b>	5,1±0,2 a	7,8±0,2 d	8,4±0,2 e
	<b>GR</b>	5,2±2,6 a	7,1±0,2 c	7,7±0,3 d
	<b>VE</b>	5,4±0,2 a	6,7±0,2 c	8,4±0,2 e
	<b>PE</b>	5,2±0,2 a	7,7±0,2 d	8,5±0,2 e
	<b>MU</b>	5,4±0,2 a	6,9±0,2 c	8,5±0,2 e

Nota: Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la interacción de tres vías (genotipo \* corte\* sitio).

En cuanto a la FDA, los valores más altos se observaron en Vencedor y Mutale en el tercer corte (52,4 y 51,4%, respectivamente) mientras que los valores más bajos se presentaron en el primer corte para todos los genotipos en el rango de 41,0% - 43,1% (Tabla 10).

Con respecto a LDA, los valores más altos se observaron para el tercer corte en Vencedor (8,2%) en Córdoba y Mutale (8,4%), Gatton (8,4%), Penquero (8,5%) y Mutale (8,5%) en Manfredi, sin diferencias estadísticas entre ellos. Los genotipos con los porcentajes más bajos estuvieron en un rango de 5,1%-5,5% en el primer corte. Para DMS, a medida que se alcanzó la madurez se observaron los menores valores, los cuales oscilaron entre 47,4%-50,6%, mientras que el valor más alto se observó en el primer corte en Mutale (71,3%) (Tabla 10).

**TABLA 10.** Valores promedio y error estándar expresados en porcentaje para fibra detergente ácida (FDA) y desaparición de materia seca (DMS) de tallos en cinco genotipos de *M. maximus* (Vencedor (VE), Green Panic (GR), Gatton Panic (GA), Penquero (PE) y Mutale (MU)) evaluados en tres fechas de corte en los dos sitios experimentales (Córdoba y Manfredi).

<b>Variables nutricionales</b>	<b>Genotipos</b>	<b>Corte 1</b>	<b>Corte 2</b>	<b>Corte 3</b>
<b>FDA</b>	<b>GA</b>	42,7±0,6 A	49,5±0,6 B	49,2±0,6 B
	<b>GR</b>	42,3±0,6 A	49,0±0,7 B	49,9±0,6 B
	<b>VE</b>	41,2±0,6 A	48,2±0,6 B	52,4±0,6 C
	<b>PE</b>	43,1±0,6 A	50,2±0,6 B	48,8±0,6 B
	<b>MU</b>	41,0±0,6 A	49,6±0,6 B	51,4±0,6 C
<b>DMS</b>	<b>GA</b>	67,9±0,9 E	50,2±0,9 A	47,4±0,9 A
	<b>GR</b>	64,8±1,0 D	49,2±1,1 A	47,6±1,0 A
	<b>VE</b>	67,8±0,9 E	58,0±0,9 C	48,5±0,9 A
	<b>PE</b>	68,1±0,9 E	50,6±0,9 A	48,2±0,9 A
	<b>MU</b>	71,3±1,0 F	54,5±0,9 B	48,3±0,9 A

Nota: Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre cortes ( $p \leq 0,05$ ) en la interacción de dos vías (genotipo \* corte).

### **Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS) y de la fibra detergente neutra (dFDN)**

El análisis estadístico mostró que no hubo interacción significativa entre genotipo y corte (G\*C), sin embargo, se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre genotipos. Los genotipos con mayor porcentaje de dFDN fueron: Mutale (41,3%), Vencedor (41,1%), Penquero (33,2%) y Gatton Panic (32,2%) para el corte uno sin observarse diferencias significativas entre los mismos. Por otro lado, Green Panic para el primer y tercer corte mostró los menores porcentajes de dFDN, los cuales fueron de 18,5% y 21,0% junto con Vencedor (24,0%),

Penquero (24,4%), Gatton Panic (24,9%) y Mutale (28,1%) para el corte tres, sin diferencias estadísticas entre ellos ( $p>0,05$ ) (Tabla 11). En cuanto a la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS) los genotipos con mayor porcentaje fueron Mutale (74,1%), Vencedor (72,9%), Penquero (62,2%) y Gatton Panic (59,6%), sin diferencias estadísticas entre ellos ( $p>0,05$ ). En contraste a esto, los genotipos con menor porcentaje fueron Green Panic en el corte dos (45,9%) junto a Vencedor (43,7%), Gatton Panic (47,2%), Penquero (48,3%), Mutale (49,9%) y Green Panic (42,2%) en el corte tres, sin diferencias estadísticas entre ellos ( $p>0,05$ ) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Valores promedio y error estándar para las variables digestibilidad de la fibra detergente neutra (dFDN) (%) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS) (%) en tallos de cinco genotipos de *Megathyrus maximus* (Vencedor (VE), Green Panic (GR), Gatton Panic (GA), Penquero (PE) y Mutale (MU)) evaluados en dos fechas de corte (corte 1 y corte 3) en los dos sitios experimentales (Córdoba y Manfredi).

Variables nutricionales	Genotipos	Corte 1	Corte 3
dFDN (105°)	GA	32,2±4,7 B	24,9±3,3 A
	GR	18,5±4,7 A	21,0±3,3 A
	VE	41,1±3,3 B	24,0±3,3 A
	PE	33,2±3,3 B	24,4±3,3 A
	MU	41,3±3,3 B	28,1±3,3 A
ivDMS (105°)	GA	59,6±5,1 B	47,2±3,6 A
	GR	45,9±5,1 A	42,2±3,6 A
	VE	72,9±3,6 B	43,7±3,6 A
	PE	62,2±3,6 B	48,3±3,6 A
	MU	74,1±3,6 B	49,9±3,6 A

Nota: Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ) para la interacción de dos vías (genotipo \* corte).

Los genotipos evaluados en este estudio disminuyeron dFDN y, en consecuencia, ivDMS en tallos con el avance de la etapa fenológica, a excepción del genotipo Green Panic. Cabe señalar que Vencedor exhibió cambios más significativos en las variables nutricionales FDN, LDA y DMS, con el avance de la etapa fenológica. Estos parámetros nos permitieron clasificar a los genotipos y determinar que los contrastantes fueron Green Panic y Vencedor.

## **Variables anatómicas**

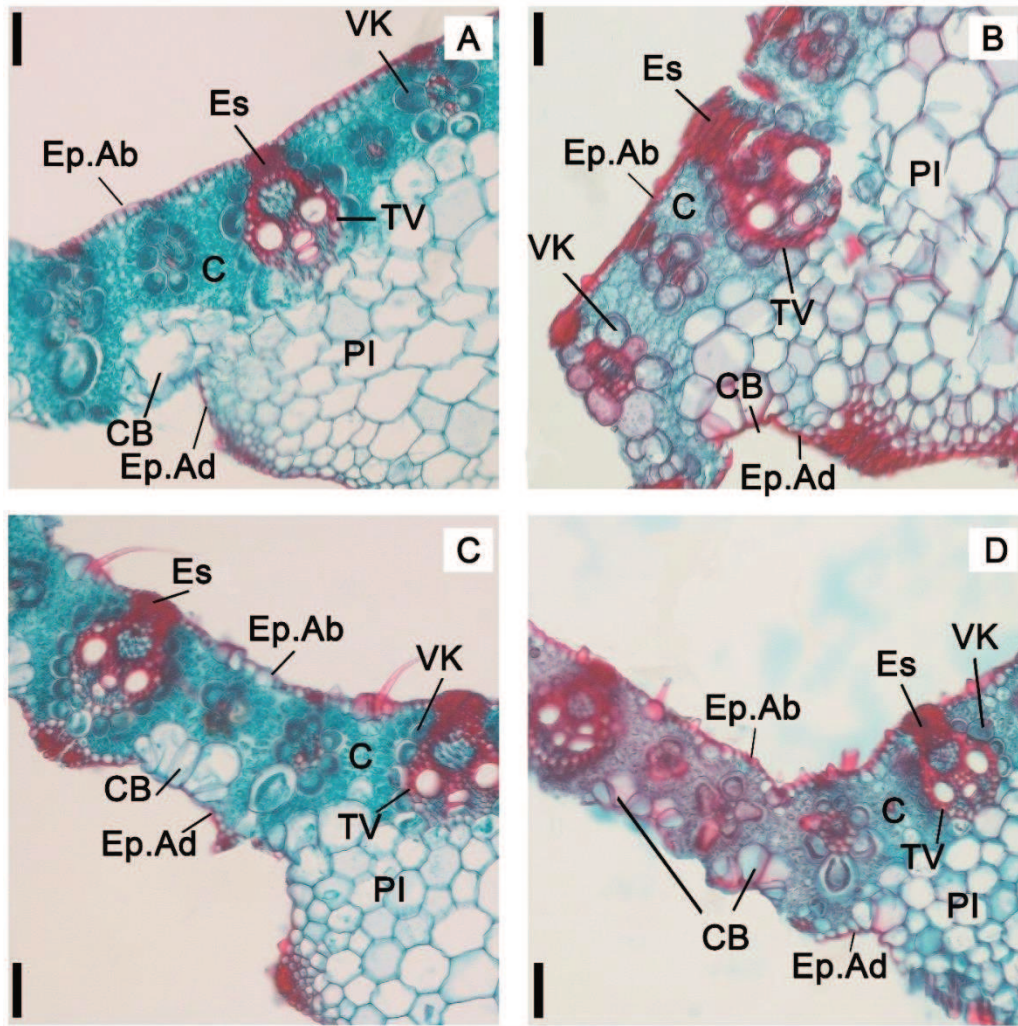
El porcentaje promedio y el error estándar para los parámetros anatómicos medidos (áreas de tejido vascular, esclerénquima, células buliformes, vaina de Kranz, parénquima incoloro, clorénquima y epidermis) se muestran en la Tabla 12. Los resultados corresponden al sitio de Manfredí, siguiendo la misma tendencia los obtenidos en Córdoba. En láminas, hubo interacción significativa de dos vías (genotipo \* corte) ( $p \leq 0,05$ ) para el tejido vascular ( $p=0,0004$ ), células buliformes ( $p=0,0008$ ), proporción de parénquima incoloro ( $p=0,0092$ ) y clorénquima ( $p=0,0362$ ). El tejido vascular fue mayor en el genotipo Vencedor a medida que se alcanzó la madurez mientras que Green Panic no mostró diferencias significativas. La proporción de células buliformes en ambas superficies foliares en la región intervenal mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre genotipos; Green Panic mostró incremento de dicha área mientras que Vencedor disminuyó a medida que se alcanzaba la madurez. En cuanto a la proporción de parénquima incoloro, fue mayor en Green Panic a medida que se alcanzaba la madurez mostrando diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). El área del clorénquima disminuyó significativamente del primer al tercer corte ( $p \leq 0,05$ ), mientras que Vencedor se mantuvo sin cambios. La proporción de epidermis adaxial y abaxial, el esclerénquima y la vaina de kranz no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ) para la interacción de dos vías (genotipo \* corte). La proporción del grosor de la epidermis en la cara adaxial mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre genotipos, mientras que no se observaron diferencias entre cortes. La proporción de epidermis abaxial no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre genotipos ni entre cortes. En cuanto al esclerénquima, éste aumentó su valor en ambos genotipos a medida que se alcanzó la madurez mostrando diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre genotipos y entre cortes. La vaina de Kranz mostró diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre cortes en ambos genotipos mostrando disminución en sus valores a medida que se alcanzaba la madurez. Para los tallos, hubo interacción significativa ( $p \leq 0,05$ ) de dos vías (genotipo \* corte) para la epidermis ( $p=0,0005$ ) y el esclerénquima ( $0,045$ ). Al respecto, el área de epidermis aumentó en Vencedor y disminuyó en Green Panic a medida que se alcanzó la madurez mientras que la proporción de esclerénquima aumentó con el avance de la madurez en ambos genotipos. El área de tejido vascular y parénquima no mostró diferencias

estadísticas para la interacción doble ( $p > 0,05$ ) (genotipo \* corte). En cuanto al área de tejido vascular ésta aumentó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) con el aumento de la madurez mientras que la proporción de parénquima incoloro disminuyó significativamente en ambos genotipos a medida que se alcanzó la madurez con diferencias estadísticamente significativas entre cortes (Fig. 9 A, B, C y D; Tabla 12) (Fig. 10 A, B, C y D; Tabla 12).

