

## NIVEL DE ADN-PLOIDÍA EN POBLACIONES SUDAMERICANAS Y NORTEAMERICANAS DE LA GRAMÍNEA NATIVA DISYUNTA *Trichloris crinita* (CHLORIDOIDEAE, POACEAE)

CARLONI, E. J.<sup>1\*</sup>; QUIROGA, R. E.<sup>2,3\*</sup>;

GRUNBERG, K. A.<sup>1,4</sup> & PREMOLI, A. C.<sup>5</sup>

### RESUMEN

*Trichloris crinita* es una gramínea nativa de distribución disyunta que habita regiones áridas y semiáridas de Sud y Norteamérica. Trabajos previos mostraron uniformidad en el nivel de ploidía en poblaciones sudamericanas de la especie ( $2n = 4x = 40$ ); sin embargo, se desconocen valores de referencia para poblaciones norteamericanas. En el presente trabajo se implementó un protocolo para cuantificar el contenido de ADN nuclear (indicador de ADN-ploidía) mediante citometría de flujo, y comparar dicho valor en 22 poblaciones provenientes de Sudamérica (15) y Norteamérica (7). No se encontraron diferencias de contenido de ADN nuclear entre poblaciones sudamericanas y norteamericanas (valor  $2C$  promedio = 1,97 pg) y tampoco entre poblaciones dentro de cada uno de dichos subcontinentes, sugiriendo que todas presentan el mismo nivel de ploidía. Estos resultados proporcionan datos de referencia sobre el contenido de ADN nuclear de *T. crinita* a lo largo de su rango en Sud y Norteamérica.

*Palabras clave:* citometría de flujo, disyunción anfitropical, nivel de ploidía, Norteamérica, gramínea forrajera nativa, Sudamérica.

1.- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, Centro de Investigaciones Agropecuarias, Av. 11 de Septiembre 4755. X5014MGO - Córdoba, Argentina.

2.- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Catamarca, Ruta Provincial 33 Km 4. CP4700 - Catamarca, Argentina.

3.- Cátedra de Manejo de Pastizales Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Catamarca. Maestro Quiroga 50. CP4700 – Catamarca, Argentina.

4.- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290. C1425FQB - CABA, Argentina.

5.- INIBIOMA, CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, Bariloche - 8400, Argentina

\*Contribuyeron igualmente al presente artículo (e-mails de contacto: edgardocarloni@gmail.com, quiroga.raul@inta.gob.ar).

Manuscrito recibido el 26 de marzo de 2020 y aceptado para su publicación el 29 de mayo de 2020.

Carlóni, E.J.; Quiroga, R.E.; Grunberg, K.A.; Premoli, A.C. Nivel de ADN-ploidía en poblaciones sudamericanas y norteamericanas de la gramínea nativa disyunta *Trichloris crinita* (Chloridoideae, Poaceae).

FAVE - Ciencias Agrarias 20 (1): 219-227. CC BY-NC-SA 4.0

## ABSTRACT

### DNA-ploidy level in South American and North American populations of the native disjunct grass *Trichloris crinita*.

*Trichloris crinita* is a native grass with a naturally disjunct distribution inhabiting arid and semi-arid regions of South and North America. Previous studies documented a uniform ploidy level in South American populations of the species ( $2n = 4x = 40$ ); however, no reference values are known for North American populations. In the present work, a protocol was implemented in the species to quantify the nuclear DNA content (DNA-ploidy indicator) by flow cytometry, and this value was compared in 22 populations from South America (15) and North America (7). No differences in nuclear DNA content were found between South American and North American populations (average  $2C$  value = 1,97 pg) neither among populations within each continent, suggesting that they all present the same ploidy level. These results provide reference values for the nuclear DNA content of *T. crinita* in South and North America.

*Key words:* amphitropical disjunct, flow cytometry, native forage grass, North America, ploidy level, South America.

