



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Caracterización genética y fenotípica de Tinopiro (*Thinopyrum intermedium*) como cultivo perenne doble propósito en el Cono Sur

Andrés Locatelli Fagúndez

Doctor en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Setiembre, 2023

**Caracterización genética y fenotípica de
Tinopiro (*Thinopyrum intermedium*)
como cultivo perenne doble propósito en
el Cono Sur**

Andrés Locatelli Fagúndez

Doctor en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Setiembre, 2023

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Dr. Oswaldo Ernst, el Dr. Gustavo Slafer y el Dr. Juan Pablo Renzi el (día) de (mes) de (año). Autor: Mag. Andrés Locatelli. Director: Dr. Valentín D. Picasso. Codirectora: Dra. Lucía Gutiérrez. Codirector: Dr. Pablo Speranza.

Dedico este trabajo a mis hijos, Camila y Emiliano, quienes son la luz de mis ojos, a Silvana, mi compañera incansable, y a mis padres, infatigables luchadores.

Agronomy is a discipline coping as well as it can with ecosystems which have been largely dismembered. Without a shift of emphasis to the ecosystems there will be no incentive to abandon the agronomic tradition, and that tradition is incompatible with the social-economic-political transformation that is necessary for sustainability.

WES JACKSON

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad de la República por ser la institución que me ha dado la oportunidad de forma gratuita de formarme como investigador y docente universitario.

También quiero agradecer a mis tutores, Valentín Picasso, Lucía Gutiérrez y Pablo Speranza, por su esfuerzo y paciencia dedicada a mejorar el trabajo de mi tesis y mi formación integral como doctor.

Agradezco a los integrantes del tribunal Oswaldo Ernst, Gustavo Slafer y Juan Pablo Renzi por su interés y gran disposición a ser parte activa de la etapa final de este doctorado.

A los compañeros de la EEMAC, Yanina Mendieta, Andrés Ferraz, Richard Arévalo, Enrique Cairus, David Gandolfo, Cayetano Abbate, Julio Mosqueira, Reinaldo Quintana, Juan Mosqueira, Sebastián Bartaburu, Maximiliano Verocai, Juana Villalba, Federico Domínguez, que de alguna u otra forma, me han ayudado en tareas prácticas a lo largo de los experimentos en Paysandú. A Sebastián Mazzilli, Horacio Silva y Óscar Bentancur, Guillermo Siri, Pedro Arbeletche, Ariel Castro, Rafael Vidal, Pablo Boggiano, Ramiro Zanoniani, Javier García-Favre, por su tiempo invertido en discusiones fugaces pero muy enriquecedoras de varios temas asociados al doctorado.

A Nicolas Leete, Joseph Zimbric y Jeremie Favre, quienes colaboraron con mi trabajo en el primer experimento llevado a cabo en Madison, Wisconsin. A Pablo González, por su compañerismo y ayuda con el primer experimento en Madison.

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) que, mediante la adjudicación del Fondo María Viñas: FMV-3-2018-1-148145, permitió que gran parte de esta tesis se pudiera realizar en tiempo y forma.

A mis amigos y compañeros cercanos, quienes, al tanto de este proceso, han prestado muchas veces sus oídos y paciencia en todo momento, muchas veces, dando consejos y aliento para seguir la marcha.

A Camila, Emiliano y Silvana, por ser la fuente del verdadero sentido de todos los esfuerzos y retos que en mi adultez me han tocado vivir. A mis padres, por el amor y

dedicación puestos en mí durante toda su vida para hacerme mejor persona. A mis suegros, Ana y Tanino, quienes siempre han estado dispuestos a ayudar durante muchas instancias en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	X
SUMMARY	XI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. FORTALEZAS E IMPACTOS DE LA AGRICULTURA ANUAL	1
1.1.1. <u>La agricultura moderna como sostén de la alimentación</u>.....	1
1.1.2. <u>Desafíos de la agricultura moderna</u>.....	2
1.1.3. <u>La agricultura anual y sus impactos ambientales</u>	3
1.1.3.1. Erosión del suelo	3
1.1.3.2. Dinámica del N y el P.....	4
1.1.3.3. Cambio climático	7
1.2. LA AGRICULTURA PERENNE COMO ALTERNATIVA	9
1.2.1. <u>Domesticación de cultivos anuales y su relación con la perennidad</u> 9	9
1.2.2. <u>Avances en cultivos de grano perenne</u>.....	11
1.3. TINOPIRO: UN GRANO PERENNE DOBLE PROPÓSITO	13
1.3.1. <u>Tinopiro y sus servicios ecosistémicos</u>	16
1.3.2. <u>Comportamiento agronómico de Tinopiro</u>	18
1.3.2.1. Cualidades alimenticias del grano.....	18
1.3.2.2. Rendimiento en grano	18
1.3.2.3. Calidad nutritiva del forraje.....	19
1.3.2.4. Producción forrajera	20
1.3.2.5. Respuesta nitrogenada	21
1.3.2.6. Competencia con malezas	23
1.3.2.7. Desafíos de Tinopiro para su expansión geográfica.....	24
1.3.3. <u>Requerimientos de vernalización</u>.....	25
1.3.3.1. Requerimientos de vernalización en gramíneas.....	29

1.3.3.2.	Requerimientos de vernalización en Tinopiro.....	31
1.4.	MEJORAMIENTO GENÉTICO EN TINOPIRO.....	32
1.4.1.	<u>Mejoramiento genético en gramíneas perennes</u>	32
1.4.2.	<u>Características genéticas generales de Tinopiro</u>	34
1.4.3.	<u>Desafíos para el progreso genético de Tinopiro como grano perenne</u> 34	
1.5.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	40
1.5.1.	<u>Objetivo general</u>	40
1.5.2.	<u>Objetivos específicos e hipótesis</u>	40
1.6.	ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS	41
2.	<u>VERNALIZATION REQUIREMENTS OF KERNZA INTERMEDIATE WHEATGRASS</u>	43
2.1.	ABSTRACT	43
2.2.	INTRODUCTION	44
2.3.	MATERIALS AND METHODS	46
2.3.1.	<u>Plant populations</u>	46
2.3.2.	<u>Greenhouse conditions</u>	47
2.3.3.	<u>Cold incubation (vernalization) treatment</u>	47
2.3.4.	<u>Experimental design</u>	48
2.3.5.	<u>Phenotyping</u>	49
2.3.6.	<u>Statistical analysis</u>	50
2.4.	RESULTS	51
2.4.1.	<u>Effect of length of incubation on growth and reproductive performance</u>	51
2.4.2.	<u>Between and within population variability</u>	56
2.5.	DISCUSSION.....	59
2.5.1.	<u>Primary induction requirements for flowering</u>	59
2.5.2.	<u>Impact of length of incubation on reproductive traits</u>	60
2.5.3.	<u>Variability of induction requirements to flowering</u>	62
2.6.	CONCLUSION.....	63
2.7.	ACKNOWLEDGEMENTS	63
2.8.	REFERENCES	63

3. <u>AGRONOMIC ASSESSMENT OF TWO POPULATIONS OF INTERMEDIATE WHEATGRASS - KERNZA® (THINOPYRUM INTERMEDIUM) IN TEMPERATE SOUTH AMERICA</u>	70
3.1. ABSTRACT	70
3.2. INTRODUCTION	71
3.3. MATERIALS AND METHODS	75
3.3.1. <u>Plant Material</u>	75
3.3.2. <u>Experimental design and management</u>	76
3.3.3. <u>Grain, forage, and weed sampling</u>	78
3.3.4. <u>Weather data</u>	79
3.3.5. <u>Plant heading and heading time</u>	82
3.3.6. <u>Statistical analysis</u>	83
3.4. RESULTS	85
3.4.1. <u>Weather and field conditions</u>	85
3.4.2. <u>Plant heading, heading time, grain yield and harvest index</u>	85
3.4.3. <u>Forage yield and nutritive value</u>	88
3.4.4. <u>Weed biomass</u>	90
3.5. DISCUSSION.....	92
3.5.1. <u>Population effects on agronomic performance</u>	92
3.5.2. <u>Weed competition and yield decline</u>	96
3.5.3. <u>Forage yield</u>	97
3.5.4. <u>Harvest index</u>	98
3.5.5. <u>Nutritional parameters</u>	98
3.5.6. <u>Nitrogen fertilization</u>	100
3.6. CONCLUSIONS.....	101
3.7. REFERENCES	101
4. <u>GENETIC ARCHITECTURE OF GRAIN AND FORAGE YIELD COMPONENT IN INTERMEDIATE WHEATGRASS</u>	117
4.1. ABSTRACT	117
4.2. INTRODUCTION	118
4.3. MATERIALS AND METHODS	121
4.3.1. <u>Base population</u>	121
4.3.2. <u>Half-sib families and experimental management</u>	122