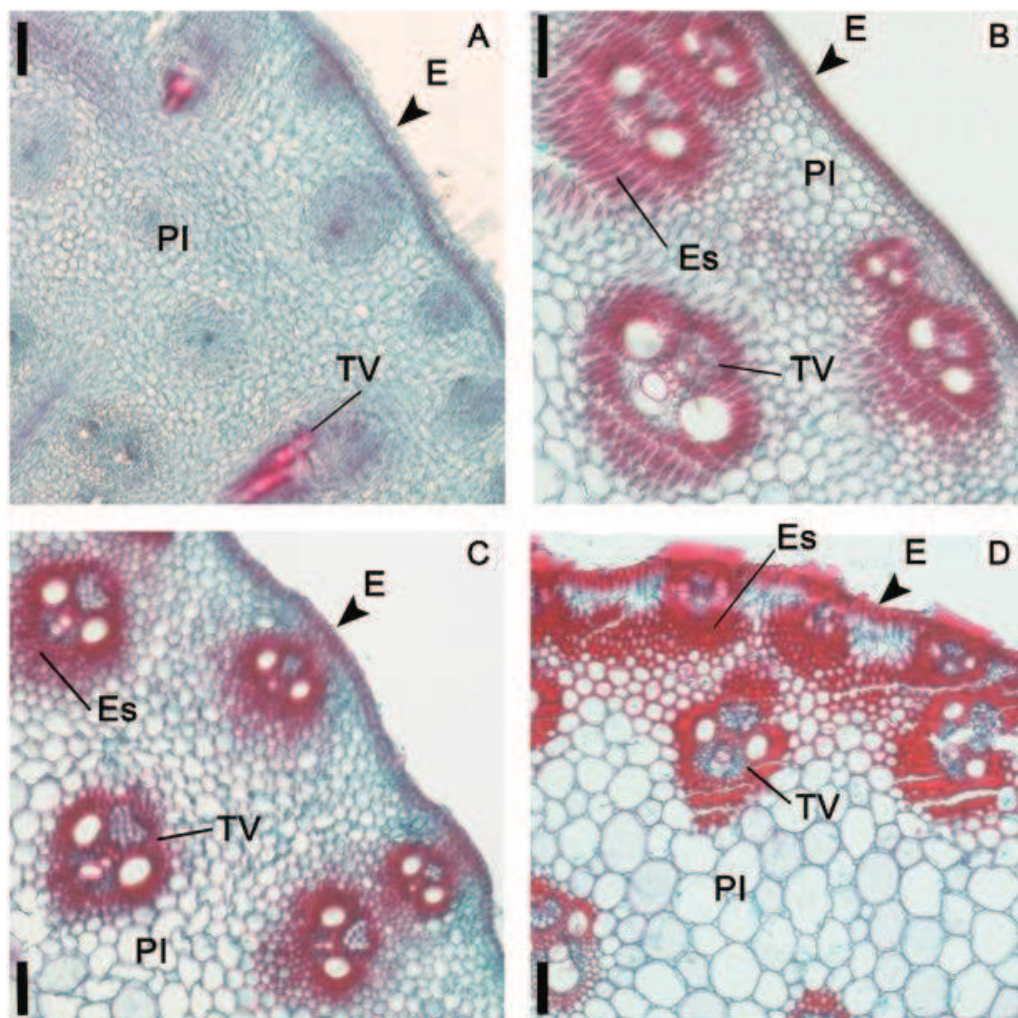
**Tabla 12.** Parámetros anatómicos expresado en porcentaje (%) medidos en la sección transversal de láminas y tallos de dos genotipos de *Megatyrsus maximus* (Vencedor (VE) y Green Panic (GR)) en dos fechas de corte (corte 1 y 3) en Manfredi.

Órgano	Parámetros Anatómicos	VE		GR	
		Corte 1	Corte 3	Corte 1	Corte 3
Lámina de la hoja	Epidermis adaxial	3,0±0,2 a	3,0±0,2 a	4,0±0,2 b	4,3±0,2 b
	Epidermis abaxial	4,5±0,7 a	4,7±0,6 a	5,0±0,6 a	5,0±0,6 a
	Células buliformes	8,0±0,4 C	6,7±0,3 B	3,3±0,3 A	5,7±0,3 B
	Tejido vascular	4,5±0,7 A	9,3±0,6 B	11,3±0,6 B	8,7±0,6 B
	Vaina de Kranz	19,0±0,7 c	12,0±0,6 a	16,3±0,6 b	12,0±0,6 a
	Esclerénquima	1,5±0,5 a	4,3±0,4 b	4,0±0,4 b	6,3±0,4 c
	Parénquima incoloro	38,5±2,1 B	41,7±1,7 B	26,0±1,7 A	42,3±1,7 B
	Clorénquima	20,5±2,6 A	17,7±2,2 A	30,7±2,2 B	16,0±2,2 A
Tallo	Epidermis	3,7±0,2 B	5,0±0,3 C	4,0±0,2 B	3,0±0,2 A
	Tejido Vascular	3,7±1,4 a	11,0±1,4 b	6,0±1,4 a	10,0±1,7 b
	Esclerénquima	2,3±0,9 A	19,7±0,9 B	20,3±0,9 B	42,0±0,9 C
	Parénquima incoloro	102,7±2,1 c	66,3±2,1 b	68,7±2,1 b	37,0±2,1 a

Nota: letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para la interacción de dos vías (genotipo \* corte) y minúsculas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para variables donde la doble interacción no fue significativa ( $p > 0,05$ ).



**Fig. 9.** Efecto del estado de madurez sobre las observaciones anatómicas en genotipos de *Megathyrsus maximus*. Corte transversal de láminas foliares de Vencedor (A y B) y Green Panic (C y D) en el primer y tercer corte, respectivamente. Ep. Ad, epidermis adaxial; Ep. Ab, epidermis abaxial; TV, tejido vascular; Es, esclerénquima; CB, células bulliforme; VK, vaina de kranz; PI, parénquima incoloro; C, clorénquima. Barra de escala 100  $\mu$ m.



**Fig. 10.** Efecto del estado de madurez sobre las observaciones anatómicas en genotipos de *Megathyrus maximus*. Corte transversal de tallos de Vencedor (A y B) y genotipo Green Panic (C y D) en el primer y tercer corte, respectivamente. TV, tejido vascular; Es, esclerénquima; PI, parénquima incoloro; E, epidermis. Barra de escala 100 µm.

## DISCUSIÓN

El estudio de parámetros químicos y cambios en la anatomía de las láminas y tallos con el avance de la madurez es importante para determinar el potencial productivo y la calidad nutritiva del forraje. En el presente trabajo se observó incremento en altura de planta, número de láminas y ancho y largo de hojas en *Megathyrus maximus* con el avance de la madurez. Similares resultados se describieron por Méndez-Martínez *et al.* (2018) en esta especie. En cuanto al contenido de FDN en hojas, se incrementó del primer al tercer corte mientras que para la variable FDA aumentó del primer al segundo corte y luego se mantuvo constante en el último corte excepto para el genotipo Vencedor. Este último hallazgo difiere del estudio descrito por Schnellmann *et al.* (2020) quienes reportaron aumentos significativos en estos parámetros entre diferentes intervalos



de corte. Estos autores mencionaron que la FDN es una fracción de la fibra cuyo incremento está asociado al progreso en el estado fenológico de la planta. En el caso de tallos, los contenidos de FDN y FDA aumentaron del primer al segundo corte y luego se mantuvieron constantes hasta la última etapa, excepto en los genotipos Vencedor y Mutale. Nuestros resultados difieren del estudio descrito por Méndez-Martínez *et al.* (2018) y Schnellmann *et al.* (2020) quienes informaron que estos parámetros químicos aumentaron a medida que avanzaba la edad de la planta. De acuerdo con lo mencionado por Stabile *et al.* (2012) en este trabajo se pudo observar variaciones genéticas para los parámetros nutricionales mencionados. Estos resultados podrían sugerir que los genotipos exhibieron diferencias en las pérdidas de la calidad, unos presentaron rápidas pérdidas y otros lentas, a medida que se alcanzaba la madurez.

En el presente trabajo, la LDA en láminas foliares se incrementó de manera diferenciada. Para los genotipos Vencedor y Penquero aumentó a medida que se alcanzó la madurez mientras que se mantuvo sin cambios en los genotipos Green Panic, Gatton Panic y Mutale. Para los genotipos Vencedor y Penquero, el mayor contenido de lignina acumulada en las partes más maduras de las plantas es un fenómeno muy común en las gramíneas como lo mencionan varios autores (Lev-Yadun, 2010; King *et al.*, 2013). Por otro lado, los resultados descritos en los genotipos Green Panic, Gatton Panic y Mutale podrían sugerir que el proceso de lignificación comenzó antes y cuando se iniciaron los primeros cortes la partición de carbono ya se había fijado a la pared celular. Se encontraron resultados similares en estudios realizados en láminas de caña de azúcar (Mason *et al.*, 2020). Se menciona en la bibliografía que la deposición de lignina en las paredes celulares de las plantas está regulada a través del desarrollo (Moura *et al.*, 2010). Serán necesarios más estudios para evaluar a nivel anatómico con mayor detalle el depósito y distribución de células lignificadas durante el desarrollo de las láminas foliares. En cuanto a LDA en tallos, ésta se incrementó a medida que se alcanzó la madurez en los cinco genotipos evaluados siendo los valores más altos observados en los genotipos Gatton Panic, Vencedor y Mutale. Estos incrementos pueden explicarse debido a que los entrenudos lignificaron sus tejidos en mayor porcentaje que los demás genotipos a medida que se alcanzaba la madurez. Wang *et al.* (2017) mencionaron conclusiones similares; dichos autores observaron un aumento continuo en la acumulación de lignina y un cambio importante en la composición de la lignina en los entrenudos en estados ontogénicos avanzados.

Además, varios estudios mostraron que el crecimiento del forraje está acompañado por un aumento del contenido de lignina con un engrosamiento secundario de la pared celular, lo que limita la digestión de la pared celular del forraje por parte de los rumiantes (Mauri *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2022).

Por otro lado, los porcentajes de FDN y LDA de láminas foliares fueron menores que los de tallos en todos los genotipos de *M. maximus*. Este hecho podría explicarse ya que las láminas se componen principalmente de células parenquimáticas, mientras que los tallos muestran más células esclerénquimáticas. Por lo tanto, los tejidos de soporte exhibieron una mayor extensión de lignificación que los tejidos parenquimatosos del mesófilo. Similares conclusiones se mencionan en Bernal-flores *et al.* (2017), Velasquez-Martinez *et al.* (2022) y Wang *et al.* (2017). El menor valor nutritivo del forraje en una determinada etapa de madurez en los forrajes tropicales se atribuye principalmente a una relación hoja-tallo relativamente baja y a las rápidas tasas de maduración (Jones, 1985). El principal efecto de esta rápida tasa de madurez es un incremento progresivo en el contenido de FDN acompañado de un aumento en la lignificación de la pared celular, lo que conduce a una menor digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS) y también a una menor digestibilidad de FDN (dFDN) (Stabile *et al.*, 2012). En este estudio a nivel de tallos, los genotipos evaluados disminuyeron la digestibilidad de la MS y consecuentemente, la digestibilidad de FDN con el aumento de la madurez a excepción del genotipo Green Panic. Stabile *et al.* (2012) encontraron grupos de rápida y lenta disminución de la digestibilidad de la MS y FDN en *M. maximus*. Vencedor a nivel de tallos, mostró significativos cambios en los porcentajes de parámetros de química húmeda como FDA, FDN y DMS como también en ivDMS y dFDN con el avance de la madurez, lo que nos podría sugerir que es un genotipo con rápida tasa de disminución. A diferencia de estos resultados, Green Panic fue el genotipo que no mostró cambios en ivDMS y dFDN, considerándolo como un genotipo de lenta tasa de disminución. Estos resultados podrían apoyar la idea de que la selección para la calidad del forraje también debe enfocarse en el tallo y no sólo en el valor nutricional de las láminas como lo menciona Stabile *et al.* (2010). Varios autores mencionaron que parámetros morfológicos como ancho de lámina (AL) y largo de lámina (LL) en láminas foliares están correlacionados con caracteres químicos (FDN y Proteína Cruda) que son importantes para la digestibilidad de los rumiantes. En consecuencia, un mayor valor en parámetros como AL indicarían una planta de

alta calidad para la producción animal (Batistoti *et al.*, 2012). Sin embargo, otras investigaciones demostraron que la calidad nutricional de la lámina (evaluada a través de la digestibilidad de la materia seca) se ve afectada por la longitud y la edad en gramíneas como *Chloris gayana* (Agnusdei *et al.*, 2011). En este estudio, el genotipo Vencedor tuvo los valores más altos de LL, AL y ATL con valores más bajos en DMS a medida que se alcanzó la madurez. Además, Vencedor a nivel de láminas tuvo los valores más altos de LDA y FDN, sumado a que la proporción de tejido vascular y esclerénquima aumentó a medida que avanzaba la madurez. En este sentido, García *et al.* (2021) mencionan que los segmentos basales de láminas de mayor nivel de inserción al tallo (láminas superiores), debido a su mayor tamaño en la nervadura media, muestran menor digestibilidad de materia seca que la zona media y la apical. Estos resultados podrían explicar el menor valor de DMS observado en el genotipo Vencedor. El soporte estructural que asegura la nervadura central a la hoja lo proporciona principalmente el tejido vascular (específicamente el xilema) y el esclerénquima. Estos tejidos están formados por células con paredes secundarias engrosadas y podrían ser los principales responsables de la disminución del valor nutritivo de este genotipo como lo reporta García *et al.* (2021). Por otro lado, el genotipo Green Panic presentó los valores más reducidos de ATL, LL y AL, lo cual estuvo asociado a valores altos de DMS y en los primeros estados también tuvo los porcentajes más altos de clorénquima. Estos resultados podrían ser explicados debido a que los tejidos del mesófilo (clorénquima) presentan digestión rápida y correlación positiva con la digestibilidad según lo descrito por Lista *et al.* (2020). Resultados similares obtuvieron en *Chloris gayana* donde las hojas de menor tamaño tuvieron asociaciones con mayores porcentajes de digestibilidad (Agnusdei *et al.*, 2011).

## CONCLUSIÓN

La madurez tuvo un efecto negativo en la calidad nutricional de *Megathyrus maximus*, ya que los genotipos tuvieron menores valores en la desaparición de materia seca de láminas y tallos y un aumento en los porcentajes de fibra detergente ácida y neutra a medida que se alcanzaba la madurez. A nivel de láminas la acumulación de LDA tuvo una acumulación diferenciada entre genotipos, tuvo aumentos con el avance de la madurez para Vencedor y Penquero y se mantuvo sin cambio en Gatton Panic, Green Panic y Mutale, lo que podría sugerir una fijación temprana de la lignina en estos genotipos. Genotipos como Vencedor y Mutale presentaron altos valores de digestibilidad en las primeras etapas. Se recomienda realizar futuras investigaciones adicionales sobre el manejo del pastoreo de estos genotipos y su influencia en la producción de leche y carne. El conocimiento del contenido y proporción de tejidos en los diferentes estados de madurez en los diferentes genotipos es fundamental para establecer estrategias de manejo del pastoreo que permitan ofrecer pastos con bajo contenido de tejidos lignificados.