## INTRODUCCIÓN

*Trichloris crinita* (Lag.) Parodi (Chloridoideae, Poaceae) es una gramínea nativa perenne, distribuida naturalmente de forma disyunta en regiones áridas y semiáridas de Sud y Norteamérica (Peterson *et al.*, 2007). En ambos subcontinentes, la especie es promovida en planes de restauración de ambientes degradados (Kozub *et al.*, 2018; USDA-NRCS, 2007). En zonas áridas y semiáridas de Argentina, debido a su tolerancia a la sequía y su aptitud forrajera, es una especie recomendada para la restauración de campos ganaderos impactados por sobrepastoreo (Blanco *et al.*, 2013; Quiroga *et al.*, 2009). Estudios previos han evaluado la biología reproductiva en poblaciones argentinas de la especie (Gutiérrez *et al.*, 2016; Kozub *et al.*, 2017), diversidad genética (Cavagnaro *et al.*, 2006) y de caracteres adaptativos (Greco y Cavagnaro, 2003; Marinoni *et al.*, 2018; Quiroga *et al.*, 2010;

Zabala *et al.*, 2011) y productivos (Gil Báez *et al.*, 2015; Greco y Cavagnaro, 2005).

Uno de los aspectos básicos en la ecología de poblaciones de plantas nativas es conocer si existe variabilidad intraespecífica en el nivel de ploidía (Lučanová, 2019). Recientemente, diferentes estudios citogenéticos combinando análisis de citogenética clásica y molecular realizados en 20 poblaciones argentinas de *T. crinita* han demostrado que las mismas presentan igual nivel de ploidía  $2n = 4x = 40$  (Kozub *et al.*, 2019). No obstante, variaciones intraespecíficas en el nivel de ploidía han sido reportadas en la subfamilia Chloridoideae (De Silva y Snaydon, 1995; Nakagawa *et al.*, 1987). En general, estas variaciones son de suma importancia en estudios de restauración ya que podrían traer aparejada la adaptación a diferentes condiciones ambientales (Husband *et al.*, 2013; Lučanová, 2019). En este sentido, un trabajo previo ha demostrado que las poblaciones de *T. crinita* de Sudamérica tienden

a distribuirse en ambientes menos áridos y calientes que las poblaciones de Norteamérica (en promedio, +200 mm de precipitación anual y -1,5°C de temperatura media anual, Quiroga *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta lo mencionado y al no encontrar registros en los niveles de ploidía para las poblaciones de Norteamérica, surge la inquietud de conocer si poblaciones de áreas geográficas disjuntas que abarcan climas diferentes presentan, a su vez, niveles de ploidía diferentes.

Una alternativa disponible para realizar estudios taxonómicos es la citometría de flujo (CMF) (Lysák y Doležel, 1998; Marie y Brown, 1993). La técnica permite cuantificar el contenido de ADN nuclear de una planta (valor 2C) y a partir de ello inferir el nivel de ploidía (Doležel *et al.*, 2007; Greilhuber *et al.*, 2005). Una de las principales ventajas de la CMF, con respecto al método clásico, es que no necesita células en división del material vegetal (Doležel *et al.*, 2007). Además, los protocolos utilizados son sencillos y rápidos, lo que permite el análisis de numerosas muestras por día (Loureiro *et al.*, 2006; Otto, 1990). La interpretación de los resultados, en términos de 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). Cuando el nivel de ploidía es inferido sólo mediante CMF, los resultados deben distinguirse de los estudios cariológicos, por lo cual se utiliza el término ploidía del ADN (ADN-ploidía; Suda *et al.*, 2006).

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) desarrollar un protocolo para cuantificar el contenido de ADN nuclear y ii) comparar el nivel de ploidía del ADN en diferentes poblaciones de *T. crinita* provenientes de Sudamérica y Norteamérica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se evaluaron poblaciones existentes en la colección de *T. crinita* de INTA EEA Catamarca. Esta colección cuenta con materiales provenientes de 22 poblaciones naturales de la especie, 15 de Sudamérica y 7 de Norteamérica (Tabla 1).

### Análisis por citometría de flujo

Los análisis por CMF se realizaron a partir de hojas frescas. Las muestras se procesaron utilizando el protocolo de Doležel *et al.* (2007) con pequeñas modificaciones. Segmentos de hojas de 4 - 6 cm<sup>2</sup> de *T. crinita* y del estándar de referencia [*Glycine max* cv. Polanka (2n = 40, 2C = 2,5 pg ADN)] (Doležel *et al.*, 1994) fueron picados 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 minutos 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 y se incubaron en cámara fría (4°C) durante 24h. Posteriormente, se agregó 1 ml 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 yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 μg/ml de ARNasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El IP y la ARNasa se utilizaron para marcar el ADN nuclear y evitar fluorescencia del ARN de doble cadena, respectivamente. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, para luego ser corridas en un BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Los histogramas de

intensidad de fluorescencia relativa (FR) fueron evaluados con el programa BD Accuri™ C6. Los núcleos obtenidos en los histogramas de FR en la fase lineal fueron encerrados en una región y ambos picos  $G_0/G_1$  del estándar y de la muestra, fueron evaluados. Se analizaron de 2 a 3 individuos de cada población. El contenido de ADN nuclear relativo de las plantas se expresó mediante un índice de fluorescencia (IF) teniendo en cuenta al estándar de referencia ( $IF = 2C T. crinita/2C G. max$ ). El tamaño del genoma de cada individuo, expresado en picogramos (pg), fue estimado multiplicando los valores de IF por 2,5 (contenido de ADN nuclear de *G. max*).