4.3.3.	<u>Phenotyping</u>	123
4.3.4.	<u>Analysis of variance, variance components and heritability</u>	125
4.3.5.	<u>Genetic variation, genetic gain, genetic correlation and relative selection efficiency</u>	126
4.4.	RESULTS	128
4.4.1.	<u>Analysis of variance, variance components and heritability</u>	128
4.4.2.	<u>Narrow-sense heritability, response selection efficiency and genetic gain</u>	129
4.4.3.	<u>Genetic correlations</u>	129
4.5.	DISCUSSION	133
4.5.1.	<u>Selection opportunities in the first year and genotypic variance</u> .	133
4.5.2.	<u>Narrow-sense heritability</u>	134
4.5.3.	<u>Genetic correlations and indirect selection possibilities</u>	135
4.5.4.	<u>Trade-offs</u>	137
4.6.	CONCLUSION	139
4.7.	REFERENCES	139
4.8.	ACKNOWLEDGMENTS	151
5.	<u>DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	151
5.1.	DISCUSIÓN GENERAL	151
5.1.1.	<u>Adaptación agronómica de Tinopiro a bajas latitudes</u>	151
5.1.1.1.	Comportamiento reproductivo	155
5.1.1.2.	Comportamiento agronómico y desafíos emergentes	158
5.1.1.3.	Posibilidades de mejoramiento genético	160
5.2.	CONCLUSIONES	168
5.3.	PERSPECTIVAS	170
6.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	174
7.	<u>ANEXOS</u>	210
7.1.	ANEXOS CORRESPONDIENTES AL ARTÍCULO 1	210
7.2.	ANEXOS CORRESPONDIENTES AL ARTÍCULO 2	212

RESUMEN

La agricultura basada en cultivos anuales requiere un manejo intensivo en insumos, lo que se ha asociado al deterioro de recursos naturales. Cultivos perennes de grano como Tinopiro – (*Thinopyrum intermedium*) tienen el potencial de solucionar este problema, pero no hay información de este cultivo para regiones templadas con inviernos suaves. Los objetivos de esta tesis de doctorado fueron: a) determinar los requerimientos de frío de tinopiro, b) evaluar su comportamiento agronómico como cultivo doble propósito en Uruguay y c) comprender la arquitectura genética de los componentes del rendimiento de grano y forraje en el tinopiro bajo un manejo doble propósito. En esta tesis se desarrollaron tres experimentos, el primero en cámaras de crecimiento y los otros dos a campo durante dos años en Paysandú, Uruguay. El porcentaje de floración y la mayoría de los componentes de rendimiento en grano incrementaron al aumentar el período de incubación a 5 °C y 10 h de fotoperíodo de 3 a 7 semanas. Se estimó una alta diversidad fenotípica dentro de las poblaciones. Para el segundo experimento se evaluaron los efectos de dos poblaciones producidas en ambientes contrastantes y tres dosis de nitrógeno bajo un manejo doble propósito sobre la producción de grano y forraje. Ambas poblaciones para el primer año tuvieron porcentajes de floración en el entorno de 48%, lo que resultó en un rendimiento promedio de 316 kg ha⁻¹ de grano. La producción forrajera promedio para el primer año fue de 14695 kg ha⁻¹ y se redujo a 4037 kg ha⁻¹ para el segundo año. La fertilización con 160 kg ha⁻¹ de nitrógeno incrementó 63 % la producción de grano y 28 % la de forraje. En el tercer experimento se evaluaron componentes de rendimiento en grano, caracteres forrajeros y fenológicos en 30 familias de medios hermanos. La mayoría de los caracteres no tuvieron interacción genotipo x año. La selección indirecta por espigas por planta y/o rendimiento por espiga podría tener mayor respuesta a la selección que la selección directa por rendimiento por planta. No se detectó compensación entre componentes de rendimiento en grano y producción de biomasa aérea. Estos resultados sugieren que la expansión de esta especie como cultivo doble propósito a regiones templadas con inviernos suaves es factible luego de algunos ciclos de selección.

Palabras clave: vernalización, forraje, cultivo perene, mejoramiento genético, fertilización nitrogenada

SUMMARY

Agriculture based on annual crops requires intensive input management, which has been associated with significant degradation of natural resources. The development of perennial grain crops such as intermediate wheatgrass - (*Thinopyrum intermedium*) may greatly contribute to reduce this problem, however, previous research has been carried out in high latitude environments and there is no information on this crop for temperate regions with mild winters. The aims of this thesis were a) to determine the cold requirements of intermediate wheatgrass, b) to evaluate the agronomic performance of intermediate wheatgrass managed as a dual-purpose crop in Uruguay, c) to understand the genetic architecture of grain and forage yield components in intermediate wheatgrass under dual-purpose management. Three experiments were carried out, the first one in growth chambers and the other two in the field during two years in Paysandú, Uruguay. Flowering percentage and most grain yield components increased as the length of the cold incubation period at 5°C and 10 h photoperiod increased from 3 to 7 weeks. High intra-population phenotypic diversity was estimated. The effects of two populations produced under contrasting environments and the effects of three doses of nitrogen on grain and forage yield under dual-purpose management were evaluated in the second experiment. The first year, both populations had similar flowering percentages of about 48%, which resulted in an average grain yield of 316 kg ha⁻¹. The average forage yield for the first year was 14695 kg ha⁻¹ and decreased to 4037 kg ha⁻¹ the second year. Fertilization with 160 kg ha⁻¹ nitrogen increased grain yield by 63% and forage yield by 28%. In the third experiment, grain yield components, forage and phenological traits were evaluated in 30 half-sib families. Most of the traits evaluated showed no genotype x age interaction. Indirect selection for spikes per plant and/or yield per spike could have a greater response to selection than direct selection for yield per plant. No trade-off was detected between grain yield components and aboveground biomass production. These results suggest that expansion of this species as a dual-purpose crop to temperate regions with mild winters is feasible after some cycles of selection.

Palabras clave: vernalization, forage, perennial crop, genetic improvement, nitrogen fertilisation

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FORTALEZAS E IMPACTOS DE LA AGRICULTURA ANUAL

1.1.1. La agricultura moderna como sostén de la alimentación

Los granos de cereal han sido una fuente primaria de alimentación para los seres humanos durante miles de años. Desde la domesticación del arroz hace unos 10.000 años el valle del Yangtsé, China, hasta la domesticación del maíz en el sur de México y del trigo en la luna creciente fértil de oriente más o menos en la misma época, los cereales han contribuido enormemente a transformar la civilización humana (Molina et al., 2011, Gustafson et al., 2009). Actualmente, los cereales son la principal fuente mundial de energía, hidratos de carbono y proteínas vegetales de la dieta humana. Los mayores volúmenes de producción anuales son de maíz y arroz con 1210 y 787 millones de toneladas, respectivamente, seguidas del trigo con 771 millones de toneladas (FAOSTAT, 2023). Cebada, sorgo y avena también son otros cereales importantes en el ámbito global con producciones de 145, 61 y 23 millones de toneladas de grano (FAOSTAT, 2023). Estos cultivos representan una fuente muy eficiente de síntesis de nutrientes para la dieta humana. La producción de grano por estos cereales requiere aproximadamente de 4,6 m² de tierra por cada 100 g de proteína producida, mientras que para producir 100 g de proteína de vacuno se necesitan 163,6 m² (Ritchie y Roser, 2020). Si además tomamos en cuenta las emisiones de gases de efecto invernadero como moléculas de CO₂ equivalentes liberadas a la atmósfera, para la producción de 100 g de proteína en grano se liberan 2,7 kg de CO₂; por el contrario, 49,9, 7,6 y 5,7 kg de CO₂ son liberados para producir 100 g de proteína de ganado vacuno, porcino y aves de corral, respectivamente (Ritchie y Roser, 2020). Por otro lado, aproximadamente 35 % de la producción de cereales (sobre todo maíz, cebada, sorgo y avena) también se destina a la alimentación del ganado, lo que contribuye indirectamente a la nutrición humana (Awika, 2011). Por lo tanto, la producción mundial de granos es y seguirá siendo un gran sostén para alimentación humana.

1.1.2. Desafíos de la agricultura moderna

La población mundial actual es de 8.0 billones de personas, pero, según las proyecciones realizadas recientemente por las Naciones Unidas, esta ascenderá a 8,6 billones en el 2030 y a 9,7 billones en el 2050 (UN, 2022). La demanda de alimentos se prevé incremente entre un 35 a 56 % para el 2050 (Van Dijk et al., 2021). Por lo tanto, para satisfacer la futura demanda de alimentos, será necesario aumentar la producción de cultivos, reducir el desperdicio de alimentos y cambiar los patrones de consumo (FAO, 2018). En este escenario, la producción de cultivos debe aumentar en torno a un 70 % para el 2050 (Mahlayeye et al., 2022). Sin embargo, los recursos naturales que sustentan la agricultura mundial han dado evidentes muestras de su incapacidad actual para afrontar retos tan exigentes. El suelo es fundamental para la vida en la tierra y, su gestión, crítica para sostener la producción de granos a mediano y largo plazo. La erosión del suelo ha contribuido a la pérdida 430 millones de hectáreas de tierras cultivadas en el mundo, aproximadamente el 30 % del total del área cultivable en el planeta (Lal et al., 1990). Se calcula que cada año se abandonan 10 millones de hectáreas de tierras de cultivo, siendo la principal razón de este abandono la falta de productividad causada por la erosión del suelo (Pimentel, 2006). El área cultivable que posee mínimas pérdidas de suelo bajo agricultura continua es ínfima en el planeta (Kort et al., 1998). El actual sistema alimentario mundial ejerce una presión insostenible no solo sobre el uso de la tierra, sino también sobre el medio ambiente, debido al agotamiento del agua dulce, el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, la alteración de los ciclos del nitrógeno y el fósforo, la pérdida de biodiversidad y la contaminación (Poutanen et al., 2021). El hábito de crecimiento anual y los sistemas de manejo asociados a estos importantes cultivos cerealeros anteriormente mencionados están asociados a este deterioro de los recursos naturales disponibles para su desarrollo.