## BIBLIOGRAFIA

Agnusdei, M.G., Di Marco, O.N., Nenning, F.R & Aello, M.S. (2011). Leaf blade nutritional quality of rhodes grass (*Chloris gayana*) as affected by leaf age and length. *Crop and Pasture Science*, 62:1098-1105. <http://dx.doi.org/10.1071/CP11164>.

ANKOM Technology. (2013). Method 8, 3/13/13: Method for determining acid detergent lignin in beakers. *Ankom Technology, Macedon, NY*.

ANKOM Technology. (2014). Method 6, 11/04/14: Neutral Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (For A200, A200I). *Ankom Technology, Macedon, NY*.

ANKOM Technology. (2014). Method 5, 11/04/14: Acid Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (For A200, A200I). *Ankom Technology, Macedon, NY*.

ANKOM Technology. (2023). *In Vitro* True Digestibility Using the DaisyII Incubator (2023). Available online: <https://www.ankom.com/embed-only/document/vitro-true-digestibility-method-ivtd-daisy>.

AOAC, Official. (2002). Method 2002.04. Amylase-Treated Neutral detergent Fiber in Feeds. *AOAC Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, VA.

Barragán-Hernández, W.A & Cajas-Girón, Y.S. (2019). Bromatological and structural changes in *Megathyrus maximus* in four silvopastoral arrangement systems. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20:245-258. <https://www.redalyc.org/journal/4499/449960477004/html/>.

Basso, K.C., Cecato, U, Barbero L.M., Lempp, B., Gomes, J.A.M & Lugão, S.M.B. (2014). Influence of nitrogen levels on leaf anatomy and Nutritive value of millennium grass. *Bioscience Journal*, 30:792-802. <https://www.researchgate.net/publication/283915147>.

Batistoti, C., Lempp, B., Jank, L., Morais, M. das G., Cubas, A.C., Gomes R.A & Ferreira, M.V.B. (2012). Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum* genotypes *Animal Feed Science and Technology*, 171:173-180. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.11.008>.

Benabderrahim, M.A & Elfalleh, W. (2021). Forage potential of non-native guinea grass in North African agroecosystems: genetic, agronomic, and adaptive traits. *Agronomy*, 11:1071. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061071>.

Bernal-Flores, A., Quero-Carrillo, A.R., Zabaleta-Mancera, H.A., Valdez-Carrasco, J & Ortega-Cerrilla, M.E. (2017). Atributos histológicos relacionados con digestibilidad en *Bouteloua curtipendula* (Michx.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40:299-308.

- Carlioni, E., Ribotta, A., López Colomba, E., Griffa, S., Quiroga, M., Tommasino, E., Luna, C & Grunberg, K. (2014). Somatic embryogenesis from *in vitro* anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117:311-322. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0441-4>.
- Carnevali, R.A., Congio, G.F.S., Sbrissia, A.F & Sila, S.C. (2021). Growth of *Megathyrus maximus* cv. Mombaça as affected by grazing strategies and environmental seasonality. II. Dynamics of herbage accumulation. *Crop and Pasture Science*, 72:66-72. <https://doi.org/10.1071/CP20199>.
- Carvalho, C.A.B., De Silva, P.H.F., Da Zanella, P.G., Diavão, J & Paiva, A.J. (2022). Morphogenetic and structural traits of tillers and herbage accumulation of Tanganyika grass under shading levels. *Revista Brasileira De Saúde E Produção Animal*, 23. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402100452022>.
- Clipes, R.C., Silva, J.F.C.D., Detmann, E., Vásquez, H.M., Henriques, L.T., Donatele, D.M & Oliveira, A.D.F.M.D. (2010). Predição da fração indegradável da fibra em detergente neutro em forragens tropicais a partir da concentração de lignina. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11(4):999-1011. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:86311925>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M & Robledo, C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Di Rienzo, J.A., Guzman, A.W & Casanoves, F.A. (2002). multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 7(2):129-142. <https://doi.org/10.1198/10857110260141193>.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de técnicas en Histología vegetal. *Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires*.

- García, L.F., Silva, G.P., Geremia, E.V., Goulart, L.B.L., Dias, C.T.S & Da Silva, S.C. (2021). Central rib and the nutritive value of leaves in forage grasses. *Scientific Reports*, 11:5440. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84844-z>.
- Goering, H.K & Van Soest, P.J. (1970). *Forage Fiber Analysis (Apparatus Reagents, Procedures and Some Applications)*. Agriculture Handbook. United States Department of Agriculture, Washington DC.
- He, Y., Mouthier, T.M., Kabel, M.A., Dijkstra, J., Hendriks, W.H., Struik, P.C & Cone, J.W. (2017). Lignin composition is more important than content for maize stem cell wall degradation. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 98:384-390. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8630>.
- Hintz, R.W., Mertens, D.R & Albrecht, K.A. (1996). Effects of sodium sulfite on recovery and composition of detergent fiber and lignin. *Journal of Association of Analytical Communities International*, 79:16-22.
- Jones, C.A. (1985). *C4 grasses and cereals, growth, development and stress response*. New York: John Wiley & Sons.
- Jayasinghe, P., Donaghy, D.J., Barber, D.G., Pembleton, K.G & Ramilan, T. (2022). Suitability Evaluation of Three Tropical Pasture Species (Mulato II, Gatton Panic, and Rhodes Grass) for Cultivation under a Subtropical Climate of Australia. *Agronomy*, 12:2032. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092032>.
- Jiménez, P.A. (2007). Identificación de harinas de yuca (*Manihot esculenta* crantz) con alto contenido proteico mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS). *Producción Animal Tropical, MAESTRIA E*, 71.
- Juan, N.A., Pordomingo, A.B., Petruzzi, H.J & Ruiz, M.A. (2012). Análisis del valor nutritivo de gramíneas perennes megatérmicas utilizando tecnología NIRS. *Revista Argentina de Producción Animal*, 32:314.

- Juan, N.A., Bollati, G., Ortiz, D., Ribotta, A., Griffa, S & Lopez Colomba, E. (2020). Nutritive value analysis of summer grasses Buffel Grass Grama Rhodes using NIRS technology. Congreso de la Asociación. Argentina de Producción Animal – *RAPA* Vol.xy, Supl. 1.
- King, C., Mceniry, J., Richardson, M & O’Kiely, P. (2013). Characterization for industrial purposes of the fibre anatomy of perennial ryegrass and tall fescue stem and leaf at three stages in the primary growth. *Grass and Forage Science*, 69:64-73. <https://doi.org/doi: 10.1111/gfs.12032>.
- Lista, F.N., Neto, J.V.E., Almeida J.C.C., Deminicis, B.B, Rocha, D.R Y Difante, G.S. (2020). Nutritive value and anatomical characterization from *Pennisetum purpureum* genotypes. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42:1807-1886. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.53064>.
- Lev-Yadun, S. (2010). Plant fibers: Initiation, growth, model plants and open questions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57:305-315. <https://doi.org/10.1134/S1021443710030015>.
- Levene, H. (1960). Robust tests for the equality of variance. *Contributions to Probability and Statistics*. 1<sup>st</sup> Ed. Ed. Stanford University Press, Palo Alto, California USA, 278-292.
- Marković, J.P., Štrbanović, R.T., Terzić, D.V., Djokić, D.J., Simić, A.S., Vrvic, M.M & Živković, S.P. (2012). Changes in lignin structure with maturation of alfalfa leaf and stem in relation to ruminants nutrition. *African Journal of Agricultural Research*, 7(2):257-264. <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR11.1485>.
- Martínez-Mamian, C., Vivas-Quila, N.J & Morales-Velasco, S. (2020). Agronomic response of forage mixtures in a silvopastoral system in the Colombian dry tropics. *Dyna*, 87:80-84. <https://doi.org/10.15446/dyna.v87n213.79900>.



- Mason, P.J., Furtado, A., Marquardt, A., Hodgson-Kratky, K., Hoang, N., Botha, F., Papa, G., Mortimer, J., Simmons, B & Henry, R. (2020). Variation in sugarcane biomass composition and enzymatic saccharification of leaves, internodes and roots. *Biotechnol Biofuels*,13:201. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01837-2>.
- Mauri, J., Pereira, D.L., Silva, G.A., Davide, L.C., Techio, V.H., Souza Sobrinho, F & Pereira, F.J. (2019). Forage potential of *Urochloa* genotypes by using leaf anatomy. *Ciencia Rural*, 49:4. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170266>.
- Medinilla-Salinas, L., Vargas-Mendoza, M.d.C., López-Ortiz, S. et al. (2013). Growth, productivity and quality of *Megathyrsus maximus* under cover from *Gliricidia sepium*. *Agroforestry Systems*, 87:891-899. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9605-1>.
- Méndez-Martínez, Y., Verdecia, D.M., Reyes-Pérez, J.J., Luna-Murillo, R.A., Rivero-Herrada, M., Montenegro-Vivas, L.B & Herrera, R.S. (2018). Quality of three *Megathyrsus maximus* cultivars in the Empalme area, Ecuador. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52:4. <http://scielo.sld.cu/pdf/cjas/v52n4/2079-3480-cjas-52-04-423.pdf>.
- Morales-Velasco, S., Vivas-Quila, N.J & Teran-Gómez, V.F. (2016). Ganadería eco-eficiente y la adaptación al cambio climático. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 14:135-144. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)135-145](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)135-145).
- Moura, J.C., Bonine, C.A., de Oliveira Fernandes, V.J., Dornelas M.C & Mazzafera P. (2010). Abiotic and biotic stresses & changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52:360-376. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>.
- Ruzin, S.E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. New York: Oxford University Press.

Santos, F.C., Freitas, A.S., De Castro, E.M., Davide, L.C., Souza Sobrinho, F & Tech, V.H. (2014). Leaf anatomy and nutritive values of *Brachiaria ruziziensis* genotypes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 57(2):128-135. <https://doi.org/10.1080/00288233.2014.897237>.

Shapiro, S & Wilk, B. (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika*, 52:591-611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.

Schneider, C.A., Rasband, W.S & Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671-675. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020335>.

Stabile S.S., Salazar D.R., Jank L., Renno´ F.P & Silva L.F.P. (2010). Characteristics of nutritional quality and production of genotypes of guineagrass harvested in three maturity stages. *Brazilian Journal of Animal Science*, 39:1418-1428. [www.sbz.org.br](http://www.sbz.org.br).

Stabile S., Bodini A., Jank L., Rennó F., Santos M & Silva L. (2012). Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility *Grass and Forage Science*, 67:43-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2011.00817.x>

Schnellmann, L.P., Verdoljak, J.J.O., Bernardis, A., Martínez-González, J., Castillo-Rodríguez, S.P & Limas-Martínez A.G. (2020). Frecuencia y altura de corte sobre la calidad del *Megathyrsus maximus* (cv. Gatton panic). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21:1402.

- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J & Boerjan, W. (2010a) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153:895-905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Velázquez-Martínez, M., Rodríguez-Ortega, L.T., Rojas-García, A.R., Enríquez-Quiroz, J.F., Santiago Hernández F., Ramírez-Rojas, S.G & Hernández-Guzmán, F.J. (2022). Morphology and forage quality in buffel, rhodes, and blue grama grasses in Valle del Mezquital. *Agro Productividad*, 15:2158.
- Verga, A. (2015). “Programa HOJA”. Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, CIAP, INTA. Distribución gratuita.
- Wang, J., Ma, L., Shen, Z., Sun, D., Zhong, P., Bai, Z., Zhang, H., Cao, Y., Bao, Y & Fu, C. (2017). Lignification of Sheepgrass Internodes at Different Developmental Stages and Associated Alteration of Cell Wall Saccharification Efficiency. *Frontiers in Plant Science*, 27:414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00414>.
- Wu, J., Wang, X., Zhang, R., Fu, Q., Tang, F., Shi, F., Temuer, B & Zhang, Z. (2022). Comparative Transcriptome and Anatomic Characteristics of Stems in Two Alfalfa Genotypes. *Plants*, 11:2601. <https://doi.org/10.3390/plants11192601>.

## CAPÍTULO 5

### **EVALUACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS CLAVES QUE PARTICIPAN EN LA BIOSÍNTESIS DE LA LIGNINA EN LÁMINAS Y TALLOS DE MATERIALES DE *MEGATHYRSUS MAXIMUS* CONTRASTANTES EN LA DIGESTIBILIDAD DE LA FDN DE LOS TALLOS**

#### **INTRODUCCIÓN**

La lignina es un polímero compuesto por tres tipos de monómeros: p-hidroxifenilo lignina (H), guayacil lignina (G) y siringil lignina (S). En general, las ligninas de gimnospermas y especies relacionadas son ricas en unidades G y contienen reducidas cantidades de unidades H. En dicotiledóneas, la lignina se compone principalmente de unidades G y S (Weng & Chapple, 2010) mientras que en monocotiledóneas tanto las unidades S como las G están presentes en niveles similares y la cantidad de unidades H es mayor que en las dicotiledóneas (Vanholme *et al.*, 2010a). Asimismo, las proporciones de las unidades de lignina varían dependiendo de la especie vegetal, tejido/órgano y etapas de desarrollo (Wang *et al.*, 2017).

La lignina junto con la celulosa y la hemicelulosa son los componentes más abundantes de la pared celular vegetal. Este polímero fenólico se reticula con la hemicelulosa y forma una estructura compacta incrustada a la celulosa en la pared celular secundaria, que juega papeles cruciales en el soporte mecánico, el transporte de agua y otorga defensa durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Boerjan *et al.*, 2003). A pesar de ser un componente químico importante de las paredes celulares de los forrajes, es esencialmente indigerible e inhibe la fermentación ruminal de la pared celular del forraje. La lignificación de las paredes celulares ha sido identificada como el principal factor que limita la digestibilidad-degradabilidad de cultivos forrajeros (Kondo *et al.*, 1998). La capacidad de la lignina para resistir la degradación convierte a este compuesto en el principal componente de la pared celular responsable de la recalcitrancia de la biomasa (Vanholme *et al.*, 2010b; Van Acker *et al.*, 2013).