### Análisis estadístico

Los datos de contenido de ADN nuclear (2C) se analizaron mediante análisis de varianza ( $\alpha=0,05$ ), considerando al subcontinente de origen como factor de efecto fijo y a las poblaciones anidadas dentro de cada subcontinente como factor de efecto aleatorio. Se usó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

## RESULTADOS

El histograma de intensidad de fluorescencia relativa (FR) de *T. crinita* analizado en conjunto con *G. max* como estándar de referencia mostró cuatro picos, dos representando el contenido relativo de ADN nuclear de *T. crinita* y los otros dos de *G. max* (Figura 1). Los picos dominantes co-

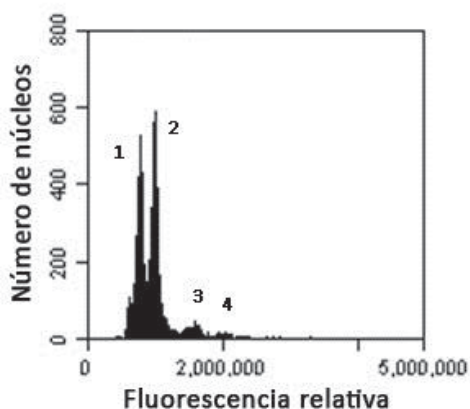


Figura 1. Histograma de intensidad de fluorescencia obtenido tras el análisis simultáneo de núcleos aislados de hojas de *T. crinita* y *G. max*. Los picos 1 y 2 corresponden a los núcleos en la fase  $G_0/G_1$  de *T. crinita* (1) y *G. max* (2), mientras que los picos 3 y 4 corresponden a los núcleos en la fase  $G_2$  de *T. crinita* (3) y de *G. max* (4).

Figure 1. Fluorescence intensity histogram obtained after the simultaneous analysis of isolated nuclei from leaves of *T. crinita* and *G. max*. Peaks 1 and 2 correspond to the nuclei in the  $G_0/G_1$  phase of *T. crinita* (1) and *G. max* (2), while peaks 3 and 4 correspond to the nuclei in the  $G_2$  phase of *T. crinita* (3) and *G. max* (4).

responden a los núcleos en la fase  $G_0/G_1$  (contenido de ADN nuclear, 2C), mientras que los picos menores corresponden a los núcleos en la fase  $G_2$  del ciclo celular (contenido de ADN nuclear, 4C). La ausencia de solapamiento de los picos generados indica que el estándar interno fue adecuado.

En general, se observó escasa variación entre poblaciones en el índice de fluores-

cencia (IF, 0,76 - 0,81) y contenido de ADN nuclear (2C, 1,90 - 2,01 pg; Tabla 1). En ese sentido, no se encontraron diferencias significativas de contenido de ADN nuclear entre poblaciones de Sudamérica y Norteamérica ( $P=0,955$ , promedio en ambos subcontinentes = 1,97 pg), y tampoco entre poblaciones dentro de cada subcontinente ( $P=0,097$ ; Tabla 1).

*Tabla 1. Denominación de las 22 poblaciones de T. crinita, provincia/estado, país y coordenadas de origen. Se muestra para cada una la cantidad de individuos (n) analizados por citometría de flujo, el índice de fluorescencia (IF)  $\pm$  desvío estándar, y contenido de ADN nuclear promedio (valor 2C, en pg)  $\pm$  desvío estándar.*

*Table 1. Denomination of the 22 populations of T. crinita, province / state, country and coordinates of origin. For each population we present the number of individuals (n) analyzed by flow cytometry, the average fluorescence index (ID)  $\pm$  standard deviation, and the average nuclear DNA content (2C value, in pg)  $\pm$  standard deviation.*