1.1.3. La agricultura anual y sus impactos ambientales

1.1.3.1. Erosión del suelo

Los suelos erosionados disminuyen mucho su capacidad agrícola y experimentan diversos fenómenos tales como: pérdida de capacidad de retención de agua, disminución de la fertilidad natural, aumento de la densidad, reducción de la materia orgánica (Murdoch et al., 1983). Si además se considera que 100 años son requeridos para la formación de 2,5 cm del horizonte superficial de suelo, se torna preponderante la importancia del manejo y cuidado de este recurso en los sistemas agrícolas (Kort et al., 1998). Los cultivos anuales dominan ampliamente la producción de granos mundial, ocupando más de dos terceras partes de la tierra cultivable del planeta, y han explicado, en parte, el deterioro del recurso suelo (Cox et al., 2006). Las mejores tierras agrícolas tienen suelos con un riesgo bajo a moderado de degradación para la producción anual de cereales, pero solo representan el 12,6 % de la superficie mundial (Eswaran et al., 1999). Aunque prácticas de conservación del suelo y, en particular, la siembra directa, han demostrado su eficacia para reducir los índices de erosión, los niveles de pérdida de suelo siguen siendo elevados en los sistemas agrícolas (Nearing et al., 2017). Gantzer et al. (1990) estimó la pérdida de suelo producto de agricultura anual (maíz continuo), rotación cultivos-pasturas (rotación de 6 años con maíz, avena, trigo, trébol y dos años de *Phleum pratense*) y pradera continua para 100 años y encontraron que la perennidad fue un factor clave para la conservación edáfica: la pradera continua tuvo 30 % menos de pérdida de suelo que el sistema de rotación cultivo/pastura y 56 % menos que la agricultura anual. Cuando a estos sistemas agrícolas se le agrega el cero laboreo, las pérdidas de suelo bajan notoriamente, aunque solo la incorporación de un período con especies perennes iguala las pérdidas de suelo a un sistema de pastizales naturales (García-Préchac et al., 2004). En Uruguay, Ernst y Siri (2009) encontraron que la inclusión cero laboreo y un lapso de pasturas fueron fundamentales para disminuir la escorrentía superficial y, por lo tanto, la erosión. Si bien no se detectaron diferencias en pérdida de suelo y carbono orgánico entre los tratamientos de cero laboreo (agricultura continua vs. inclusión de

una pradera perenne al sistema de agricultura continua), las mediciones fueron realizadas en terrenos con baja pendiente (1 %) y se observó una tendencia a menores pérdidas con la inclusión de la pradera, lo que indica que la inclusión de especies perennes podría acentuar sus efectos en altas pendientes. Especies que proveen cobertura permanente producen pérdidas insignificantes de suelo y agua por escorrentía superficial en comparación con cultivos anuales, aun con pendientes muy elevadas (Browning et al., 1973). Por otro lado, la inclusión de especies perennes no solo aumenta la productividad de los suelos al disminuir los niveles de erosión, sino que además mantiene o mejora (dependiendo del nivel de degradación del suelo) la calidad del suelo al mantener los niveles de carbono orgánico y, por ende, la utilización del N por las plantas (García-Lamothe, 1994). También debido al denso y fibroso sistema radicular que caracteriza a dichas especies, la estabilidad de los agregados del suelo incrementa rápidamente cuando se incluyen perennes luego de una fase agrícola (García-Préchac et al., 2004).

1.1.3.2. Dinámica del N y el P

El sistema agrícola basado en cultivos anuales no solo afecta la pérdida de suelo en los sistemas de producción, sino que también posee alta incidencia en la dinámica del nitrógeno (N) y el fósforo (P), ya que la producción global de granos puede ser vista como el principal acelerador del ciclo de estos nutrientes (Liu et al., 2010). El aumento en el uso de ambos nutrientes mediante la fertilización ha posibilitado el incremento en el rendimiento en los cultivos y, por ende, la oferta necesaria de alimentos para una población mundial en constante crecimiento (Erisman et al., 2008, Galloway y Cowling, 2002, Cassman, 1999). Datos agregados a escala mundial y a lo largo de varias décadas han demostrado la existencia de un fuerte vínculo entre la producción agrícola y la aportación de nutrientes (Tilman et al., 2002, Smith et al., 1997). Sin embargo, en este sistema productivo, una importante fracción de lo incorporado de estos nutrientes se pierde. Entre 1950 y 2000, la agricultura y la producción agrícola para alimentación ganadera han aumentado los excedentes de la aplicación de N en 4 veces y de P en 5,5 veces (Bouwman et al., 2011). En la

actualidad, la fertilización de N intensiva se ha empleado como práctica agrícola dominante para garantizar un alto rendimiento de los cultivos y se aplica muy a menudo en dosis superiores a las necesidades de los cultivos (Yang et al., 2013). Se estima que entre el 30 y 50 % del N aplicado por fertilización en un cultivo no es absorbido por el primer cultivo y que los siguientes cultivos podrían tomar solo aproximadamente el 7 % de la misma aplicación (Ladha et al., 2005). Para el caso del N, estas pérdidas pueden constituir emisiones de amonio (NH_3), óxido nitroso (N_2O) y óxido nítrico (NO) o pérdidas por lixiviación de nitratos (NO_3). La combinación de elevadas pérdidas de N y bajas o nulas tasas de su fijación biológica hacen que este nutriente pueda ser escaso en la agricultura y, por lo tanto, sean importantes y periódicos los aportes desde la fertilización para facilitar de esta forma la baja eficiencia en su uso por parte de los cultivos (Vitousek et al., 2002). Entre las moléculas emitidas a la atmósfera, el NH_3 contribuye a la eutrofización y acidificación cuando esta molécula es redepositada en la tierra, el NO posee un importante rol en la química del ozono y el N_2O es una molécula con fuerte efecto invernadero (Bouwman et al., 2011, Deng et al., 2011). Los nitratos en sistemas agrícolas, en cambio, son perdidos fundamentalmente por lixiviación y posteriormente llegan a los espejos de agua por drenaje subsuperficial o flujo base, muy poco se pierde por escorrentía superficial (Wang y Li, 2019). La concentración de nitratos en los ríos cuyas cuencas poseen uso agrícola es mayor a la encontrada sobre ríos de cuencas no agrícolas, lo que hace evidente el rol clave que posee la agricultura actual sobre la carga de esta molécula en los sistemas acuáticos (King et al., 2005, Kroening, 1996). La magnitud de las pérdidas de nitratos se estima sean hasta 50 veces más importantes en cultivos anuales que en perennes (Randall y Mulla, 2001). El contenido medio de nitratos residuales en los 180 cm superiores del perfil del suelo fue de 18, 60, 85, 90 y 134 kg ha^{-1} para gramíneas perennes durante tres años, para una rotación de tres años de avena (*Avena sativa* L.)-alfalfa (*Medicago sativa* L.)-maíz, para una rotación de dos años avena-trébol rojo (*Trifolium pratense* L.)-maíz, para una rotación de tres años soja (*Glycine max* (L.) Merr.)-trigo de invierno (*Triticum aestivum* L.)-maíz, y maíz continuo por tres años, respectivamente (DeHaan et al., 2017). La gran producción de raíces por parte de los cultivos perennes y el hecho de que estén presentes todo el año

evita notoriamente las pérdidas de nitratos por lixiviación, factor preponderante del flujo de N a los sistemas acuáticos producto de la agricultura.

El incremento en el uso de P al igual que el N ha sido una de las piezas clave de la revolución verde para el incremento de la productividad de los cultivos. Sin embargo, en muchos casos, el excesivo uso de estos nutrientes ha llevado a un alto costo ambiental (Tilman et al., 2001). El P presenta menos tipos de fugas de los sistemas agrícolas, ya que se considera un elemento con ciclo sedimentario, por lo que su único destino final es el enterrado por sedimentos en sistemas acuáticos (Childers et al., 2011). Este nutriente es uno de los directamente asociados al proceso de eutrofización de aguas, ya que su concentración excesiva causa una alta producción de fitoplancton, turbidez en el agua y diversos cambios no deseables en los sistemas acuáticos tales como pérdida de biodiversidad, desaparición de plantas acuáticas, cambios en el stock de peces y disminución en el control del zooplancton sobre el fitoplancton (Søndergaard et al., 2003). La pérdida más importante de P de los sistemas agrícolas es mediante la escorrentía superficial, quedando en segundo plano los sucesos de lixiviación de este nutriente, los cuales solo pueden ser importantes en suelos orgánicos, anegados o arenosos (Sharpley et al., 2001). Teniendo en cuenta la forma en que este nutriente se pierde y la magnitud de las pérdidas, no es extraño que los sistemas agrícolas actuales sean considerados como una de las fuentes más importantes de P en los sistemas acuáticos eutrofizados (Barreto et al., 2017, Li et al., 2015, Somura et al., 2012, Chalar et al., 2011, Allan, 2004, Klatt et al., 2003, Daniel et al., 1998). Los cultivos perennes, ya sean para forraje, bioenergía o producción de grano, tienen el potencial de incrementar la sostenibilidad del P en los sistemas agrícolas mediante la disminución de las pérdidas no intencionadas producto de la fertilización y la optimización de la absorción por parte de los cultivos. El mantenimiento de una cubierta perenne en el suelo y de raíces que, además de retener los agregados de suelo, absorban activamente los nutrientes en el tiempo y en el espacio puede reducir considerablemente las pérdidas involuntarias de nutrientes como P (Chalar et al., 2017, Montgomery, 2007, Mallarino et al., 2002). Asimismo, la utilización de especies perennes en comparación con anuales estaría manteniendo una mayor proporción de P nativo o fertilizante en formas orgánicas relativamente

disponibles en vez de formas recalcitrantes, por lo que podrían reducirse las necesidades de fertilización de P (Crews et al., 2014).