El proceso de lignificación está regulado por un conjunto de eventos metabólicos que resultan en la biosíntesis de precursores de lignina (monolignoles). Algunas de las enzimas clave del proceso de lignificación incluyen ácido cafeico-O-metiltransferasa (COMT), 4-cumarato CoA ligasa (4CL), cinamoil CoA reductasa (CCR), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y cinamato 4 hidroxilasa (C4H) (Moura *et al.*, 2010; Stabile *et al.*, 2012; Baxter & Stewart, 2013). Ha sido demostrado que la expresión de genes que codifican enzimas de la vía de los fenilpropanoides modula la tasa de síntesis de la lignina en pasturas (Ralph *et al.*, 2004), lo cual se ha asociado negativamente con la degradabilidad de la pared celular (Fu *et al.*, 2011; Stabile *et al.*, 2012) ya que la lignina protege los polisacáridos de la hidrólisis enzimática (Jung & Deetz, 1993). En los últimos años, se han realizado estudios enfocados a la reducción del contenido de lignina o el cambio de su composición para aumentar su degradación y mejorar el valor alimenticio (Hu *et al.*, 2019; Jung & Engels, 2002). Estos estudios se centran en la regulación negativa de genes clave en la ruta de biosíntesis de lignina, lo que aumenta significativamente la digestibilidad del forraje (Shadle *et al.*, 2007; Tong *et al.*, 2015). En especies forrajeras como alfalfa se ha encontrado que el contenido y la composición de la lignina han afectado la digestibilidad del forraje (Wu *et al.*, 2022).

Por otro lado, en *Megathyrsus maximus* se han realizado estudios en los cuales la expresión de enzimas de la ruta de síntesis de la lignina fue responsable de la disminución de la digestibilidad de la Fibra Detergente Neutra (FDN) (Stabile *et al.*, 2012). Estos autores mencionaron en su trabajo que genotipos con rápida disminución de la digestibilidad de la FDN y ivDMS en los tallos también tienen aumentos más temprano en la expresión de las enzimas C4H y CCoAOMT con avance en la madurez, a diferencia de los genotipos con baja disminución de la digestibilidad de la FDN. Más aún, estudios llevados a cabo en maíz, muestran que la expresión de C4H y otros genes de la vía de síntesis de lignina fue mayor en entrenudos de tallos jóvenes que en entrenudos lignificados (Guillaumie *et al.*, 2007).

De esta manera, la identificación de genes que controlan la biosíntesis de la lignina durante el desarrollo de forrajes tropicales mejoraría la comprensión del proceso de lignificación y facilitaría el desarrollo de cultivares mejorados, lo que consecuentemente permitiría ofrecer pasturas de mejor calidad forrajera.

## **Hipótesis**

La pérdida de digestibilidad en *Megathyrsus maximus* con el avance de la madurez está asociada a cambios en la expresión de genes de la biosíntesis de la lignina.

## **Objetivo general**

Evaluar el nivel de expresión de genes asociados a la biosíntesis de la lignina en materiales de *Megathyrsus maximus* y sus implicancias en la pérdida de la digestibilidad con el avance de la madurez ontogénica.

## **Objetivos específicos**

Evaluar el nivel de expresión génica de enzimas clave que participan en la biosíntesis de la lignina en láminas y tallos de materiales de *Megathyrsus maximus* que resulten ser contrastantes en la digestibilidad de la FDN de los tallos con el avance de la madurez ontogénica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina**

Los cebadores utilizados se diseñaron con el software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y AmplifX (v.1.7.0 (<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx>)) sobre las secuencias de ARNm depositadas en GenBank para *Panicum virgatum* (Tabla 13 y 14). Los códigos de los genes analizados para las enzimas involucradas en la biosíntesis de monolignoles fueron: 4-cumarato-CoA ligasa (4CL; GenBank: EU491511.1), cinamoil-CoA reductasa (CCR; GenBank: XM\_004983487.3), cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT; GenBank: AB723826.1), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD; GenBank: XM\_004976726.1), fenilalanina amoniaco liasa (PAL; GenBank: MT150275.1) y ácido cafeico-O-metiltransferasa (COMT;

GenBank: HQ645965). Todos los cebadores utilizados (Tabla 13 y 14) se ordenaron a Ruralex (Buenos Aires, Argentina). Los tamaños de los productos amplificados se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa y después de su purificación se secuenciaron para confirmar las secuencias reales.

### **Extracción de ARN y PCR en tiempo real (qPCR)**

El ARN se extrajo de tejidos foliares y de tallos cosechados en tres fechas de corte en los dos sitios experimentales (el material muestreado corresponde a los ensayos descritos en el capítulo 4). Se tomaron segmentos de 4 cm desde la base de la tercera y cuarta lámina completamente expandida y segmentos de 5 cm de tallos a nivel del cuarto entrenudo, los cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Posteriormente, se molieron 100 mg de tejido congelado con aire líquido en morteros de porcelana y se aisló el ARN total de alta calidad usando el reactivo TRIzol™, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). El ADN genómico se eliminó después del tratamiento con DNasa I durante 30 minutos a temperatura ambiente usando DNasa I (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). La concentración de ARN se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, EE. UU.). La calidad del ARN aislado se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, y su integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v). La primera cadena del ADN complementario (cADN) se sintetizó usando M-MLV (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En un volumen de reacción total de 25  $\mu\text{L}$ , se cebaron 2  $\mu\text{g}$  de ARN libre de DNasa total con 1  $\mu\text{g}$  de oligos d(T)<sub>20</sub> (Ruralex). Para realizar la técnica de qPCR, las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de reacción de 15  $\mu\text{L}$  que contenía 250 nM de cada cebador, 1  $\mu\text{L}$  de muestra de ADNc y iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Se incorporaron controles en cada una de las amplificaciones. Las reacciones qPCR se realizaron utilizando un termociclador iQ5 (BioRad). El perfil térmico se ajustó a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  durante 30 s y  $72^{\circ}\text{C}$  durante 30 s. La especificidad del amplicón se verificó mediante análisis de curva de fusión ( $55$  a  $95^{\circ}\text{C}$ ) después de 40 ciclos de PCR.

Los datos muestran el aumento o disminución relativa del nivel de expresión génica en cada muestra correspondiente a un corte en comparación

con los niveles de expresión génica en otra muestra correspondiente al corte siguiente.

## **Análisis estadístico**

Se utilizaron tres réplicas biológicas para cada tratamiento (genotipo \* corte) y dos réplicas técnicas para cada réplica biológica. Se seleccionaron como genes de referencia, el factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ) y el factor de iniciación eucariota 4A (Elf4 $\alpha$ ) previamente caracterizados en *C. ciliaris* (Simon *et al.*, 2013) y que resultaron exhibir mayor expresión y estabilidad en tejidos de *M. maximus*. Las eficiencias de amplificación se determinaron para cada gen siguiendo las recomendaciones de Svec *et al.* (2015). Los valores de eficiencia estuvieron entre 91 y 100 % para todos los cebadores. Los perfiles de expresión de estos genes se estimaron en relación a los genes de referencia utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020) siguiendo las recomendaciones de Pfaffl *et al.* (2002).

## **RESULTADOS**

Los genes que codifican para la biosíntesis de la lignina modificaron su expresión, tanto para las láminas como para los tallos, principalmente en el corte tres respecto del corte uno (Tabla 13 y 14) mientras que el corte dos, por su parte, tuvo niveles similares de expresión respecto al corte tres (datos no mostrados). De esta manera, se presentan los resultados comparativos del corte tres y del corte uno en el sitio de Manfredi, siguiendo la misma tendencia los obtenidos en Córdoba. Para el caso de las láminas, el gen CCoAOMT aumentó su expresión significativamente en ambos genotipos contrastantes ( $p < 0,05$ ) (Vencedor y Green Panic) (razón  $\log_2 = 5,20$  y  $3,60$ , respectivamente; Tabla 13). La expresión del gen CCR también se vio aumentada significativamente para ambos genotipos ( $p < 0,05$ ), Vencedor y Green (razón  $\log_2 = 5,28$  y  $5,92$ , respectivamente). Con respecto al gen COMT hubo aumento significativo para Green ( $p < 0,05$ ), (razón  $\log_2 = 2,51$ ; Tabla 13) mientras que para Vencedor no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Por su parte, Green redujo la expresión del gen 4CL de manera significativa ( $p < 0,05$ ), (razón  $\log_2 = -2,06$ ) mientras que Vencedor también redujo su expresión, pero no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 13).



Respecto a los tallos, para el gen CCoAOMT Vencedor aumentó su valor significativamente ( $p < 0,05$ ), (razón  $\log_2 = 2,09$ ; Tabla 14) mientras Green también aumento su expresión, pero no de manera significativa ( $p > 0,05$ ). Para el gen CCR, ambos genotipos aumentaron su expresión significativamente ( $p < 0,05$ ) (razón  $\log_2 = 4,03$  y  $1,38$ , respectivamente; Tabla 14). En relación con los genes COMT, PAL y 4CL, Vencedor exhibió aumento significativo en la expresión de esos genes ( $p < 0,05$ ) mientras que Green aumento su expresión, pero no de forma significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabla 14).

**Tabla 13.** Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina en láminas de dos genotipos de *Megathyrus maximus* (Vencedor (VE) y Green Panic (GR)) evaluados en dos fechas de corte (1 y 3) en Manfredi.

Láminas								
Genes	Secuencia cebadores (5' - 3') Forward /reverse	Tamaño producto (bp)	Eficiencia	R <sup>2</sup>	Genotipos	Log2 (ratio)	EE (Ratio)	P-valor
CCoAOMT	AAGAGCGACGA CCTCTACCA	119	1,99	0,99	Vencedor	5,20	1,91	0,0197
	GACGTTGTCAT CAGGTTCCA				Green	3,60	0,24	0,0067
CCR	GTGTGGAGGCA GAACTACCC	102	2,00	0,99	Vencedor	5,28	2,02	0,0205
	AAACCACAGCT TGTTGTCGC				Green	5,92	0,20	0,0075
COMT	GCATCCCGTTC AACAAGG	136	1,97	0,97	Vencedor	2,12	1,91	0,1121
	GCGTAGAACTC GAGCAGCTT				Green	2,51	0,33	0,0071
4CL	CGAGTCCACAA AGAACACCA	99	1,99	0,98	Vencedor	-0,22	2,72	0,2175
	AGCCTGTCGAC GATGAAGAT				Green	-2,06	0,43	0,0119

**Tabla 14.** Expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina en tallos de dos genotipos de *Megathyrus maximus* (Vencedor (VE) y Green Panic (GR)) evaluados en dos fechas de corte (1 y 3) en Manfredi.

Tallos								
Genes	Secuencia cebadores (5' - 3')	Tamaño producto (bp)	Eficiencia	R <sup>2</sup>	Genotipos	Log2 (ratio)	EE (Ratio)	P- valor
	Forward /reverse							
CCoAOMT	AAGAGCGACGACCT CTACCA	119	1,91	0,995	Vencedor	2,09	0,27	0,0061
	GACGTTGTCATCAG GTTCCA				Green	1,16	1,06	0,1495
CCR	GTGTGGAGGCAGAA CTACCC	102	1,92	0,988	Vencedor	4,03	0,58	0,0075
	AAACCACAGCTTGT TGTCGC				Green	1,38	1,21	0,0175
COMT	GCATCCCGTTCAAC AAGG	136	2,00	0,993	Vencedor	4,70	0,88	0,0067
	GCGTAGAACTCGAG CAGCTT				Green	0,80	1,39	0,2989
PAL	TATTGGCAAGCTGA TGTTCCG	118	1,90	0,998	Vencedor	5,68	0,24	0,0082
	GCCCTTGAAACCAT AGTCCA				Green	1,88	1,08	0,0605
4CL	CGAGTCCACAAAGA ACACCA	99	1,89	0,978	Vencedor	2,29	0,38	0,0053
	AGCCTGTGACGAT GAAGAT				Green	0,65	1,05	0,2480

## DISCUSIÓN

Este estudio mostró variaciones en las variables nutricionales y anatómicas con el avance de la etapa fenológica en las láminas y los tallos, lo que permitió discriminar los genotipos.

La disminución de la calidad de *M. maximus* con la madurez se atribuye normalmente a una mayor proporción de tallos lo que ejerce una fuerte influencia en la calidad forrajera del cultivo ya que los tallos son descritos con menor calidad que las hojas (Stabile *et al.*, 2012). Al respecto, la lignina aumenta con el engrosamiento de la pared celular secundaria durante el desarrollo de la planta, y limita la digestión de la pared celular del forraje por parte de los rumiantes (Jung *et al.*, 2002).

Existen diferentes estudios enfocados en identificar genes claves responsables de la biosíntesis de la lignina que buscan explicar las diferencias en el valor nutritivo de pasturas en diferentes etapas de madurez (Jeong *et al.*, 2012; Stabile *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2022;). Al respecto, en nuestro estudio a nivel de láminas hubo aumento significativo en la expresión de CCoAOMT y CCR en ambos genotipos y por su parte Vencedor mostro los valores más altos respecto de Green Panic. Según bibliografía el incremento en la expresión de enzimas codificantes para la lignina sería la responsable de la reducción de la calidad del forraje. Resultados similares fueron reportados en alfalfa por Wu *et al.* (2022). En dicho trabajo el aumento de enzimas claves de la biosíntesis de la lignina provocó la reducción en parámetros asociados con mejor calidad de forraje. A diferencia de estos resultados, el cultivar Green Panic redujo de forma significativa la expresión de la enzima 4CL. Estudios previos han demostrado que la desregulación de 4CL es un medio para reducir el contenido de lignina en las paredes celulares (Voelker *et al.*, 2010). Además de la desregulación de 4CL, Green Panic también tuvo menores cambios en la expresión de enzimas claves de la biosíntesis de la lignina y mantuvo sus niveles de LDA durante el avance de la madurez, ésto podría sugerir que el proceso de lignificación en este genotipo comenzó antes y cuando se iniciaron los primeros cortes la partición de carbono ya se había fijado a la pared celular. Similares resultados se observaron en caña de azúcar por diversos autores (Bottcher *et al.*, 2013; Mason *et al.*, 2020).