Población	Provincia/ estado	País	Lat.	Long.	n	IF	$\pm$ D.E.	2C	$\pm$ D.E.
Colpes	Catamarca	ARG	-28,06	-66,22	2	0,81	0,001	2,01	0,002
El Tipán	Catamarca	ARG	-28,99	-65,76	2	0,78	0,001	1,96	0,002
Recreo	Catamarca	ARG	-29,31	-65,14	2	0,80	0,017	1,99	0,042
Recreo Salinas	Catamarca	ARG	-29,52	-64,97	2	0,79	0,003	1,98	0,008
San Martín	Catamarca	ARG	-29,21	-65,77	2	0,77	0,001	1,93	0,001
HC	Córdoba	ARG	-29,96	-63,48	2	0,78	0,001	1,95	0,002
HL	Córdoba	ARG	-29,89	-64,46	2	0,80	0,003	1,99	0,007
Chemical *	La Rioja	ARG	-30,51	-66,14	2	0,80	0,010	2,01	0,025
Salinas Grandes	La Rioja	ARG	-30,60	-65,60	3	0,78	0,016	1,95	0,041
SC	La Rioja	ARG	-31,40	-66,77	2	0,79	0,006	1,97	0,015
SL	La Rioja	ARG	-31,52	-66,81	2	0,79	0,018	1,97	0,044
Tilimuqui	La Rioja	ARG	-29,14	-67,43	2	0,77	0,005	1,94	0,013
RCH Ancha	Mendoza	ARG	-34,26	-67,90	2	0,78	0,009	1,96	0,023
RCH Fina	Mendoza	ARG	-34,26	-67,90	3	0,78	0,014	1,94	0,036
Amblayo	Salta	ARG	-25,46	-65,83	2	0,80	0,021	2,00	0,053
Bowie	Arizona	EEUU	32,28	-109,29	2	0,78	0,006	1,96	0,015
San Simon	Arizona	EEUU	32,28	-109,27	2	0,79	0,004	1,98	0,009
Knox	New Mexico	EEUU	32,28	-106,76	2	0,80	0,013	1,99	0,033
Lucero	New Mexico	EEUU	33,10	-106,53	3	0,79	0,003	1,99	0,008
White Sands	New Mexico	EEUU	32,47	-106,41	2	0,76	0,031	1,90	0,078
Kinney *	Texas	EEUU	29,32	-100,43	2	0,79	0,005	1,97	0,013
Tornillo	Texas	EEUU	31,40	-106,01	2	0,79	0,019	1,98	0,047

\* Las poblaciones 'Chemical' y 'Kinney' son materiales vegetales registrados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (INTA, <https://inta.gob.ar/variedades/chemical-inta>) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-NRCS, 2007), respectivamente.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que todas las poblaciones evaluadas de *T. crinita*, tanto de Sudamérica como de Norteamérica, presentan similar contenido de ADN nuclear (2C entre 1,95 – 2,01 pg), lo que sugiere la misma ploidía del ADN (Suda *et al.*, 2006). La uniformidad que encontramos es consistente con evaluaciones realizadas sobre otras 20 poblaciones de *T. crinita* originarias del centro-oeste de Argentina, donde todas presentaron el mismo nivel de ploidía ( $2n = 4x = 40$ ) (Kozub *et al.*, 2019). Cabe destacar, que en el presente trabajo ampliamos la evaluación hacia poblaciones del sector disyunto norte de la distribución de la especie. Hasta la fecha no existía un estudio comparativo de este tipo entre poblaciones de ambos subcontinentes.

Considerando que como se dijo, *T. crinita* habita en Norteamérica y Sudamérica, en ambientes con ciertas diferencias climáticas (Quiroga *et al.*, 2018), nuestros resultados contrastan con lo hallado por Hunter *et al.* (2001) y por De Silva y Sandon (1995) en otras especies. Hunter *et al.* (2001) observaron en *Larrea tridentata* variación en el nivel de ploidía asociadas a las restricciones ambientales de los sitios habitados por la especie: poblaciones diploides tendían a predominar en ambientes relativamente más benignos (desierto de Chihuahua), mientras que poblaciones con mayores niveles de ploidía tendían a predominar a niveles crecientes de restricción ambiental (tetraploides en el desierto de Sonora, hexaploides en el desierto de Mojave). Por su parte, De Silva y Sandon (1995) encontraron que poblaciones tetraploides de *Cynodon dactylon* predominaban en ambientes con suelos de pH neutro (>