1.1.3.3. Cambio climático

El cambio climático con temperaturas más altas, precipitaciones más variables y fenómenos climáticos extremos como olas de calor, inundaciones y sequías posee un gran potencial de impacto sobre la agricultura (Amaru y Chhetri, 2013). Muchos estudios para investigar el impacto del cambio climático en los cultivos se han focalizado en el análisis de las variaciones de las condiciones climáticas con respecto a una media histórica, es decir, a partir de una comparación estática (Smit y Skinner, 2002). Sin embargo, al momento existe bastante consenso en considerar que el aspecto clave del cambio climático no es solo el cambio paulatino en los promedios de algún factor climático, sino la mayor irregularidad en magnitud y mayor asiduidad de eventos climáticos extremos (Rickert et al., 2019, Almeida et al., 2013, Wandel y Smit, 2000). La mayor parte del calentamiento global se ha observado durante los últimos 50 años y se ha atribuido principalmente a actividades humanas como el consumo excesivo de combustibles fósiles y los cambios en el uso del suelo (Karimi et al., 2018, Ravindranath y Sathaye, 2003). La agricultura, debido a su alta dependencia de las condiciones climáticas, es considerada como una de las actividades más vulnerables y de mayor riesgo frente al impacto del cambio climático (Reilly, 1995). En efecto, la oscilación meridional del fenómeno del niño está asociada a ciclos tanto de sequía como de anegamiento y explica entre 15 y 35 % de la variación global de los rendimientos de trigo, las oleaginosas y varios granos secundarios (Ferris et al., 1999). Según los informes del IPCC y de la FAO, los sistemas agrícolas de los países en desarrollo parecerían ser aún más susceptibles a los cambios climáticos (Manuamorn et al., 2020, Lu et al., 2019, Melkonyan y Asadoorian, 2014). Si bien las previsiones del impacto del cambio climático sobre el rendimiento de los cultivos son dispares geográficamente (Ortiz et al., 2008) hasta el 2030, existe consenso en los efectos negativos a partir de esa fecha (FAO, 2016). No obstante, la agricultura no debe ser vista como una simple víctima en este proceso, ya que, a su vez, es una de las

principales actividades antropogénicas que ha fomentado el cambio climático. La agricultura se practica en el 49 % de la superficie terrestre mundial libre de hielo, el 12 % como tierra de cultivo y el 37 % como pasto, y es responsable del 12 % del total de las emisiones antropogénicas directas de gases de efecto invernadero (IPCC, 2019). Si además se consideran los cambios en el uso del suelo y su degradación, la contribución de la agricultura asciende a un tercio de las emisiones antropogénicas totales (Wollenberg et al., 2011). Las predicciones no son alentadoras, ya que, si no se toman las medidas adecuadas para reducirlas, las emisiones seguirán aumentando ~ 30 % para el año 2050 (Srivastav et al., 2021). Por lo tanto, los enfoques de adaptaciones resilientes y estrategias de mitigación son vitales, porque tienen el potencial de disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero sin reducir la producción de cultivos (Sapkota et al., 2019, Nyong et al., 2007). En este sentido, la forestación o la reforestación (Laganiere et al., 2010) así como la utilización de cultivos perennes tienen el potencial de mitigar los efectos del cambio climático a partir del secuestro de carbono y almacenarlo como carbono orgánico en suelos (Ledo et al., 2020). Las plantas perennes pueden acceder a más nutrientes y agua del suelo durante más tiempo que los cultivos anuales, lo que las hacen más resilientes a condiciones ambientales adversas. Debido a que producen más biomasa aérea y subterránea que los cultivos anuales, transfieren materia orgánica a los microorganismos del suelo y aumentan la cantidad de carbono almacenado en el suelo, un componente clave de la salud del suelo (Glover et al., 2010). Estos aportes orgánicos y de microorganismos mejoran la fertilidad y la estructura del suelo, por lo que aumentan la infiltración y el almacenamiento de agua, todo lo cual incrementa la cantidad de agua disponible por los cultivos, lo que otorga resiliencia a estos sistemas (Bationo et al., 2007). Sistemas agrícolas-forrajeros en rotación y caracterizados por componentes perennes y diversos serían capaces de fomentar resiliencia al cambio climático y proporcionar múltiples servicios ecosistémicos, así como beneficios socioeconómicos en los paisajes agrícolas (Picasso et al., 2022).

1.2. LA AGRICULTURA PERENNE COMO ALTERNATIVA

Debido a estaciones de crecimiento más cortas y sistemas radiculares menos desarrollados, los cultivos anuales proporcionan menos protección contra la erosión del suelo, tienen una menor eficiencia en el uso del agua y los nutrientes, almacenan menos carbono en el suelo y hacen que el sistema de producción sea menos resistente a los estreses bióticos y abióticos que las comunidades de plantas perennes (Sanford et al., 2021, Osterholz et al., 2019, King y Blesh, 2018, Sanford, 2014). En este contexto, la perennidad surge como una alternativa muy prometedora a incorporar en la agricultura moderna, donde quizás conocer los hitos por los que atravesó la evolución de las especies anuales de cultivos actuales nos brinde pistas para lograrlo.

1.2.1. Domesticación de cultivos anuales y su relación con la perennidad

La evolución de las especies de cultivos comenzó cuando la ecología del comportamiento humano pasó de la recolección de alimentos al cultivo como principal modo de abastecimiento de recursos alimentarios vegetales (Lee y DeVore, 1968). La trayectoria evolutiva de las especies silvestres a las especies cultivadas es un proceso complejo de múltiples etapas, las cuales podrían agruparse en un período de predomesticación, domesticación y la fase de diversificación o de evolución dentro de poblaciones domesticadas (Donald, 1983). La predomesticación se refiere al período en que los seres humanos comenzaron a plantar o cuidar de ciertas poblaciones de plantas por algún rasgo de interés (Wilcox, 2012), en tanto que la domesticación de un cultivo de semillas fue a menudo un acontecimiento «único» en el que ciertas mutaciones importantes garantizaron la adaptación de una especie a un ambiente agrícola, lo que disminuyó en ese camino su capacidad de supervivencia en la naturaleza o, más bien, en ambientes inalterados (Mangelsdorf, 1965). Por último, la fase de diversificación implica la propagación y adaptación de las especies y poblaciones domesticadas a diferentes ambientes agroecológicos y culturales (Meyer y Purugganan, 2013). Aunque todas las etapas han sido muy importantes en términos evolutivos para la conformación de los actuales cultivos comerciales, la fase de

domesticación, por la naturaleza cualitativa de sus cambios fenotípicos (Abbo et al., 2014), podría ser vista como el período evolutivo de mayor trascendencia. En efecto, los caracteres principales o diagnósticos asociados al síndrome de domesticación de los cultivos de grano son mono- o digenéticos y, a menudo, el fenotipo domesticado está condicionado por alelos recesivos (Ladizinsky, 2012). Los fenotipos domesticados a menudo se diferencian de sus ancestros salvajes por características como: pérdida de dormancia, disminución de dehiscencia, incremento en el tamaño de los granos, cambios en la arquitectura reproductiva de las inflorescencias, resistencia al vuelco y facilidad de cosecha y trilla, es decir, caracteres relacionados con la mejora del rendimiento primario y del grano cosechable para los agricultores (Haas et al., 2019, Olsen y Wendel, 2013, Meyer y Purugganan, 2013). Estos caracteres pueden deberse a las preferencias humanas por la facilidad de recolección/cosecha, las ventajas de crecimiento bajo propagación humana y/o la supervivencia en hábitats deforestados o alterados, donde, tanto la selección consciente por parte de los primeros agricultores como la selección inconsciente debida a las prácticas agrícolas o al ambiente moldearon este proceso (Fuller et al., 2009, Zohary, 2004).

Las especies anuales constituyen aproximadamente el 10 % de las angiospermas y, aunque no se distribuyen uniformemente entre las familias, han evolucionado numerosas veces a partir de antepasados perennes (Angiosperm Phylogeny Group, 2016). La anualidad es una condición derivada en más de 100 familias de plantas de más de 30 órdenes de angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) y es bastante aceptado que la anualidad haya evolucionado miles de veces, lo que la convierte en una de las transiciones reproductivas más importantes. La opinión más extendida es que el hábito leñoso y la estrategia de vida perenne que lo acompaña son la condición ancestral de las angiospermas, seguidas por la evolución hacia el hábito herbáceo y la anualidad (Stebins et al., 2013, Soltis, 1950). En el proceso de domesticación, se ha producido una selección hacia el hábito anual simplemente por la capacidad de las anuales de producir más semillas (Donald, 1983). Probablemente el trigo farro (emmer wheat - *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*) y la cebada salvaje (los primeros cultivos de grano domesticados) presentaban semillas de gran tamaño y, para garantizar una cosecha fiable cada año, los primeros agricultores

habrían replantado algunas de las semillas que recogían, lo que habría favorecido en ese proceso a caracteres como rendimiento en grano y facilidad de cosecha. Aunque algunas plantas perennes también podrían haber tenido semillas de buen tamaño, no era necesario replantarlas y, por tanto, no habrían sido sometidas al mismo proceso de selección ni se habrían beneficiado de este (Glover et al., 2007).