El comportamiento diferencial entre Vencedor y Green Panic para el porcentaje de LDA en relación al avance de la madurez, podría ser explicado por la variabilidad genotípica para la especie, caracterizándose el genotipo Vencedor por presentar grandes cambios en su crecimiento. Batistoti *et al.* (2012) encontraron en esta especie similares resultados con otros materiales. La rápida pérdida del valor nutritivo de Vencedor podría ser explicada a su vez por la variación en la composición de la lignina, ya que se ha demostrado que es un factor importante que influye en la calidad ya que la lignina rica en S se degrada más fácilmente que la lignina rica en G porque el grupo metoxi en la posición C-5 de las unidades S evita la formación de un enlace carbono-carbono resistente a la degradación en esta posición (Ziebell *et al.*, 2010). En varias gramíneas como festuca alta (*Lolium arundinaceum* (Schreb.) Darbysh.; Chen *et al.*, 2002), maíz (*Zea mays* L.) (Jung & Casler, 2006; Riboulet *et al.*, 2009), y pasto varilla (*Panicum virgatum* L.) (Shen *et al.*, 2009) se ha demostrado un aumento

progresivo de la relación S-G durante el desarrollo del tallo. De esta manera, sería necesario la realización de estudios histoquímicos en estos dos genotipos que revelen los aumentos de unidades G y S para discriminar en mejor medida a los genotipos de nuestra especie y ver la influencia directa en la calidad del forraje.

El aumento en la expresión de genes de la biosíntesis de la lignina juega un papel importante en el proceso de regulación de la lignificación (Liu *et al.*, 2018, Christensen & Rasmussen, 2019) que redundan en reducción de la calidad del forraje como reportan diversos autores (El Hage *et al.*, 2018; Grabber *et al.*, 2004; Stabile *et al.*, 2012). El aumento en la expresión de todos los genes asociados al proceso de lignificación a nivel de tallos observados en el genotipo Vencedor es concordante con el obtenido a nivel de LDA cuyos valores fueron mayores respecto de Green Panic. Este comportamiento diferencial podría deberse a que, en cada momento del corte, Vencedor estaba en pleno desarrollo y exhibió rápida disminución de la calidad con el avance de la madurez. Resultados similares fueron encontrados en tallos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) por Bottcher *et al.* (2013) y en guinea grass (*Megathyrsus maximus*) por Stabile *et al.* (2012). Esto muestra claramente como la expresión de enzimas de la ruta de síntesis de la lignina puede ser responsable de la disminución de la calidad en unos genotipos más que en otros. Los menores niveles en la expresión de genes que codifican para la lignina observados en tallos y consecuentemente la falta de cambios a nivel de digestibilidad de la FDN en Green Panic podría sugerir que la lignificación había comenzado más temprano en el desarrollo de los tallos y en los haces vasculares de los entrenudos jóvenes mientras que la deposición de lignina en otros tejidos como la epidermis, la hipodermis y el parénquima de almacenamiento fue realizado en tiempos más tardíos durante el ciclo del cultivo. Estos resultados son consecuentes con la mayor proporción de esclerénquima en etapas tempranas en Green Panic respecto de Vencedor a nivel de los haces vasculares. Similares apreciaciones son mencionadas por diversos autores en otros cultivos vegetales (Casu *et al.*, 2007; Jacobsen *et al.*, 1992). Al respecto, un mayor aumento en el contenido de lignina se encontró en las primeras etapas del tallo de maíz mientras que se observaron cantidades constantes durante las siguientes etapas (Jung & Casler, 2006; Riboulet *et al.*, 2009). Este fenómeno puede sugerir un proceso de senescencia temprana que resultaría en reducción del valor nutricional y consecuente con esto, pérdidas significativas en la producción de material vegetal comestible (Gregersen *et al.*, 2013). Al respecto, se necesitaría

focalizar estudios en los mecanismos moleculares que controlan la senescencia de *M. maximum*, esto es de gran importancia porque se debe garantizar que el forraje, perenne permanezca verde por más tiempo y con altos valores nutricionales.

## CONCLUSIÓN

El avance de la madurez tuvo efecto en la reducción de la calidad nutritiva en ambos genotipos contrastantes (Vencedor y Green Panic). Los incrementos en la expresión de enzimas codificantes para la lignina, influyeron de manera significativa en la calidad forrajera. No obstante, hubo variabilidad genética entre los cultivares en el momento en el que se dieron dichos incrementos. Green Panic tuvo menores cambios en la expresión de enzimas claves de la biosíntesis de la lignina y Vencedor por su parte tuvo mayores niveles de expresión génica en láminas y en tallos. El comportamiento diferencial entre los genotipos podría deberse a que Vencedor estaba en pleno desarrollo y exhibió rápida disminución de la calidad con el avance de la madurez mientras que los menores niveles de expresión de Green Panic podrían sugerir que la lignificación había comenzado más temprano en el desarrollo de este genotipo.

## BIBLIOGRAFIA

- Batistoti, C., Lempp, B., Jank L., das G. Morais M., Cubas A.C., Gomes R.A & Ferreira M.V.B. (2012). Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum*. genotypes Animal Feed Science and Technology, 171:173-180. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.11.008>.
- Baxter, H.L. & Stewart, C.N.Jr. (2013). Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress. Biofuels, 4:635-650. <https://doi.org/10.4155/bfs.13.56>.

- Boerjan, W., Ralph, J & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology, 54:519-546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>.
- Bottcher, A., Cesarino, I., dos Santos, A.B., Vicentini, R., Mayer, J.L.S., Vanholme, R., Morreel, K., Goeminne, G., Nobile, P.M & Moura, J.C.M.S. (2013). Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. Plant Physiology, 163:41539-41557. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225250>.
- Casu, R.E., Jarmey, J.M., Bonnett, G.D & Manners, J.M. (2007). Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. Functional & Integrative Genomics, 7:153-167. <https://doi.org/10.1007/s10142-006-0038-z>.
- Chen, L., Auh, C., Chen, F., Cheng, X., Aljoe, H., Dixon, R.A & Wang, Z. (2002). Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50:5558-5565. <https://doi.org/10.1021/JF020516X>.
- Christensen, C.S & Rasmussen, S.K. (2019). Low lignin mutants and reduction of lignin content in grasses for increased utilization of lignocellulose. Agronomy, 9:256. <https://doi.org/10.3390/agronomy9050256>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M & Robledo, C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

- El Hage, F., Legland, D., Borrega, N., Jacquemot, M.P., Griveau, Y., Coursol, S., et al. (2018). Tissue lignification, cell wall p-coumaroylation and degradability of maize stems depend on water status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66:4800-4808. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05755>.
- Fu, C., Xiao, X., Xi, Y., Ge, Y., Chen, F., Bouton, J., Dixon, R.A & Wang, Z-Y. (2011). Downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) leads to improved saccharification efficiency in switchgrass. *BioEnergy Research*, 4:153-164. <https://doi.org/10.1007/s12155-010-9109-z>.
- Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C & Barrière, Y. (2004). Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies*, 327:455-465. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2004.02.009>.
- Gregersen, P.L., Culetic, A., Boschian, L., & Krupinska, K. (2013). Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology*, 82, 603-622. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0013-8>.
- Guillaumie, S., San-Clemente, H., Deswarte, C., Martinez, Y., Lapierre, C., Murigneux, A., Barrié, Y., Pichon, M & Goffner, D. (2007). Maizewall. Database and developmental gene expression profiling of cell wall biosynthesis and assembly in maize. *Plant physiology*, 143:339-363. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.106.086405>.
- Hu, J.Q., Qi, Q., Zhao, Y.L., Tian, X.-M., Lu, H., Gai, Y & Jiang, X.-N. (2019). Unraveling the impact of Pto 4CL1 regulation on the cell wall components and wood properties of perennial transgenic *Populus tomentosa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139:672-680. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.035>.

- Jacobsen, K.R., Fisher, D.G., Maretzki, A & Moore, P.H. (1992). Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. *Botanica Acta*, 105:70-80. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1992.tb00269.x>.
- Jeong, M.J., Bo, S.C., Dong, W.B., Shin, S.C & Bae, H. (2012). Differential expression of kenaf phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ortholog during developmental stages and in response to abiotic stresses. *Plant Omics*, 3:392-399. <https://www.researchgate.net/publication/233753274>.
- Jung, H.G & Engels, F.M. (2002). Alfalfa stem tissues: Cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Science*, 42:524-534. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.5240>.
- Jung, H.G & Casler, M.D. (2006). Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. *Crop Science*, 46:1793-1800. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.02-0085>.
- Jung, H.G & Deetz, D.A. (1993). Cell wall lignification and degradability. In: Jung H.G. (Ed) Forage cell wall structure and digestibility. *Soil Health and Sustainable Agriculture in Brazil*, 315-346. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c13>.
- Kondo, T., Watanabe, T., Ohshita, T & Kyuma, T. (1998). Physicochemical characteristics of soluble lignin fractions released from forage grasses by ruminant digestion. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 32:187-195. [https://www.jircas.go.jp/sites/default/files/publication/jarq/32-3-187-195\\_0.pdf](https://www.jircas.go.jp/sites/default/files/publication/jarq/32-3-187-195_0.pdf).



- Liu, Q., Luo, L & Zheng, L. (2018). Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19:335. <http://doi.org/10.3390/ijms19020335>.
- Mason, P.J., Furtado, A., Marquardt, A., Hodgson-Kratky, K., Hoang, N., Botha, F., Papa, G., Mortimer, J., Simmons, B & Henry, R. (2020). Variation in sugarcane biomass composition and enzymatic saccharification of leaves, internodes and roots. *Biotechnol Biofuels*,13:201. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01837-2>.
- Moura, J.C., Bonine, C.A., de Oliveira Fernandes, V.J., Dornelas, M.C & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses & changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52:360-376. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30: 36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H & Boerjan, W. (2004). Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3:29-60. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4>.
- Riboulet, C., Guillaumie, S., Mechin, V., Bosio, M., Pichon, M., Goffner, D., Lapiere, C., Pollet, B., Lefevre, B., Martinant, J.P, et al. (2009). Kinetics of phenylpropanoid gene expression in maize growing internodes: relationships with cell wall deposition. *Crop Science*, 49:211-223. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.03.0130>.

- Shadle, G., Chen, F., Reddy, M.S., Jackson, L., Nakashima, J & Dixon, R.A. (2007). Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: Shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality. *Phytochemistry*, 68:1521-1529. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.03.022>.
- Shen, H., Fu, C., Xiao, X., Ray, T., Tang, Y., Wang, Z & Chen, F. (2009). Developmental control of lignification in stems of lowland switchgrass variety Alamo and the effects on saccharification efficiency. *BioEnergy Research*, 2:233-245. <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9058-6>.
- Simon, B., Conner, J.A & Ozias-Akins, P. (2013). Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in apomictic and sexual *Cenchrus ciliaris*. *BMC Research Notes*, 6, 397. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-397>.
- Stabile, S., Bodini, A., Jank, L., Rennó, F., Santos, M & Silva, L. (2012). Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility. *Grass and Forage Science*, 67:43-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2011.00817.x>.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M.W., Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* 3:9-16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>.
- Tong, Z., Li, H., Zhang, R., Ma, L., Dong, J & Wang, T. (2015). Co-downregulation of the hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimate hydroxycinnamoyl transferase and coumarate 3-hydroxylase significantly increases cellulose content in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 239:230-237. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.005>.

- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J & Boerjan, W. (2010a). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153:895-905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>.
- Vanholme, R., Van Acker, R & Boerjan, W. (2010b). Potential of Arabidopsis systems biology to advance the biofuel field. *Trends in Biotechnology*, 28:543-547. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.008>.
- Van Acker, R., Vanholme, R., Storme, V., Mortimer, J.C., Dupree, P & Boerjan, W. (2013). Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels*, 6:46. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-46>.
- Voelker, S.L., Lachenbruch, B., Meinzer, F.C., Jourdes, M.Ki,C., Patten, A.M., Davin, L.B., Lewis, N.G., Tuskan, G.A & Gunter, L.(2010). Antisense down-regulation of *4CL* expression alters lignification, tree growth and saccharification potential of field-grown poplar. *Plant Physiology*, 154:874-886. <https://doi.org/10.1104/pp.110.159269>.
- Wang, J., Ma, L., Shen, Z., Sun, D., Zhong, P., Bai, Z., Zhang, H., Cao, Y., Bao, Y & Fu, C. (2017). Lignification of Sheepgrass Internodes at Different Developmental Stages and Associated Alteration of Cell Wall Saccharification Efficiency. *Frontiers in Plant Science*, 27:414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00414>.
- Weng, J. K & Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187:273-285. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x>.

Wu, J., Wang, X., Zhang, R., Fu, Q., Tang, F., Shi, F., Temuer, B & Zhang, Z. (2022). Comparative Transcriptome and Anatomic Characteristics of Stems in Two Alfalfa Genotypes. *Plants*, 11:2601. <https://doi.org/10.3390/plants11192601>.

Ziebell, A., Gracom, K., Katahira, R., Chen, F., Pu, Y., Ragauskas, A., Dixon, R.A & Davis, M. (2010). Increase in 4-coumaryl alcohol units during lignification in alfalfa (*Medicago sativa*) alters the extractability and molecular weight of lignin. *Journal of Biological Chemistry*, 285:38961-38968. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.137315>.