6,5) mientras que poblaciones diploides lo hacían en suelos de pH ácido (< 5). Cabe aclarar que si bien variaciones intraespecíficas en el nivel de ploidía traen por lo general aparejadas adaptaciones diferenciales en las plantas (Lučanová, 2019), no ocurre siempre lo mismo en sentido inverso: que poblaciones adaptadas a diferentes ambientes tengan necesariamente distinto nivel de ploidía. Esto porque las adaptaciones de distintos genotipos o poblaciones dentro de una especie pueden deberse a cambios genéticos ocurridos a otros niveles jerárquicos, sin que ocurra cambio de nivel de ploidía (Husband *et al.*, 2013). De hecho, nuestros resultados que muestran niveles de ploidía uniformes entre poblaciones de *T. crinita* parecen no ser una excepción, dado que Wood *et al.* (2009) reportaron que sólo el 12–13% de las especies de plantas angiospermas evaluadas presentan variación intraespecífica en el nivel de ploidía.

Desde el punto de vista aplicado, que no se hayan detectado variaciones en el nivel de ploidía entre poblaciones de una misma región, o de ambas regiones de su distribución disyunta (Sudamérica, Norteamérica), sumado al hecho de que la especie ha sido definida como autocompatible y autógena (Gutiérrez *et al.*, 2016; Kozub *et al.*, 2017), brinda un panorama amplio de posibilidades de uso del germoplasma en planes de restauración (Kramer *et al.*, 2018). Por ejemplo, para introducir materiales donde la presencia de la especie ha sido fuertemente diezmada, o utilizar mezclas de materiales de distintos orígenes para aminorar el efecto de variaciones climáticas e incrementar el potencial evolutivo (Broadhurst *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de tener el mismo nivel de ploidía, estudios poblacionales de *T. crinita* en Sudamérica mostraron variación en marcadores neutrales

de AFLPs que a su vez se correlacionaron con características de importancia agronómica (Cavagnaro *et al.*, 2006). Por lo tanto, integrar información de distintos marcadores de base genética podría aportar a orientar medidas de manejo, conservación y restauración.

### CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias en el contenido de ADN nuclear entre poblaciones de *Trichloris crinita* de Sudamérica y Norteamérica, tampoco entre poblaciones dentro de cada subcontinente. Los resultados sugieren que las poblaciones evaluadas presentan el mismo nivel de ploidía. Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan datos de referencia sobre el contenido de ADN nuclear de *T. crinita* en Sudamérica y Norteamérica, y generan una plataforma para futuros trabajos de CMF. Se considera importante poder realizar análisis complementarios mediante técnicas citogenéticas que permitan profundizar sobre la naturaleza poliploide de *T. crinita*.

### AGRADECIMIENTOS

A quienes contribuyeron a la colección de materiales vegetales, Pedro Ramón Namur, Sebastián Mora, Gladys Chilo, Lisandro Blanco, Victor Burghi, Antonio Prativiera, David Anderson, Forrest Smith.

### BIBLIOGRAFÍA

- Blanco L, Namur PR, Ferrando C, Rettore A, Namur P, Ávila R, Molina J, Oriente E. 2013. Vegetation trend after roller chopping and native grass seeding in La Rioja. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa* 22: 17-22.
- Broadhurst LM, Lowe A, Coates DJ, Cunningham SA, McDonald M, Vesk PA, Yates C. 2008. Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications* 1(4): 587-597.
- Cavagnaro PF, Cavagnaro JB, Lemes JL, Masuelli RW, Passera CB. 2006. Genetic diversity among varieties of the native forage grass *Trichloris crinita* based on AFLP markers, morphological characters, and quantitative agronomic traits. *Genome* 49(8): 906-918.
- De Silva PHAU, Snaydon RW. 1995. Chromosome number in *Cynodon dactylon* in relation to ecological conditions. *Ann. Bot.* 76: 535-537.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M y Robledo CW. 2012. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Doležel J, Doleželová M, Novák FJ. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum* 36: 351-357.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233-2244.
- Galbraith DW, Lambert GM, Macas J, Doležel J. 2002. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: *Current protocols in cytometry*. Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean PN, Dressler LG, Rabinovitch PS, Stewart CV, Tanke HJ, Wheless LL (eds). New York: John Wiley & Sons.