Por otro lado, el hecho de evitar el desvío de recursos a los órganos vegetativos (como lo haría una especie perenne para perpetuarse), combinado con el valor adaptativo de un patrón de crecimiento anual en regiones de estación limitada y ambientes alterados, ha llevado al desarrollo de cultivos de semillas anuales en muchas familias y géneros (Chang, 1976). Al parecer, existiría una plasticidad adaptativa para la estrategia del ciclo de vida en la que, bajo diferentes estreses ambientales (terrenos disturbados, sequías y estrés térmicos), los individuos sacrifiquen la fecundidad futura por un mayor esfuerzo reproductivo inmediato y dar pasos hacia la anualidad (Friedman, 2020).

1.2.2. Avances en cultivos de grano perenne

La perennización de las especies cultivadas y el aumento de la diversidad de cultivos a escala de campo, explotación y región es un enfoque alternativo para abordar la problemática de la pérdida de servicios ecosistémicos asociados a los sistemas agrícolas anuales, ya que consiste en alterar fundamentalmente el propio ecosistema agrícola (Crews et al., 2018). En la actualidad se están desarrollando cultivos de grano perenne de dos formas: 1) *de novo* o domesticación directa, es decir, a partir de ciclos de selección recurrente y 2) por hibridaciones interespecíficas (anual x perenne). El Land Institute de Estados Unidos, las Future Farm Industries Cooperative Research Centre de Australia, la Yunnan Academy of Agricultural Sciences de China y otros grupos de investigación están llevando a cabo o iniciando programas de selección de Tinopiro [*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D. R. Dewey], trigo perenne (*Triticum* spp./*Thinopyrum* spp.), sorgo perenne [*Sorghum bicolor* (L.) Moench/*S. halepense* (L.) Pers.], girasol Maximilia (*Helianthus maximiliani* Schrad.), girasol

perenne (complejos de híbridos de *Helianthus* spp.), *Desmanthus illinoensis* (Michaux) MacMillan y el arroz perenne (híbridos de *Oryza* spp.) (Cox et al., 2010). Mediante hibridaciones interespecíficas, se ha intentado cruzar especies de cereales anuales con sus parientes perennes cercanos para combinar caracteres de perennidad con la capacidad de alto rendimiento asociada a las anuales. Hasta el momento, los mejores resultados han sido obtenidos con el arroz perenne, el cual fue desarrollado mediante la hibridación entre el arroz anual (*Oryza sativa* ssp. indica) y su pariente perenne rizomatoso, *O. longistaminata* (Sacks et al., 2003, Tao y Sripichitt, 2000). Tras ciclos de retrocruzamientos con arroz anual y selección de los productos de la retrocruza, ya se dispone de cultivares de arroz perenne con rendimientos de grano comparables a los del arroz anual y capaces de mantener ese rendimiento hasta ocho cosechas consecutivas (Zhang et al., 2023, Hu et al., 2022). Para sorgo perenne, por su parte, se observaron muy buenos rendimientos durante dos años seguidos, aunque la perennidad de las plantas estuvo afectada en regiones frías (Cox et al., 2018).

Para la mayoría de las especies, las limitantes más frecuentes son la estabilidad del carácter perenne, la fertilidad de la progenie y el mantenimiento de la perennidad durante el desarrollo de líneas de alto rendimiento (Chapman et al., 2022). En efecto, la principal limitante detectada para la obtención de trigo perenne ha sido la dificultad de la introgresión de la perennidad desde *Thinopyrum* spp. como donador a genotipos comerciales de trigo (Zhao et al., 2012, Bell et al., 2010, Cox et al., 2010). De todas formas, al evaluarse 150 líneas derivadas de un cruzamiento trigo x *Thinopyrum* spp., se observó que, luego de tres años, el 61 % de las líneas mostraron alguna capacidad de rebrote y que una pequeña parte de ellas aún producía grano (Hayes et al., 2012). Al parecer, algunos de los atributos del hábito de crecimiento perenne están presentes cuando se añaden a las líneas híbridas cromosomas adicionales procedentes de donantes perennes (DeHaan et al., 2014, Zhang et al., 2014, Lammer et al., 2004). No obstante, esta adición en las líneas de progenie con menos cromosomas del padre anual suele presentar una grave inestabilidad genética, lo que imposibilita la evaluación de los efectos de genomas completos utilizando generaciones avanzadas debido a la eliminación de cromosomas (Cui et al., 2018). Intentar comprender cuántos genomas

de trigo y *T. intermedium* mejorarían la perennidad del hábito de crecimiento perenne parecería clave en este proceso.

La conversión de especies anuales a perennes podría realizarse también a través de la domesticación acelerada mediante ciclos repetidos de selección en especies perennes de bajo rendimiento. El ejemplo más exitoso de esta estrategia hasta ahora es *T. intermedium*, gramínea que se ha utilizado sobre todo como forraje, pero que actualmente se está desarrollando para su uso como cultivo de grano perenne mediante la domesticación *de novo*. En el Land Institute, se han llevado a cabo once ciclos de selección y cruzamiento dirigido de las mejores plantas en función de su rendimiento en grano, tamaño de semilla, resistencia a la rotura de la espiga, entre otras variables de interés, lo que ha dado lugar a poblaciones mejoradas de *T. intermedium* que actualmente están siendo evaluadas y seleccionadas por colaboradores en diversos ambientes (DeHaan, 2022; DeHaan et al., 2020).

Otras especies de grano perenne que actualmente son objeto de domesticación acelerada y/o esfuerzos incipientes de mejoramiento incluyen el pariente perenne del girasol, *Silphium integrifolium* (Vilela et al., 2018, Van Tassel et al., 2017), el lino perenne (*Linum* sp.) (Tork et al., 2019), la cebada perenne (*Hordeum* sp.) (Westerbergh et al., 2018) y varias especies de leguminosas perennes (Schlautman et al., 2018). A lo largo del mundo, desde diferentes disciplinas, más de 40 instituciones de investigación están trabajando para el desarrollo de cultivos perennes (Crews et al., 2018).

1.3. TINOPIRO: UN GRANO PERENNE DOBLE PROPÓSITO

Aunque muchas especies han mostrado potencial para su domesticación como cultivo de grano perenne, Tinopiro (*Thinopyrum intermedium*) (Host) Barkworth & D.R. Dewey] ha resaltado entre ellas (Wagoner y Schauer, 1990). Tinopiro es una gramínea perenne, hexaploide ($2n = 6x = 42$), con un incipiente grado de domesticación, está relacionado genéticamente al trigo común (*Triticum aestivum*), presenta alogamia y autoincompatibilidad, y pertenece a la tribu de las tritíceas y a la familia de las poaceas (Mahelka et al., 2011). Es nativo del sur de Europa, medio-oeste

de Asia Central, y su zona de influencia primaria llega hasta el oeste de Pakistán (Tzelev, 1983). Introducido a EE. UU., con el nombre de *intermediate wheatgrass* en 1932, fue implementado como cultivo forrajero en el área superior del medio oeste debido a su resistencia al frío y a su calidad de forraje (Moore et al., 1995, Hitchcock, 1951). Su distribución en América del Norte abarca todas las regiones de los EE. UU. y llega hasta Manitoba (Canadá). En esas latitudes, Tinopiro ha sido usado predominantemente como forraje para el engorde de ganado, dada su elevada producción de materia seca anual y calidad (Moore et al., 1995). El grano presenta altos niveles nutritivos (proteína: 20,8 %; grasa: 3,21 %; cenizas: 2,64 %) en comparación con el trigo anual, aunque se remarca la necesidad de aumentar su contenido de gluten para mejorar su calidad de panificación (Rahardjo, 2017, Becker et al., 1991). En este sentido, se han identificado en la especie genes homeólogos a los de trigo (además de genes *de novo*) asociados con subunidades de glutenina con alto peso molecular, las cuales permiten obtener mayor elasticidad y fuerza de masa en la panificación (Zhang et al., 2014). El grano del Tinopiro se comercializa en EE. UU. con el nombre de Kernza (Kernza.org). Algunas empresas en este país ya están elaborando pan con dicho grano utilizándolo en un 20 % junto con un 80 % del trigo tradicional (General Mills, Inc.); además, también se ha fabricado la primera cerveza de Tinopiro (Patagonia Provisions). El interés del mercado en EE. UU. ha superado ampliamente la oferta, ya que panaderías artesanales y ecológicas y varios restaurantes convierten el grano de Kernza en panes, galletas y pasta (Broom, 2019). Estas iniciativas indican las grandes aptitudes que tiene el grano de la especie con solo algunos ciclos de selección artificial en su historia.