## CAPÍTULO 6

# ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES MORFO-AGRONOMICAS, ANATÓMICAS, DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DE CALIDAD FORRAJERA

### INTRODUCCIÓN

A pesar de la gran productividad de las gramíneas tropicales, es común observar que a medida que avanza el desarrollo de la planta se suscite una disminución del contenido de proteínas y aumento del contenido de fibra, asociado con el aumento en el contenido de lignina, lo que limita la digestibilidad de las mismas y consecuentemente, la producción de carne y leche (Stabile *et al.*, 2010). Numerosos autores han destacado la complejidad de realizar estudios sobre este último parámetro de calidad forrajera, que involucran factores como la edad de la planta, variables climáticas, la posición de los brotes y tipos de tejidos involucrados (Paciullo *et al.*, 2001; Paciullo *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2000).

La lignificación es considerada un proceso relevante en la bioquímica vegetal por su significativo impacto económico y papel central en el desarrollo de las plantas. La lignina es un heteropolímero compuesto por tres principales monómeros fenilpropanoides (monolignoles): alcohol p-cumarílico (p-hidroxifenilo), coniferílico (guayacilo) y sinapílico (siringilo) (Grabber, 2005).

Un análisis de correlación entre variables y su grado de asociación con los genotipos en diferentes estados de madurez nos permite comprender de manera más integrada toda la información generada identificando las variables de mayor peso y las que mejor expliquen el comportamiento de los genotipos. En este sentido, una técnica multivariada comúnmente utilizada para el análisis de numerosas variables simultáneamente es el análisis de componentes principales (ACP) (Abdi & Williams, 2010; Córdoba *et al.*, 2012). El análisis exploratorio multivariado, encuentra los pesos o ponderaciones para cada variable con el fin de

construir combinaciones lineales de variables capaces de maximizar la varianza (Córdoba *et al.*, 2012). Las combinaciones lineales obtenidas (CPs) son ortogonales (independientes) y en conjunto explican toda la variabilidad de los datos originales. La primera componente (CP1) explica la mayor parte de la variación total en el conjunto de datos y la segunda (CP2), la mayor parte de la variabilidad remanente o no explicada por la CP1 (Córdoba *et al.*, 2012). Este método reduce la dimensión del análisis, ya que permite analizar el conjunto de datos completo teniendo en cuenta varios factores de manera conjunta, es decir, los diferentes tratamientos, condiciones (Di Rienzo *et al.*, 2020). Las correlaciones entre los diferentes parámetros son exploradas por los ángulos entre vectores. Los ángulos agudos y obtusos indican correlación positiva y negativa, respectivamente, mientras que los ángulos rectos muestran ausencia de correlación entre las variables.

La composición química de las plantas, componentes fibrosos (como las fibras en detergente ácido y neutra) y lignina han sido correlacionados negativamente con la digestibilidad (Batistoti *et al.*, 2012). A su vez, diversos estudios en gramíneas forrajeras han demostrado asociación entre las características anatómicas y las composiciones químicas de las plantas forrajeras y su calidad nutricional (Batistoti *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014; Lista *et al.*, 2020), así como la influencia de sus estructuras anatómicas y composiciones químicas sobre la digestibilidad (Queiroz *et al.*, 2000; Wilson & Brown, 1991).

## **Hipótesis**

Existe asociación entre variables anatómicas, químicas y de expresión génica que explique la pérdida de calidad en materiales de *Megathyrus maximus* con el avance de la madurez ontogénica.

## **Objetivo General**

Establecer asociaciones entre caracteres moleculares, anatómicos, morfo-agrónomicos y de calidad forrajera evaluados en láminas y tallos de genotipos contrastantes de *M. maximus* en relación al avance de la madurez ontogénica.

## **Objetivos específicos**

Correlacionar caracteres orfo-agrónomicos, de calidad forrajera, anatómicos y moleculares evaluados en láminas y tallos de genotipos contrastantes de *M. maximus* con el avance de la madurez.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para cumplimentar este objetivo, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con variables morfo-agrónicas, de calidad forrajera, anatómicas y moleculares evaluadas en los capítulos anteriores en los genotipos contrastantes de *Megathyrsus maximus* (Vencedor y Green) con el avance de la madurez.

Las variables usadas para el ACP fueron:

### **Variables morfo-agronómicas**

Altura total de planta (AP) (cm) peso seco (PS) (g), área total de lámina (ATL) (cm<sup>2</sup>), largo de lámina (LL) (cm) y ancho de lámina (AL) (cm).

### **Variables de calidad forrajera**

Fibra detergente Neutra (FDN) (%), Lignina Detergente ácida con ácido sulfúrico, libre de cenizas (LDA) (%), desaparición *in situ* de la materia seca (DMS) (%).

### **Variables anatómicas**

Parénquima incoloro (PI), esclerenquima (Es), vaina de kranz (VK), las células buliformes (CB), epidermis (E) y clorénquima (C).

### **Variables moleculares**

4-cumarato-CoA ligasa (4CL), cinamoil-CoA reductasa (CCR), cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT), fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y ácido cafeico-O-metiltransferasa (COMT).

## **Análisis estadístico**

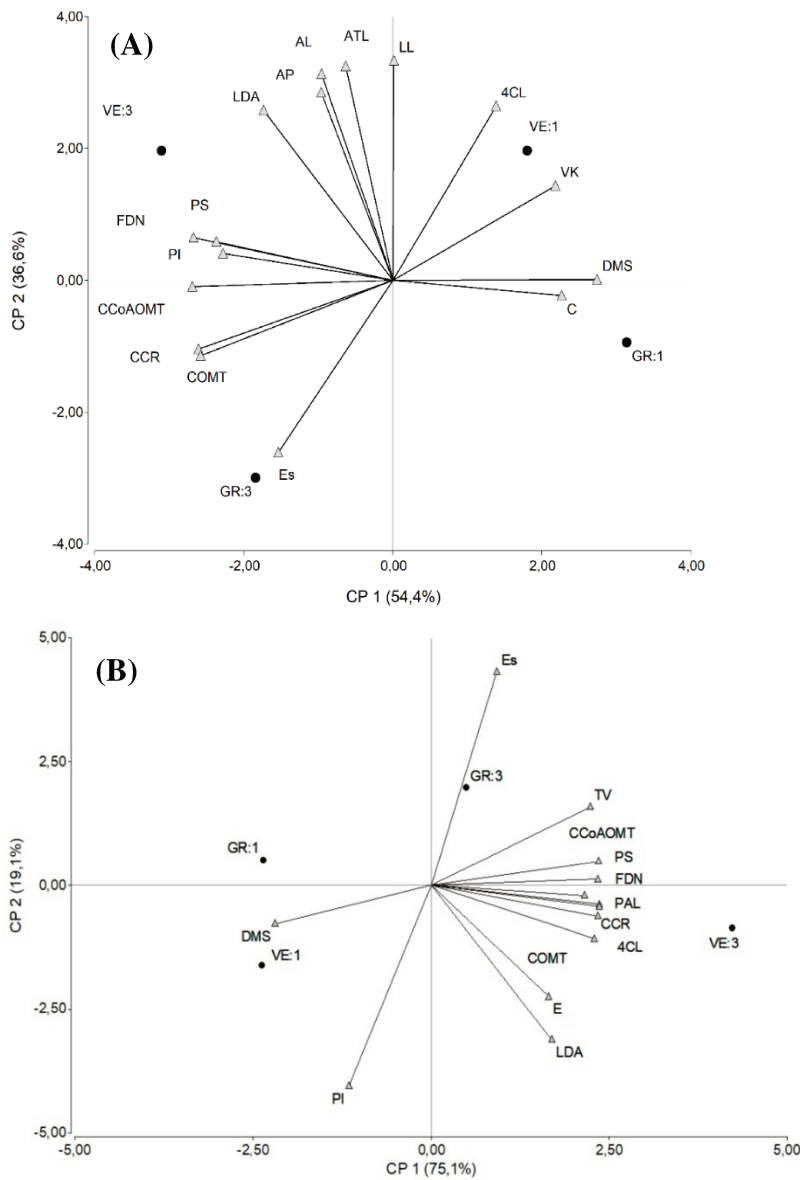
Para el ACP se estandarizaron los datos antes del análisis y los resultados se visualizan a través de gráficos biplot (Gabriel, 1971) construidos a partir del primer y segundo componente principal (CP1 y CP2) derivados del ACP. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

## RESULTADOS

Los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) del ACP explicaron el 91% de la variabilidad total en los datos obtenidos a partir de muestras de láminas foliares (coeficiente de correlación cofenética = 0,996; Fig. 11a). Al respecto, el CP1 del biplot (Fig. 11a) reveló que los parámetros LDA (-0,21), PI (-0,28), PS (-0,29), FDN (-0,33) se agruparon y correlacionaron con variables de expresión génica como CCR (-0,32), COMT (-0,32), CCoAOMT (-0,33) y orientaron al genotipo Vencedor en el tercer corte. Asimismo, estas variables estuvieron correlacionadas negativamente con VK (0,27), C (0,28) y DMS (0,34). Por otra parte, la CP2 reveló que AL (0,39), ATL (0,40), LL (0,41), AP (0,35) y 4CL (0,33) se correlacionaron positivamente entre ellas y negativamente con Es (-0,32).

Por otra parte, según los datos obtenidos a partir de muestras de tallos, los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) del ACP explicaron el 94,2% de la variabilidad total (coeficiente de correlación cofenética = 0,996; Fig. 11b). La CP1 del biplot (Fig. 11b) reveló que FDN (0,29), TV (0,30) y PS (0,32), se agruparon y correlacionaron con variables de expresión génica como COMT (0,31), CCR (0,32), CCoAOMT (0,32), PAL (0,32) y 4CL (0,32) para el tercer corte. Green Panic por su parte estuvo más asociado a Es y TV mientras que Vencedor con FDN, PS y ADL, COMT, CCR, CCoAOMT, PAL y 4CL. Asimismo, estas últimas variables correlacionaron negativamente con DMS (-0,29). Por otra parte, la CP2 reveló que LDA (-0,42), PI (-0,55) y Es (-0,58) se correlacionaron entre sí.





**Fig. 11.** Biplot que muestra las diferencias entre dos genotipos de *Megathyrus maximus* (Vencedor (VE) y Green Panic (GR)) en variables morfoagronómicas y de calidad forrajera, anatómicas y moleculares, obtenidas a partir de muestras de láminas foliares (A) y tallos (B) en dos cortes (corte 1 y corte 3) para los dos sitios experimentales (Córdoba y Manfredi). Abreviaturas: 4-cumarato-CoA ligasa (4CL); Ácido cafeico-O-metiltransferasa (COMT); Cinamoil-Co A reductasa (CCR); Cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT); fenilalanina amoniaco liasa (PAL); Parénquima Incoloro (PI); Clorénquima (C); Esclerénquima (Es); Vaina Kranz (VK); Tejido Vascular (TV); Epidermis (E); Altura de Planta (AP); Largo de Lámina (LL); Ancho Total de Lámina (ATL); Área de Lámina (AL); Peso Seco (PS); Fibra Detergente Neutra (FDN); Lignina Detergente Ácida (LDA); Desaparición en Materia Seca del saco ruminal (DMS).

## DISCUSIÓN

El ACP permitió observar la correlación entre características morfo-agronómicas, anatómicas y moleculares con parámetros asociados a calidad forrajera. En este estudio, se pudo establecer que la DMS estuvo altamente correlacionada con VK y clorénquima (C) en láminas foliares, las cuales estuvieron asociadas a ambos genotipos en el primer corte; esta asociación ha sido reportada por otros autores (Basso *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014). La VK es considerada una fuente importante de contenido celular debido a que contiene células ricas en proteínas fácilmente digeribles y el tejido C presenta una rápida degradabilidad y no forma barreras físicas para la digestión. Por otro lado, en nuestro estudio la correlación negativa exhibida por DMS con FDN, FDA, TV y Es, es mencionada en varios informes (Basso *et al.*, 2014; Bumb *et al.*, 2018; García *et al.*, 2021; Lista *et al.*, 2020). En este sentido, Brito *et al.* (2004) evaluaron la anatomía de hojas en plantas de *Brachiaria brizantha* y *B. humidicola* y encontraron mayor área de tejidos lignificados relacionada con menor digestibilidad. Además, Batistoti *et al.* (2012) mostraron que una alta proporción de FDN se correlacionó negativamente con la digestibilidad de la materia seca.

Por otro lado, hubo correlación positiva entre los genes relacionados con la biosíntesis de la lignina que habían incrementado significativamente su expresión del primer al tercer corte (CCR, COMT, CCoAOMT) con las variables LDA y FDN en torno al genotipo Vencedor para el tercer corte. El aumento en la expresión de enzimas codificantes para la biosíntesis de la lignina influye directamente en la calidad de las pasturas. Estudios realizados en genotipos de *Cenchrus ciliaris* L. sometidos a estrés hídrico permitieron evidenciar asociación entre la lignificación de los tejidos y el incremento en la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de la lignina (Carrizo *et al.*, 2021). Por otro lado, la asociación positiva observada entre la enzima 4CL con las variables de dimensiones de lámina (AL, ATL, LL) y AP en *Megathyrsus maximus* concuerda con los estudios de Voelker *et al.* (2010) donde señala que la regulación negativa de la coenzima A ligasa (4CL) podría ser una estrategia para reducir el contenido de lignina en las paredes celulares y aumentar las tasas de crecimiento. Este hecho podría explicarse debido a que la deposición de polisacáridos en la pared celular se da como resultado de la reducción del carbono demandado de la síntesis de la lignina.

En cuanto a los tallos, la asociación positiva entre variables de calidad forrajera (FDN, FDA) con la expresión de genes asociados a la biosíntesis de la lignina ha sido reportada en alfalfa por Wu *et al.* (2022). Estos autores identificaron un gran número de genes de la biosíntesis de la lignina con tendencia ascendente durante el desarrollo, lo que se relacionó directamente con la disminución de la calidad en los cultivares de alfalfa evaluados. En el presente trabajo, dicha asociación fue observada en el genotipo Vencedor, lo que podría implicar que con el avance de la madurez la elongación del tallo ejerce una translocación de carbono desde las láminas a las estructuras de soporte de las plantas, lo que en gramíneas forrajeras como *M. maximus* reduce la relación hoja/tallo y, en consecuencia, podría promover menor calidad del forraje. Estos resultados son exhibidos en otras pasturas tales como *Cynodon dactylon* (pasto Bermuda) (Cutrim *et al.*, 2013).