- Gil Báez C, Ordinola Agüero R, Ernst RD, Ruiz MA. 2015. Caracterización morfológica, biomasa aérea y calidad en distintas poblaciones de *Trichloris crinita*. Archivos de Zootecnia 64(245): 49-56.
- Greco SA, Cavagnaro JB. 2003. Effects of drought in biomass production and allocation in three varieties of *Trichloris crinita* P. (Poaceae) a forage grass from the arid Monte region of Argentina. Plant Ecology 164(1): 125-135.
- Greco SA, Cavagnaro JB. 2005. Growth characteristics associated with biomass production in three varieties of *Trichloris crinita* (Poaceae), a forage grass native to the arid regions of Argentina. The Rangeland Journal 27(2): 135-142.
- Greilhuber J, Doležel J, Lysák MA, Bennet MD. 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.
- Gutiérrez HF, Richard GA, Cerino MC. 2016. Sistema reproductivo de *Trichloris* (Poaceae, Chloridoideae, Chlorideae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 51(1): 111-122.
- Hunter KL, Betancourt JL, Riddle BR, Van Devender TR, Cole KL, Spaulding WG. 2001. Ploidy race distributions since the Last Glacial Maximum in the North American desert shrub, *Larrea tridentata*. Global Ecology and Biogeography, 10(5), 521-533.
- Husband BC, Baldwin SJ, Suda J. 2013. The incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes. In Plant Genome Diversity Volume 2 (pp. 255-276). Springer, Vienna.
- Kozub PC, Barboza K, Galdeano F, Quarin CL, Cavagnaro JB, Cavagnaro PF. 2017. Reproductive biology of the native forage grass *Trichloris crinita* (Poaceae, Chloridoideae). Plant Biology 19(3): 444-453.
- Kozub PC, Cavagnaro JB, Cavagnaro PF. 2018. Exploiting genetic and physiological variation of the native forage grass *Trichloris crinita* for revegetation in arid and semi-arid regions: An integrative review. Grass and Forage Science 73(2): 257-271.
- Kozub PC, Peñas MLL, Novo PE, Cavagnaro PF. 2019. Molecular Cytogenetic Characterization of the Native Forage Grass *Trichloris crinita*. Crop Science 59: 1-13.
- Kramer AT, Wood TE, Frischie S, Havens K. 2018. Considering ploidy when producing and using mixed-source native plant materials for restoration. Restoration Ecology 26(1): 13-19.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. Annals of Botany 98(3): 679-689.
- Lysák MA, Doležel J. 1998. Estimation of nuclear DNA content in Sesleria (Poaceae). Caryologia 52: 123-132.
- Lučanová M. 2019. Genome size studies in plants - from intraspecific variation to ecological consequences. Praha. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/113977> (fecha de acceso: 21/03/2020)
- 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.
- Marinoni L, Zabala JM, Parra-Quijano M, Fernández RJ, Pensiero JF. 2018. Genetic and environmental variation of seed weight in *Trichloris* species (Chloridoideae, Poaceae) and its association with seedling stress tolerance. Plant Ecology & Diversity 11(2): 173-184.
- Nakagawa H, Shimizu N, Sato H. 1987. Chromosome number, reproductive method and morphological characteristics of *Chloris* species. Japanese Journal of Grassland Science. 33: 191-205.



- Otto F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Methods in cell biology. Crissman HA, Darzynkiewicz Z (eds). Academic Press Inc. New York, pp. 105-110.
- Peterson PM, Columbus JM, Pennington SJ. 2007. Classification and biogeography of new world grasses: chloridoideae. *Aliso* 23: 580–594.
- Quiroga E, Blanco L, Oriente E. 2009. Evaluación de estrategias de rehabilitación de pastizales áridos. *Ecología Austral* 19(2): 107-117.
- Quiroga RE, Golluscio RA, Blanco LJ, Fernández RJ. 2010. Aridity and grazing as convergent selective forces: an experiment with an Arid Chaco bunchgrass. *Ecological Applications* 20(7): 1876-1889.
- Quiroga RE, Premoli AC, Fernández RJ. 2018. Climatic niche shift in the amphitropical disjunct grass *Trichloris crinita*. *PloS one* 13(6): e0199811.
- Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Krahulec F. 2006. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon* 55(2): 447-450.
- USDA-NRCS. 2007. [http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_PLANTMATERIALS/publications/stpmcrb7442.pdf](http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_PLANTMATERIALS/publications/stpmcrb7442.pdf) (fecha de acceso: 21/03/2020)
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 13875–13879.
- Zabala JM, Widenhorn P, Pensiero JF. 2011. Germination patterns of species of the genus *Trichloris* in arid and semiarid environments. *Seed Science and Technology* 39(2): 338-353.