Debido a sus aptitudes tanto forrajeras como graníferas, Tinopiro es considerado como un cultivo perenne con alto potencial doble propósito, lo que implica su capacidad para proporcionar una doble fuente de ingresos y mayor flexibilidad en empresas agrícolas ganaderas (Bell et al., 2008, Moore et al., 1995). La incorporación de cultivos doble propósito puede mejorar la economía de las explotaciones a través de la producción de forraje adicional, lo que alargaría los períodos de descanso de las especies forrajeras en uso, mejoraría el manejo de las malezas y posibilitaría el aumento de la carga ganadera (Dove y Kirkegaard, 2014). En muchos países, como

Estados Unidos, Canadá, Argentina, Marruecos, Pakistán, Siria, Uruguay, Australia y los países mediterráneos, la cosecha y/o el pastoreo otoñal de cereales, principalmente trigo y cebada, proporciona una buena fuente de forraje de alta calidad en el período muchas veces restrictivo de alimento (Harrison et al., 2011). No obstante, este sistema doble propósito sería viable si el valor forrajero obtenido fuera superior a cualquier penalización en la producción de grano por el pastoreo o el recorte de forraje (Hajighasemi et al., 2016). La respuesta del pastoreo o la cosecha de forraje mecánico al rendimiento en grano en cultivos anuales como el trigo, la cebada y la canola es altamente variable (-35 a +75 %), lo que sugiere la presencia de varios factores involucrados en este tipo de sistema de producción (Bell et al., 2014). Las penalizaciones en rendimiento de grano en respuesta al pastoreo han sido mayoritariamente atribuidas a la eliminación de los puntos de crecimiento del cultivo debido a una época de defoliación inadecuada (tardía) y a una menor superficie fotosintética tras la eliminación del forraje (Virgona et al., 2006). Por el contrario, la mejora en rendimiento en grano por el pastoreo bajo condiciones favorables (principalmente bajo buena disponibilidad hídrica) puede ser atribuida a una menor incidencia del vuelco, disminución de las enfermedades foliares y una rápida recuperación del área foliar; en condiciones de estrés, esta mejora se ha relacionado con una menor transpiración (conservación de la humedad del suelo), retraso de la fonología y mayor removilización de las reservas del tallo hacia los granos (Harrison et al., 2011).

El impacto de la defoliación sobre el rendimiento en grano de especies perennes invernales bajo un sistema doble propósito es mucho menos conocido. Sin embargo, la escasa información disponible apunta hacia el impacto negativo de la defoliación sobre el posterior rendimiento en grano. Para raigrás perenne (*Lolium perenne*) en Nueva Zelanda (Brown, 1980) y festuca alta (*Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort., nom. cons.) en Australia (Williams y Boyce, 1977) y en EE. UU. (Ward et al., 1984, Watson y Watson, 1982), la defoliación tardía (fines de invierno y principios de primavera) afectó el rendimiento en grano. La penalización en grano a causa de defoliación también ha sido evidente en Tinopiro, así como en *Dactylis* (*Dactylis glomerata* L.) y *Bromus inermis* Leyss (Hopkins et al., 2003). Además, en este último

trabajo, y como lo han planteado también para cultivos anuales, se evidencia una fuerte caída del rendimiento en grano de Tinopiro con defoliaciones posteriores al estado de crecimiento según escala Zadoks 30.

Agricultores de América del Norte que han tenido algún contacto directo con Tinopiro identificaron a la posibilidad de uso doble propósito como una práctica muy relevante para la adopción del cultivo (Lanker et al., 2019). Recientes resultados en el hemisferio norte muestran que la sostenibilidad de la producción de Tinopiro depende en gran medida de cómo se utilice el coproducto heno o paja luego de la cosecha del grano y de la medida en que los insumos externos puedan ser sustituidos por recursos renovables disponibles localmente (Law et al., 2022). Los sistemas integrados de cultivo y ganadería parecen ser un escenario viable para la adopción de esta especie como cultivo perenne de doble propósito (Law et al., 2022).

1.3.1. Tinopiro y sus servicios ecosistémicos

Muchos reportes remarcan un importante incremento en los servicios ecosistémicos por el hecho de incorporar los sistemas agrícolas cultivos perennes (Amaducci et al., 2016, Chimento y Amaducci, 2015, Glover et al., 2007, Tilman et al., 2006) y, para el caso específico de Tinopiro, se ha generado información muy relevante al respecto. Esta especie ha mantenido una muy alta eficiencia en el uso de agua durante una amplia estación de crecimiento y ha mostrado, además, mayores tasas de evapotranspiración y absorción neta de carbono (secuestro de C) en comparación con cultivos anuales (De Oliveira et al., 2018). Por otro lado, en el segundo año de vida de la especie, se han evidenciado menores niveles de humedad en perfiles profundos y menores pérdidas de nitratos (86 %) en comparación con el trigo anual, lo que indica que sus raíces perennes y muy desarrolladas poseen capacidad para disponer de mayor cantidad de agua y nutrientes (Culman et al., 2013). Sakiroglu et al. (2020) estimó que la biomasa seca subterránea a 1 m de profundidad en el otoño del segundo año de producción alcanzó una media de 478,3 g m⁻² independientemente de la aplicación de nitrógeno y manejo de defoliación. La concentración de nitratos en la solución del suelo a 50 cm por debajo de la superficie bajo altos niveles de

fertilización fue de uno y dos órdenes de magnitud inferior en Tinopiro en comparación con *switchgrass* (*Panicum virgatum* L.) y maíz, respectivamente (Jungers et al., 2019). En un suelo arenoso, la concentración de nitratos bajo Tinopiro fue de 77 a 96 % menor que la encontrada en un sistema de rotación maíz-soja, lo que confirma que esta especie reduce eficazmente la lixiviación de este nutriente incluso en suelos porosos con mayor potencial de contaminación de aguas subterráneas (Reilly et al., 2022). En efecto, Tinopiro es capaz de desarrollar sistemas radiculares activos en absorción de agua por lo menos hasta los dos metros de profundidad (Clément et al., 2022), por lo que su capacidad de absorber agua presenta un gran potencial bajo condiciones de sequía (Sleiderink, 2020). Al parecer, la capacidad de Tinopiro para resistir el estrés hídrico y retener altos valores de humedad del suelo no sería solo por contar con raíces profundas, sino también a sus altos valores de Ω (factor de desacople microambiental), lo que implica que su evapotranspiración no dependa tan estrictamente de fluctuaciones de agua en el suelo y, por ende, de la conductancia estomática (Sutherlin et al., 2019). Su perennidad y su desarrollado sistema radicular son el sustento para reducir la carga de sedimentos y nutrientes perdidos también por escorrentía y aumentar la calidad del agua bajo producción (Ashworth et al., 2023). Por otra parte, la defoliación bajo un manejo doble propósito incrementaría el ciclado de nutrientes al desencadenar una respuesta fisiológica en Tinopiro que inicia con la muerte de las raíces y la exudación del sistema radicular para aumentar la disponibilidad de nutrientes a través de la mineralización y así facilitar el restablecimiento del crecimiento aéreo (Pugliese et al., 2019). Debido a todas estas características, Tinopiro tiene el potencial de ser utilizado en regiones del mundo sin acceso a irrigación y con mínimos requerimientos de fertilización. Moore et al. (2003) lo define como un cultivo muy versátil, capaz de tolerar moderados niveles de sequía, salinidad, anegamiento y alcalinidad.

1.3.2. Comportamiento agronómico de Tinopiro

1.3.2.1. Cualidades alimenticias del grano

El Tinopiro fue seleccionado como el primer grano perenne del mundo debido a su moderada dehiscencia, facilidad de trilla, tamaño aceptable y altos valores nutritivos del grano, que le permiten elaborar productos de panificación o bebidas (Becker et al., 1991, Wagoner y Schauer, 1990). En comparación con trigo, Tinopiro presenta mayores niveles de proteína (20,8 %), de grasa (3,2 %) y de cenizas (2,6 %), fibra alimenticia total (16-19 %) y antioxidantes (Hayek, 2020, Tyl e Ismail, 2019, Mathiowetz, 2018, Rahardjo et al., 2018, Becker et al. 1991). Aunque la proteína del grano de Tinopiro es nutricionalmente pobre en lisina al igual que el trigo comercial, tiene mayores niveles que trigo en todos los otros aminoácidos esenciales (Becker et al., 1991). Las harinas con una proporción 50:50 de Tinopiro y de trigo tienen altos valores nutricionales sin que cambien drásticamente las cualidades de panificación (Marti et al., 2015). El mejoramiento genético realizado en la especie ha aumentado el tamaño de las semillas y el contenido de almidón, sobre todo a expensas de la fibra dietética. Aunque el contenido medio de proteínas ha disminuido a causa de este proceso, aún superan los de la mayoría de los cereales anuales, como el trigo panificable (Bharathi et al., 2022).

1.3.2.2. Rendimiento en grano

El rendimiento de grano de Tinopiro en el hemisferio norte en monocultivo puro ha tenido valores muy variados, desde 112 kg ha⁻¹ (Culman et al., 2013) hasta 1089 kg ha⁻¹ (Favre et al., 2019) para el primer año de producción y desde 3 kg ha⁻¹ (Pugliese, 2017) hasta 1662 kg ha⁻¹ (Culman et al., 2013) para el segundo año. En Franco et al. (2021) se puede ver una revisión de los rendimientos obtenidos a campo bajo diferentes condiciones. Hasta el momento, el mejor rendimiento en grano cosechado de forma mecánica ha sido de 950 kg ha⁻¹ en Minnesota, cuyo peso de 1000 granos alcanzó los 15 mg (Zhang et al., 2016). Aunque el rendimiento en grano es muy

variable, hay consenso en afirmar la existencia de una disminución de este con los años de producción (Law et al., 2021, Pinto et al., 2021b, Zimbric et al., 2020, Tautges et al., 2018). Una de las principales hipótesis que se han planteado para explicar este comportamiento es la competencia intraplanta que se ha observado al paso de los años, lo que resulta generalmente en menor número de tallos fértiles y más débiles (Law et al., 2021, Altendorf et al., 2021). Los posibles mecanismos específicos para la disminución del rendimiento incluyen (a) interacciones dependientes de la densidad en la rizosfera que disminuyen la asignación de recursos a la producción de grano (Tautges et al., 2018), (b) cambios en la calidad de la luz en la corona que reducen la iniciación de los tallos reproductivos (Jungers et al., 2017) y (c) limitación de agua o nutrientes durante los períodos críticos de crecimiento y reproducción (Hunter et al., 2020a, Tautges et al., 2018). A medida que las plantas envejecen, existen cambios en la asignación de recursos, desde estrategias competitivas a estrategias tolerantes al estrés (Jaikumar et al., 2016). Estos cambios pueden imponer limitaciones fisiológicas en la producción de granos en stands de plantas perennes desarrollados, aunque manejos apuntando a la reducción de biomasa en crecimiento podrían superar estos límites (Law et al., 2021). La información generada hasta el momento sugiere que la disminución del rendimiento con la edad del cultivo no es causada por la limitación de recursos, ya que la producción total de biomasa se mantiene o aumenta de un año a otro, mientras que el índice de cosecha disminuye (Law et al., 2021).