Por otro lado, la falta de asociación evidenciada entre el PS con la DMS podría explicarse por los grandes y significativos cambios en el desarrollo en genotipos como Vencedor. Resultados similares encontraron Stabile *et al.* (2012) en tallos de esta misma especie donde un mayor valor de cambio en la maduración fue asociado a una mayor producción de materia seca. Respecto de la correlación negativa de DMS con LDA y demás componentes fibrosos, es esperable, debido a que la lignina estructural de órganos y tejidos puede afectar la digestibilidad de la fibra como reportan diversos autores (Moore & Jung, 2001).

## CONCLUSIÓN

Se exploraron asociaciones entre parámetros morfo-agrónomicos y de calidad forrajera, anatómicos y moleculares evaluados en genotipos contrastantes de *Megathyrus maximus* relacionados con el avance de la madurez ontogénica. A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que, los dos genotipos contrastantes mostraron comportamiento diferencial de las variables analizadas entre los dos momentos de corte, siendo esas diferencias mayores en los estadios más tardíos. Para el primer corte, a nivel de lámina ambos genotipos correlacionaron positivamente con C, VK y DMS. Hubo asociación positiva entre la enzima 4CL con las variables de dimensiones de lámina (AL, ATL, LL) y AP. La regulación negativa de la coenzima A ligasa (4CL) es una estrategia para

reducir el contenido de lignina en las paredes celulares y aumentar las tasas de crecimiento. Para el tercer corte hubo correlación positiva entre los genes relacionados con la biosíntesis de la lignina que habían incrementado diferencialmente su expresión del primer al tercer corte (CCR, COMT, CCoAOMT) con las variables LDA y FDN en torno al genotipo Vencedor, no evidenciándose este comportamiento en el genotipo Green Panic. En cuanto a los tallos, hubo asociación positiva entre variables de calidad forrajera (FDN, FDA) con la expresión de genes asociados a la biosíntesis de la lignina. La tendencia ascendente de estos genes durante el desarrollo se correlacionó directamente con la disminución de la calidad y dicha asociación fue observada con mayor repercusión en el genotipo Vencedor. Al analizar simultáneamente toda la información generada, se puede concluir que la madurez ejerce influencia sobre la composición de tejidos de las láminas y tallos en mayor medida en el genotipo Vencedor. Esto puede ser debido a que este genotipo presenta mayores cambios en la digestibilidad con el avance de la madurez.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, H & Williams, L.J. (2010). Principal component analysis. Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics, 2:433-459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- Batistoti, C., Lempp, B., Jank, L., Morais, M. das G., Cubas, A.C., Gomes, R.A & Ferreira, M.V.B. (2012). Correlations among anatomical, morphological, chemical and agronomic characteristics of leaf blades in *Panicum maximum*. Genotypes. Animal Feed Science and Technology, 171:173-180. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.11.008>.
- Basso, K.C., Cecato, U, Barbero, L.M., Lempp, B., Gomes, J.A.M & Lugão, S.M.B. (2014). Influence of nitrogen levels on leaf anatomy and nutritive value of millennium grass. Bioscience Journal, 30:792-802. <https://www.researchgate.net/publication/283915147>.

Bottcher, A., Cesarino, I., dos Santos, A.B., Vicentini, R., Mayer, J.L.S., Vanholme, R., Morreel, K., Goeminne, G., Nobile, P.M & Moura, J.C.M.S. (2013). Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. *Plant Physiology*, 163:1539-57. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225250>.

Brito, C.J.F.A., Rodella, R.A & Deschamps, F.C. (2004). Anatomia quantitativa da folha e do colmo de *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. *Revista Brasileira de Zootecnia* <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000300001>.

Bumb, I., Garnier, E., Coq S., Nahmani, J., Del Rey Granado, M., Gimenez, O & Kazakou, E. (2018). Traits determining the digestibility-decomposability relationships in species from Mediterranean rangelands. *Annals of Botany*, 5;121(3):459-469. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx175>.

Carrizo, I.M., López Colomba, E., Tommasino, E., Carloni, E., Bollati, G & Grunberg, K. (2021). Contrasting adaptive responses to cope with drought stress and recovery in *Cenchrus ciliaris* L. and their implications for tissue lignification. *Physiologia Plantarum*, 172:762-779. <https://doi.org/10.1111/ppl.13274>.

Córdoba, M., Bruno, C., Balzarini, M & Costa, J.L. (2012). Análisis de componentes principales con datos georreferenciados: Una aplicación en agricultura de precisión. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 44:27-39. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1853-86652012000100003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652012000100003&lng=es&nrm=iso).

Cutrim Jr., J.A.A., Cavalcante, A.C.R., Cândido, M.J.D., Silva, G.L., Oliveira, L.E.V., Vasconcelos, E.C.G & Mesquita, T.M.O. (2013). Biomass flow in Tifton-85 bermudagrass canopy subjected to different management

strategies under rotational grazing with dairy goats. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42:2. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982013000200001>.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M & Robledo, C.W. (2020). *InfoStat versión*. (2020). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Gabriel, K.R. (1971). The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, 58:453-467. <https://doi.org/10.2307/2334381>.

Garcia, L.F., Silva, G.P., Geremia, E.V., Goulart, L.B.L., Dias, C.T.S & Da Silva, S.C. (2021). Central rib and the nutritive value of leaves in forage grasses. *Scientific Reports*, 11:5440. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84844-z>.

Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C & Barrière, Y. (2004). Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies*, 327:455-465. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.02.009>.

Grabber, J. H. (2005). How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*, 45:820-831. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0191>.

Lista, F.N., Neto, E.J.V., Carvalho, A.J.C., Deminicis, B.B, Rocha, D.R Y Difante, G.S. (2020). Nutritive value and anatomical characterization from *Pennisetum purpureum* genotypes. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42:1807-1886. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.53064>.

Moore, K.J & Jung, H.G. (2001). Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management*, 54:420-430. <https://journals.uair.arizona.edu/index.php/jrm/article/viewFile/9640/9252>.

Paciullo, D.S.C., Gomide, J.A., Queiroz, D.S & Silva, E.A.M. (2001). Correlações entre Componentes Anatômicos, Químicos e Digestibilidade In Vitro da Matéria Seca de Gramíneas Forrageiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30:955-963. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000400008>.

Paciullo, D.S.C., Gomide, J.A., Silva, E.A.M.d., Queiroz, D.S & Gomide, C.A. M. (2002). Degradação in vitro de tecidos da lâmina foliar e do colmo de gramíneas forrageiras tropicais, em função do estágio de desenvolvimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31:900-907. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000400013>.

Queiroz, D.S., Gomide, J.A & Maria, J. (2000). Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras: 1. Digestibilidade in vitro e composição química. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29:53-60. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100008>.

Santos, F.C., Freitas, A.S., De Castro, E.M., Davide, L.C., Souza Sobrinho, F & Tech, V.H. (2014). Leaf anatomy and nutritive values of *Brachiaria ruziziensis* genotypes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 57:128-135. <https://doi.org/10.1080/00288233.2014.897237>.

Stabile, S.S., Salazar, D.R., Jank, L., Rennó, F.P & Silva, L.F.P. (2010). Characteristics of nutritional quality and production of genotypes of guineagrass harvested in three maturity stages. *Brazilian Journal of Animal Science*, 39:1418-1428. [www.sbz.org.br](http://www.sbz.org.br).

Stabile, S., Bodini, A., Jank, L., Rennó, F., Santos, M & Silva, L. (2012). Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility *Grass and Forage Science*, 67:43-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2011.00817.x>.

- Voelker, S.L., Lachenbruch, B., Meinzer, F.C., Jourdes, M, Ki C., Patten, A.M., Davin, L.B., Lewis, N.G., Tuskan, G.A & Gunter, L. (2010). Antisense down-regulation of *4CL* expression alters lignification, tree growth and saccharification potential of field-grown poplar. *Plant Physiology*, 154: 874-886. <https://doi.org/10.1104/pp.110.159269>.
- Wilson, J.R & Brown, R.H. (1991). Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 39:31-48. <https://doi.org/10.18174/njas.v39i1.16551>.
- Weng, J.K., Li, X., Bonawitz, N.D & Chapple, C. (2008). Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion Biotechnology*, 19:166-172. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.014>.
- Wu, J., Wang, X., Zhang, R., Fu, Q., Tang, F., Shi, F., Temuer, B & Zhang, Z. (2022). Comparative Transcriptome and Anatomic Characteristics of Stems in Two Alfalfa Genotypes. *Plants*, 11:2601. <https://doi.org/10.3390/plants11192601>.



## DISCUSIONES GENERALES

En los últimos años se han generado cambios en la producción de carne bovina en Argentina, los cuales son el resultado de la competencia del ganado con otros productos agrícolas, por la tierra, recursos naturales y severas restricciones climáticas (Arelovich *et al.*, 2011). La mayoría de la producción de carne bovina se encuentra en la región Pampeana y la región del Noroeste Argentino. A partir del avance de la frontera agrícola se ha registrado en la zona un proceso de concentración productiva de cría y recria de ganado bovino, la cual se desarrolla principalmente sobre pasturas naturales y en menor proporción sobre pasturas implantadas, siendo la limitante más importante la baja productividad de los pastizales y la consecuente reducción en la carga animal debido a las limitaciones edafo-climáticas de la región (Rearte, 2011). *Megathyrsus maximus* es una de las principales especies forrajeras cultivadas en esta zona (Brizuela & Cangiano, 2011), la cual es una gramínea promisorio por su valor nutritivo y por mostrar diversidad entre cultivares en cuanto a rendimiento, calidad forrajera y respuesta a la fertilización con nutrientes (Benabderrahim & Elfalleh, 2021).

El presente germoplasma constituye un importante grupo de diversidad para análisis genéticos adicionales, ya que se pudo identificar variabilidad genética. La evaluación de la variabilidad genética mediante técnicas moleculares es muy importante en un programa de mejoramiento genético y es una herramienta complementaria a la evaluación morfo-agronómica, la que se encuentra influenciada por el ambiente (Cubero, 1999).

Nuestros resultados mostraron que los ISSR fueron marcadores con gran capacidad para producir bandas polimórficas, lo que está de acuerdo con informes previos en *Chloris gayana* (Ribotta *et al.*, 2019), *Chrysanthemum morifolium* (Shao *et al.*, 2010), *Cynodon arcuatus* (Huang *et al.*, 2013) y *Prunus armeniaca* (Li *et al.*, 2014). Este tipo de marcadores también ha servido para evaluar diferencias genéticas entre un grupo de genotipos antiguos recolectados de un mismo lugar, los cuales mostraron variabilidad genética (Pittaro *et al.*, 2015). El análisis de conglomerados realizado a partir de la técnica ISSR confirmó que los genotipos evaluados en este estudio eran todos diferentes, aunque se detectó proximidad genética entre dos de ellos (Gatton Panic y Penquero). Esto podría deberse a que este último genotipo deriva del primero y podría ser el resultado de

una adaptación constante a las condiciones ecológicas y edafoclimáticas a las que están expuestas las plantas. Al respecto, Li *et al.* (2011) sugieren la existencia de un grado de asociación entre el polimorfismo molecular y el origen geográfico, en la que genotipos que crecen en un ambiente similar tienden a agruparse.

Los materiales presentaron igual nivel de ploidía y hubo poca variación intra-específica en el contenido de ADN nuclear; esta variación debería ser interpretada con cautela, sin considerar a éste como un cambio en el nivel de ADN ploidía, ya que esto ha sido observado en otras gramíneas (Burson *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 1998). Se sugiere, por lo tanto, continuar con estudios citológicos en los que se pueda determinar el número cromosómico de los genotipos en estudio, ya que, aunque la citometría de flujo es un método confiable y una herramienta de investigación de uso común en la investigación genética de plantas (Loureiro, 2009), la citología y el recuento de cromosomas siguen siendo los métodos más precisos (Ollitrault-Sammarcelli *et al.*, 1994). El conocimiento del nivel de ploidía de cada citotipo es de mucha importancia para la planificación y manejo de los materiales en un programa de mejoramiento genético. Analizar el valor nutricional y los cambios en la anatomía de láminas y los tallos con el avance de la madurez podría ayudar a determinar el potencial productivo y la calidad nutricional del forraje. La madurez tuvo efecto negativo en la calidad nutricional de *M. maximus*, ya que los genotipos mostraron menores porcentajes de desaparición de materia seca (DMS) de láminas y tallos y un aumento en los porcentajes de Fibra Detergente Ácida (FDA) y Fibra Detergente Neutra (FDN) a medida que avanza el estado ontogénico en mayor medida en tallos que en láminas. Estas apreciaciones pueden deberse a que las láminas consisten principalmente en células de parénquima, mientras que los tallos tienen más células de esclerénquima. Velázquez-Martínez *et al.* (2022) y Wang *et al.* (2017) observaron conclusiones similares.