1.3.2.3. Calidad nutritiva del forraje

Desde su introducción a EE. UU. desde Eurasia en el año 1932, Tinopiro se implementó como un cultivo forrajero en el medio oeste y en las grandes llanuras de América del Norte debido a su resistencia al frío y a su alta calidad forrajera (Ogle, 2018, Moore et al., 1995, Hitchcock, 1951). Numerosos cultivares forrajeros han sido liberados durante el siglo XX y principios del XXI (Jensen et al., 2016). Tinopiro ha sido una de las gramíneas perennes en las que mayor esfuerzo se ha puesto en el desarrollo de nuevas variedades con mejor calidad forrajera, entre otros atributos de interés. Aunque con fuertes variaciones estacionales, la calidad nutritiva de su forraje

es considerada excelente para el engorde y mantenimiento de diversas categorías de ganado (Moore et al., 1995). El valor nutritivo del forraje en la primavera antes de que los tallos comiencen a elongar es el más alto en relación con la materia seca (201-225 g kg⁻¹ de proteína cruda (PC), 456-504 g kg⁻¹ de fibra detergente neutro (FDN) y 249-299 g kg⁻¹ de fibra detergente ácido (FDA) (Pinto et al., 2021a, Barriball, 2020, Favre et al., 2019, Jensen et al., 2016b;). En contraste, los valores nutritivos observados en el verano luego de la cosecha de grano son mucho más bajos (45-51 g kg⁻¹ de PC, 670-702 g kg⁻¹ de FDN y 381-427 g kg⁻¹ de FDA (Pinto et al., 2021a, Favre et al., 2019).

El valor nutritivo del forraje de Kernza en regiones de alta latitud es adecuado para las vacas de carne lactantes, las vacas lecheras y los novillos en crecimiento cuando es cosechado en primavera y otoño, y para las vacas de carne en verano (Pinto et al., 2021a, Favre et al., 2019). Esta paja cosechada en verano luego de la cosecha del grano además puede utilizarse en raciones mixtas para el ganado lechero, como cama para los animales o como materia prima energética de biomasa (Jungers et al., 2017, Wang et al., 2014).

1.3.2.4. Producción forrajera

En el norte y centro de América del Norte se han reportado rendimientos de forraje con promedios de 6450 kg ha⁻¹ año⁻¹ y 7419 kg ha⁻¹ año⁻¹ para el primer año y subsecuentes zafras de producción (segundo, tercero o cuarto año), respectivamente (Franco et al., 2021). Las cosechas de forraje en primavera y otoño aportan entre un tercio y una cuarta parte de la biomasa cosechada en verano en regiones de alta latitud y tienen un mayor valor nutritivo del forraje, lo que contribuye sustancialmente a la rentabilidad de la especie (Pinto et al., 2021a, Hunter et al., 2020a, Favre et al., 2019). A través de nueve sitios en América del Norte, la producción de biomasa de primavera y otoño en promedio fue de 1352 y 1820, respectivamente, para el primer año y de 1648 y 1271 kg ha⁻¹ para el segundo año (Pugliese, 2017). Culman et al. (2023) estimaron 6000, 4500 y 5700 kg ha⁻¹ de materia seca de forraje en cosechas de verano para el primer, segundo y tercer año, respectivamente. Descartando los efectos de enmalezamiento o momentos tardíos de corte en la primavera (elongación de tallos en

curso), la defoliación primaveral y otoñal no afectan la producción de grano de Tinopiro (Picasso, 2023). Asimismo, aunque la calidad del forraje otoñal puede ser similar al primaveral, cosechar forraje en otoño no implicó reducciones de la producción de biomasa al verano (Pinto et al., 2021a).

La ganancia media diaria de novillos pastoreando Tinopiro en primavera durante 4 a 6 semanas fue de 1 a 1,2 kg d⁻¹, lo que resalta la potencialidad de la especie para la producción de carne (Moore et al., 1995). Por otro lado, la inclusión de un 40 % de paja de Tinopiro en la dieta de vaquillonas holando redujo significativamente la ingesta de materia seca total (13,2 %), la producción de CO₂ (16,7 %) y el consumo de O₂ (16,3 %) y mantuvo ganancias de peso corporal de 0,8 a 1,0 kg d⁻¹ (Pizarro et al., 2022). Favre (2019) resalta las capacidades nutritivas del heno de Tinopiro empacado luego de la cosecha de grano para mantener el estado corporal de vacas de cría durante el invierno.

Bajo un sistema doble propósito (grano y forraje), Tinopiro puede ser manejado de forma que posibilite cosechas de forraje en la primavera, verano y otoño en regiones de alta latitud, a lo que podría sumarse la cosecha invernal en regiones de menor latitud. En regiones de latitudes bajas como Uruguay, donde durante todo el invierno se mantiene un activo crecimiento de especies invernales como Tinopiro (no existen condiciones propensas al congelamiento del suelo), podría esperarse que una cosecha otoñal seguida de una invernal no afecte la producción de biomasa estival de la especie.

1.3.2.5. Respuesta nitrogenada

El nitrógeno es el elemento más requerido por las plantas, por lo que su presencia en los suelos agrícolas es mayoritariamente deficiente; sin embargo, es el elemento más abundante en la atmósfera (Godwin y Singh, 1998). Estudiar la respuesta de N en una especie productiva comercialmente es siempre trascendente, no solo por razones económicas producto de dicha respuesta en biomasa aérea o grano, sino también por los riesgos que puede suponer para el medioambiente la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados (Martínez-Dalmau et al., 2021). En las últimas décadas, el aumento de la productividad mundial de los cultivos se ha asociado a una

multiplicación por 20 en las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados (Glass, 2003) y se espera que se multiplique al menos por 3 para el 2050 (Good et al., 2004).

El área foliar es el principal componente de la biomasa vegetal y, así como su duración, normalmente se incrementan con la disponibilidad de N (Novoa y Loomis, 1981, Watson, 1947). El efecto positivo de la fertilización nitrogenada sobre la producción de materia seca puede ser principalmente explicado por una mayor intercepción de la luz y mayor contenido foliar de N, lo que se traduce en una mayor tasa de asimilación de carbono por unidad de área (Sinclair y Horie, 1989, Osman et al., 1977).

En cereales, la disponibilidad de N también incrementa el número de tallos (Pushman y Bingham, 1976), lo que resulta en un mayor número de espigas por unidad de área, el cual es el principal componente de rendimiento en estos cultivos (Slafer y Rawson, 1994). Según el momento de la aplicación nitrogenada, se podría estar afectando la producción de tallos y, por ende, la de espigas (aplicaciones en siembra o en macollaje temprano) o el peso de los granos (aplicaciones durante el encañado o previo a la antesis) (Spiertz, 1983, Langer, 1980, Holmes, 1973, Langer y Liew, 1973). Fertilizaciones tardías, aunque causan incremento en el peso de granos, estarían reduciendo el rendimiento de grano (Paolo et al., 2022).

Aunque la información acerca del efecto de la disponibilidad de N sobre la producción de semillas en especies perennes es bastante más escasa, la tendencia es la misma que para anuales: las aplicaciones tempranas, específicamente alrededor del estado de doble arruga (Z22 escala Zadocks), impactan positivamente de forma significativa en cultivos como *Lolium perenne* y festuca alta (Chastain et al., 2014, Young et al., 1996, Hebblethwaite y Ivins, 1977). Conocer la respuesta a la aplicación de N es crítico en un cultivo doble propósito, ya que este factor puede afectar tanto la producción de grano como de forraje (Koeritz et al., 2013, Vogel et al., 2002). La respuesta de los rendimientos de Tinopiro a la fertilización con N ha mostrado un comportamiento cuadrático, con una tasa óptima de N entre 61 y 96 kg N ha⁻¹ para grano y de 81 a 121 kg ha⁻¹ para forraje (Jungers et al., 2017). Zimbric et al. (2020) encontraron incrementos tanto en biomasa como en rendimiento de grano al pasar de dosis de 90 a 135 kg N ha⁻¹. Además, Tinopiro ha mostrado particular adaptación a

complementarse productivamente con leguminosas y, dependiendo de las condiciones de producción, ha aumentado su producción de biomasa total en la mezcla sin reducir su rendimiento en grano (Reilly et al., 2022). Acompañar a Tinopiro con una leguminosa aumenta la calidad del forraje, aunque, para mantener los rendimientos de forraje y grano en comparación con el monocultivo de Tinopiro, la elección de la estación de siembra y la especie de leguminosa es clave (Pinto et al., 2022).