En este estudio, la Lignina Detergente Ácida (LDA) se depositó diferencialmente en las láminas de los genotipos de *M. maximus* En Vencedor y Penquero aumentó con la etapa fenológica, mientras que permaneció sin cambios en Green Panic, Gatton Panic y Mutale. Al respecto, el mayor contenido de lignina acumulado en la etapa reproductiva es un fenómeno muy común en las especies forrajeras, como lo mencionan varios autores (Lev-Yadun, 2010; King *et al.*, 2013). Los resultados descritos para Green Panic, Gatton Panic y Mutale pueden sugerir que el proceso de lignificación comenzó antes del primer corte y cuando se iniciaron los primeros

cortes, la división de carbono ya se había fijado a la pared celular. Se encontraron resultados similares en los estudios de caña de azúcar (Mason *et al.*, 2020). Estos autores muestran un rápido aumento en el contenido de lignina durante la etapa de alargamiento progresivo, mientras que se observaron cantidades constantes durante las siguientes etapas, ya que el proceso de lignificación comienza antes del final del proceso de alargamiento en algunos genotipos de caña de azúcar. Además, se sabe que la deposición de lignina en las paredes celulares vegetales se regula a través del desarrollo y que también puede verse afectada por condiciones ambientales como el estrés biótico y abiótico (Moura *et al.*, 2010). Se requieren estudios adicionales para evaluar a nivel anatómico el depósito y distribución de células lignificadas durante el desarrollo de las láminas. La LDA en los tallos aumentó con la etapa fenológica en los cinco genotipos evaluados, con los valores más altos observados en los genotipos de Gatton Panic, Vencedor y Mutale. Este aumento puede explicarse por el hecho de que sus entrenudos lignificaron sus tejidos en porcentajes más altos que en los otros genotipos en la etapa reproductiva. Wang *et al.* (2017) mencionaron conclusiones similares. Estos autores observaron un aumento continuo en la acumulación de lignina y un cambio significativo en su composición en los entrenudos en las etapas reproductivas. Además, varios informes mostraron que el crecimiento de forraje se acompaña de un aumento del contenido de lignina con el engrosamiento secundario de la pared celular, lo que limita la digestión de la pared por los rumiantes (Mauri *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2022).

Al analizar los genotipos Vencedor y Green Panic en relación al avance de la madurez se pudieron observar escasas y no significativas modificaciones a nivel de calidad en los dos primeros cortes (estado vegetativo y pre-floración) mientras que estos cambios sí fueron evidentes en el último corte (estado reproductivo). El menor valor nutritivo en una determinada etapa de madurez en los forrajes tropicales se atribuye principalmente a una relación hoja-tallo relativamente baja y a las rápidas tasas de maduración (Jones, 1985). Por otra parte, en el análisis de componentes principales en el primer corte, ambos genotipos correlacionaron positivamente con clorénquima (C), vaina de kranz (VK) y desaparición de la materia seca (DMS). VK es considerado una fuente importante de contenido celular debido a que contiene células ricas en proteínas fácilmente digeribles y el tejido C presenta una rápida degradabilidad y no forma barreras físicas para la digestión. Asimismo, se evidenció asociación positiva entre la enzima 4CL con

las variables de dimensiones de lámina (ancho, largo y superficie) y la altura de planta. En este sentido, la regulación negativa de la coenzima A ligasa (4CL) podría ser una estrategia para reducir el contenido de lignina en las paredes celulares y aumentar las tasas de crecimiento como es mencionado por Voelker *et al.* (2010). Para el tercer corte, hubo correlación positiva entre los genes relacionados con la biosíntesis de la lignina que habían incrementado diferencialmente su expresión del primer al tercer corte con las variables LDA y FDN en torno al genotipo Vencedor. El aumento en la expresión de enzimas codificantes para la biosíntesis de la lignina influye directamente en la calidad de las pasturas. Estudios realizados en genotipos de *Cenchrus ciliaris* L. sometidos a estrés hídrico permitieron evidenciar asociación entre la lignificación de los tejidos y el incremento en la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de la lignina (Carrizo *et al.*, 2021).

En cuanto a los tallos, se observó asociación positiva entre variables de calidad forrajera (FDN, FDA) con la expresión de genes asociados a la biosíntesis de la lignina, en Vencedor en mayor medida. Al respecto Wu *et al.* (2022) identificaron un gran número de genes de la biosíntesis de la lignina con tendencia ascendente durante el desarrollo, lo que se relacionó directamente con la disminución de la calidad en los cultivares de alfalfa evaluados. El aumento en la expresión de todos los genes asociados al proceso de lignificación a nivel de tallos observados en el genotipo Vencedor es concordante con el obtenido a nivel de LDA, cuyos valores fueron mayores respecto de Green Panic. Este comportamiento diferencial podría deberse a que, en cada momento del corte, Vencedor estaba en pleno desarrollo y exhibió rápida disminución de la calidad con el avance de la madurez. Resultados similares fueron encontrados en tallos de caña de azúcar por Bottcher *et al.* (2013) y en *Megathyrsus maximus* por Stabile *et al.* (2012). Es recomendable, en base a los resultados mostrados, pastorear este genotipo en estados tempranos (vegetativo y prefloración) para evitar ofrecer pasturas lignificadas. El genotipo Green Panic exhibió menores cambios en la expresión de enzimas claves de la biosíntesis de la lignina, lo que podría sugerir que la lignificación comenzó más temprano en los haces vasculares de los entrenudos jóvenes, mientras que la deposición de lignina en otros tejidos como la epidermis, la hipodermis y el parénquima de almacenamiento fue realizado en tiempos más tardíos durante el ciclo del cultivo. Estos resultados son consecuentes con los resultados de diversos autores en otros cultivos vegetales (Casu *et al.*,

2007; Jacobsen *et al.*, 1992). El comportamiento diferencial entre los dos genotipos también podría ser el resultado de variaciones en la composición de la lignina, ya que se ha demostrado que es un factor importante que influye en la calidad, ya que la lignina rica en S se degrada más fácilmente que la lignina rica en G porque el grupo metoxi en la posición C-5 de las unidades S evita la formación de un enlace carbono-carbono resistente a la degradación en esta posición (Ziebell *et al.*, 2010). Se hace necesario la realización de estudios histoquímicos que revelen los aumentos de unidades G y S para discriminar en mejor medida a los genotipos de nuestra especie y ver la influencia directa en la calidad del forraje.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Arelovich, H., Bravo, R & Martínez, M. (2011). Development, characteristics, and trends for beef cattleproduction in Argentina. *Animal Frontiers*, 1:37-45. <https://doi.org/10.2527/af.2011-0021>.

Benabderrahim, M.A & Elfalleh, W. (2021). Forage potential of non-native guinea grass in North African agroecosystems: genetic, agronomic and adaptive traits. *Agronomy*, 11:1071. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061071>.

Bottcher, A., Cesarino, I., dos Santos, A.B., Vicentini, R., Mayer, J.L.S., Vanholme, R., Morreel, K., Goeminne, G., Nobile, P.M & Moura, J.C.M.S. (2013). Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. *Plant Physiology*, 163:41539-41557. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225250>.

Brizuela, M.A & Cangiano, C.A. (2011). Especies forrajeras cultivadas en Argentina. Pages 31-62 in *Producción Animal en Pastoreo*. C. A. Cangiano and M. A. Brizuela, ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina.

- Burson, B.L., Actkinson, J.M., Hussey, M.A & Jessup, R.W. (2012). Ploidy determination of buffel grass accessions in the USDA National Plant Germplasm System collection by flow cytometry. *South African Journal of Botany*, 79:91-95. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.12.003>.
- Carrizo, I.M., López Colomba, E., Tommasino, E., Carloni, E., Bollati, G & Grunberg, K. (2021). Contrasting adaptive responses to cope with drought stress and recovery in *Cenchrus ciliaris* L. and their implications for tissue lignification. *Physiologia Plantarum*, 172:762-779. <https://doi.org/10.1111/ppl.13274>.
- Casu, R.E., Jarmey, J.M., Bonnett, G.D & Manners, J.M. (2007). Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. *Functional & Integrative Genomics*, 7:153-167. <https://doi.org/10.1007/s10142-006-0038-z>.
- Cubero, J.I. (1999). Variedades sintéticas. En: *Introducción a la Mejora Genética Vegetal*. Mundi-Prensa. Madrid, España, 145-153.
- Huang, C., Liu, G., Bai, C & Wang, W. (2013). Genetic relationships of *Cynodon arcuatus* from different regions of China revealed by ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 162:172-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.039>.
- Jacobsen, K.R., Fisher, D.G., Maretzki, A & Moore, P.H. (1992). Developmental changes in the anatomy of the sugarcane stem in relation to phloem unloading and sucrose storage. *Botanica Acta*, 105:70-80. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1992.tb00269.x>.

- Jones, C.A. (1985). C4 grasses and cereals, growth, development and stress response. New York: John Wiley & Sons.
- King, C., Mceniry, J., Richardson, M & O'Kiely, P. (2013). Characterization for industrial purposes of the fibre anatomy of perennial ryegrass and tall fescue stem and leaf at three stages in the primary growth. *Grass and Forage Science*, 69:64-73. <https://doi.org/doi:10.1111/gfs.12032>.
- Lev-Yadun, S. (2010). Plant fibers: Initiation, growth, model plants and open questions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57:305-315. <https://doi.org/10.1134/S1021443710030015>.
- Li, H., Liu, L., Lou, Y., Hu, T & Fu, J. (2011). Genetic diversity of Chinese natural bermudagrass (*Cynodon dactylon*) germplasm using ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 127:555-561. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.001>.
- Li, M., Zhao, Z & Miao, X. (2014). Genetic diversity and relationships of apricot cultivars in North China revealed by ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 173:20-28. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.04.030>.
- Loureiro, J. (2009). Flow cytometric approaches to study plant genomes. *Ecosistemas*, 18:103-108. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012144011>.
- Lu, K., Kaeppler, S.W., Vogel, K., Arumuganathan, K & Lee, D.J. (1998). Nuclear DNA content and chromosome numbers in switchgrass. *Great Plains Research: A Journal of Natural and Social Sciences*, 8:269-280. [https://digitalcommons.unl.edu/greatplainsresearch/396?utm\\_source=digitalcommons.unl.edu%2Fgreatplainsresearch%2F396&utm\\_medium=PDF&utm\\_campaign=PDFCoverPages](https://digitalcommons.unl.edu/greatplainsresearch/396?utm_source=digitalcommons.unl.edu%2Fgreatplainsresearch%2F396&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages).

- Mason, P.J., Furtado, A., Marquardt, A., Hodgson-Kratky, K., Hoang, N., Botha, F., Papa, G., Mortimer, J., Simmons, B & Henry, R. (2020). Variation in sugarcane biomass composition and enzymatic saccharification of leaves, internodes and roots. *Biotechnol Biofuels*,13:201. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01837-2>.
- Mauri, J., Pereira, D.L., Silva, G.A., Davide, L.C., Techio, V.H., Souza, F & Pereira, F.J. (2019). Forage potential of *Urochloa* genotypes by using leaf anatomy. *Ciencia Rural*, 49:4. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170266>.
- Moura, J.C., Bonine, C.A., de Oliveira, V.J., Dornelas, M.C & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses & changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52:360-376. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x>.
- Ollitrault-Sammarcelli, E., Legave, J.M., Michaux-Ferriere, N & Hirsch, A.M. (1994). Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actmidium*. *Scientia Horticulturae*, 57:303-313. <https://doi.org/10.1016/S0304-4238%2894%2990113-9>.
- Pittaro, G., Cáceres, L., Bruno, C., Tomás, A., Bustos, D., Monteoliva, M., Ortega, L & Taleisnik, E. (2015). Salt tolerance variability among stress-selected *Panicum coloratum* cv. Klein plants. *Grass and Forage Science*, 71:683-698. <https://doi.org/10.1111/gfs.12206>.
- Rearte, D.H. (2011). El rol de las pasturas cultivadas y pastizales en el nuevo escenario de la ganadería argentina. En: *Producción animal en pastoreo* (Ed. INTA Balcarce), Argentina,13-29.
- Ribotta, A., López Colomba, E., Bollati G., Striker, G, Carloni, E., Griffa, S., Quiroga, M., Tommasino, E & Grunberg, K. (2019). Agronomic and molecular characterization of *Chloris gayana* cultivars and salinity response during germination and early vegetative growth. *Tropical Grasslands-Forrajeros Tropicales*, 7:14-24. [https://doi.org/10.17138/tgft\(7\)14-24](https://doi.org/10.17138/tgft(7)14-24).



- Shao, Q.S., Guo, Q.S., Deng, Y.M & Guo, H.P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38:1160-1169. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.11.002>.
- Stabile, S., Bodini, A., Jank, L., Rennó, F., Santos, M & Silva, L. (2012). Expression of genes from the lignin synthesis pathway in guineagrass genotypes differing in cell-wall digestibility. *Grass and Forage Science*, 67:43-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2011.00817.x>.
- Velázquez, M., Rodríguez, L.T., Rojas, A.R., Enríquez, J.F., Hernández, F., Ramírez, S.G & Hernández, F.J. (2022). Morphology and forage quality in buffel, rhodes, and blue grama grasses in Valle del Mezquital. *Agro Productividad*, 15:2158.
- Voelker, S.L., Lachenbruch, B., Meinzer, F.C., Jourdes, M, Ki C., Patten, A.M., Davin, L.B., Lewis, N.G., Tuskan, G.A & Gunter, L. (2010). Antisense down-regulation of *4CL* expression alters lignification, tree growth and saccharification potential of field-grown poplar. *Plant Physiology*, 154: 874-886. <https://doi.org/10.1104/pp.110.159269>.
- Wang, J., Ma, L., Shen, Z., Sun, D., Zhong, P., Bai, Z., Zhang, H., Cao, Y., Bao, Y & Fu, C. (2017). Lignification of Sheepgrass Internodes at Different Developmental Stages and Associated Alteration of Cell Wall Saccharification Efficiency. *Frontiers in Plant Science*, 27:414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00414>.
- Wu, J., Wang, X., Zhang, R., Fu, Q., Tang, F., Shi, F., Temuer, B & Zhang, Z. (2022). Comparative Transcriptome and Anatomic Characteristics of Stems in Two Alfalfa Genotypes. *Plants*, 11:2601. <https://doi.org/10.3390/plants11192601>.

Ziebell, A., Gracom, K., Katahira, R., Chen, F., Pu, Y., Ragauskas, A., Dixon, R.A & Davis, M. (2010). Increase in 4-coumaryl alcohol units during lignification in alfalfa (*Medicago sativa*) alters the extractability and molecular weight of lignin. *Journal Biological Chemistry*, 285:38961-38968. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.137315>.