1.3.2.6. Competencia con malezas

La competencia con malezas es otro factor clave del manejo agronómico de los cultivos perennes. Dependiendo del momento, la frecuencia y la intensidad de la cosecha de forraje, cada corte puede ofrecer una oportunidad para que las malezas utilicen recursos y crezcan, lo que perjudica el rendimiento futuro de forraje y grano o, por el contrario, ofrece ventajas competitivas a las especies sembradas (Ghanizadeh y Harrington, 2019, Meiss et al., 2010). La defoliación severa (es decir, de alta intensidad y frecuencia) disminuye la supervivencia de las gramíneas perennes, lo que se ve agravado por el aumento de la competencia de las especies invasoras en tales circunstancias (García-Favre et al., 2022, Donaghy y Fulkerson, 2002, Hoveland et al., 1996, O'connor, 1991, Belton, 1990; Beaty y Powell, 1976). En el manejo de la defoliación es muy difícil separar el efecto de la altura y el de la frecuencia de corte, ya a que a altas frecuencias es muy difícil conseguir tasas de crecimiento tan elevadas que impliquen lograr altas alturas en el forraje. Sin embargo, en *switchgrass* la mayor altura del forraje remanente luego de un corte estuvo asociado a una mayor intercepción de la luz por el canopeo y a una menor infestación de malezas (Bekewe et al., 2019). En *Bromus inermis* y *Bromus riparius*, la intensidad de defoliación favoreció notoriamente la proliferación de malezas, lo que se podría explicar por una disminución de la habilidad de estas especies forrajeras para rebrotar y dejar mayores recursos disponibles a malezas para establecerse y desarrollarse (Harker et al., 2000).

Específicamente para Tinopiro, agricultores de América del Norte identificaron la competencia con malezas como una de las principales limitantes de información necesaria para la adopción del cultivo en sus sistemas de producción (Lanker et al.,

2019). Durante un experimento de tres años con alturas de corte de 10 cm, independientemente de los momentos de corte de forraje (control, un corte en el verano, verano + otoño, primavera + verano + otoño), la biomasa de malezas en sistemas doble propósito de Tinopiro disminuyó una media del 88 % durante tres años y los tratamientos con y sin malezas tuvieron una producción similar de grano y forraje, lo que sugiere que la competencia con malezas puede no tener efectos negativos en el cultivo (Zimbric et al., 2020). Sin embargo, Weik et al. (2002) informaron de un aumento de la biomasa de malas hierbas del primer año al segundo, aunque las magnitudes fueron demasiado bajas para afectar a la productividad de grano y forraje. Recientemente, Duchene et al. (2023) documentaron, durante un estudio de 4 años, que el enmalezamiento no afectó el rendimiento de grano ni la producción de forraje de Tinopiro. En este trabajo, a medida que envejecía el cultivo, la composición de las comunidades de malezas cambió de hojas anchas y anuales en el primer año a gramíneas y perennes para el cuarto año; además, la biomasa de malezas se mantuvo constante durante la primavera de todos los años y se redujo gradualmente durante el otoño.

1.3.2.7. Desafíos de Tinopiro para su expansión geográfica

Tinopiro se presenta como una especie doble propósito con características únicas, ya que puede proporcionar los beneficios ecológicos asociados a las plantas perennes al tiempo que ofrece una cosecha de grano para consumo humano que no requiere la siembra anual y el uso intensivo de los insumos que se requieren para los cultivos anuales. Sin embargo, el rendimiento y tamaño de grano aún presentan serias limitantes para su consolidación como cultivo netamente doble propósito (Lanker et al., 2019). De todas formas, tanto la respuesta a la selección en rendimiento en grano por superficie como en peso de mil granos han sido de 40 kg ha ciclo⁻¹ y 0,1 mg ciclo⁻¹, respectivamente (DeHann, 2022). Aunque son evidentes las fortalezas agroecosistémicas de este cultivo, los principales esfuerzos tanto en mejoramiento genético como en la generación de estrategias para su manejo agronómico se están desarrollando en América del Norte (EE. UU. y Canadá). Los requerimientos de

vernalización de Tinopiro (Ivancic et al., 2021) son una de las principales limitantes (sino la más importante) para la expansión geográfica de Tinopiro en regiones con inviernos más templados. Por otro lado, el comportamiento agronómico, así como las respuestas a la selección a esperar para los caracteres de interés a mejorar bajo regiones templadas, son temáticas aún no exploradas en la especie. La generación de conocimiento en estas áreas podría otorgar las herramientas básicas necesarias para la adopción de Tinopiro en regiones templadas con inviernos suaves.

1.3.3. Requerimientos de vernalización

Todos los organismos vivos desarrollan diferentes mecanismos para garantizar su supervivencia bajo las condiciones climáticas locales en respuesta a diferentes estímulos ambientales. En este sentido, la coordinación de la época de floración con la ubicación geográfica y los patrones climáticos estacionales tiene un efecto profundo en la floración y el comportamiento reproductivo (Amasino, 2010). La estricta regulación de la floración es un proceso adaptativo importante que se ha utilizado en la agricultura para que las plantas florezcan de forma sincronizada y en el momento óptimo para maximizar el rendimiento de las semillas (Puruggana y Fuller, 2009). Las plantas que no florecen en el momento adecuado probablemente no sean lo suficientemente fértiles y, por tanto, serán menos competitivas a largo plazo (Bettgenhaeuser et al., 2017). La inducción a florecer, en general, puede referirse a la percepción, la transducción y la transmisión de señales ambientales que dan lugar a un cambio en los patrones de desarrollo de estas pasando del estado vegetativo a reproductivo (Heide, 1994). Entre los mayores estímulos necesarios por las plantas para florecer se encuentran la temperatura y el fotoperíodo (Sharma et al., 2020). La mayoría de las plantas que crecen en climas templados comienzan a florecer solo después de la exposición al frío prolongado, un proceso conocido como vernalización (Kim et al., 2009, Trevaskis et al., 2007, Amasino, 2004). Las células del meristemo apical perciben el frío, siendo las hojas los órganos que perciben los estímulos lumínicos (Bernie, 1988, Lan, 1965, Chouard, 1960). La percepción de las bajas temperaturas por parte de las plantas probablemente invoca dos procesos secuenciales:

percibir la reducción de temperatura para inducir respuestas de tolerancia que permitan la aclimatación al frío y contabilizar la dosis de frío para futuras transiciones de desarrollo (Xu y Chon, 2018). Cultivares de cereales de invierno templados de especies como trigo y cebada (con requerimientos de frío para florecer) sin los estímulos de vernalización permanecen en estado vegetativo y su transición al estado reproductivo solo se produce cuando se saturan los requisitos de vernalización (Sharma et al., 2020). Además, la aclimatación al frío en otoño del hemisferio norte de los cereales invernales sienta las bases para su supervivencia en el siguiente proceso de vernalización durante el invierno. La combinación entre los requerimientos de vernalización y de fotoperíodo largo (días largos) inductivo posterior evita que la planta florezca de forma precoz cuando la duración del día es todavía corta y asegura la floración en condiciones favorables durante la primavera, cuando los días son largos y la temperatura está aumentando. Las plantas que requieren vernalización para florecer codifican represores que bloquean la floración durante el verano o el otoño hasta que la planta se expone a bajas temperaturas invernales (Andrés y Coupland, 2012). Para cereales de invierno que requieren vernalización (como trigos y cebadas invernales) se han identificado genes reguladores en respuesta a este proceso para ajustar la iniciación floral, como *VRN1*, *VRN2* y *VRN3* (Andrés y Coupland, 2012, Greenup et al., 2009). Estos genes han sido ampliamente implicados en la determinación de la respuesta a la vernalización en esas especies y son responsables de gran parte de la variación intraespecífica para este carácter. Por ejemplo, algunas variedades de trigo y cebada primaverales presentan mutaciones en el locus *VRN1* que dan lugar a una expresión constitutiva de *VRN1*, lo que resulta en ausencia de requerimientos de vernalización para florecer (Chu et al., 2011, Yan et al., 2003). Fu et al. (2005) describieron para trigo grandes deleciones de varios kb de longitud en el primer intrón de los cromosomas homólogos de *VRN1* asociados con el hábito primaveral. El hecho de que los alelos dominantes de *VRN1* lleven inserciones y/o deleciones en comparación con los alelos recesivos (intactos) puede sugerir que son evolutivamente más jóvenes (Milec et al., 2023). Los niveles de expresión bajo condiciones de vernalización detectados en homólogos de algunos de estos genes en especies como *Brachipodium distachyon*, *Festuca pratensis* y *Lolium perenne* confirmarían la función conservada

en la promoción de la floración también en especies de gramíneas perennes (Herridge et al., 2021, Bettgenhaeuser et al., 2017, Ream et al., 2014, Ergon et al., 2013). Los requerimientos de vernalización pueden diferir entre varias especies de plantas y también en diferentes ecotipos dentro de una especie. La temperatura óptima para la vernalización y la duración adquirida de esta varían entre diferentes especies y accesiones de la misma especie (Sharma et al., 2020). En términos generales, la temperatura óptima de vernalización se sitúa apenas unos pocos grados Celsius por encima o alrededor del punto de congelación (Duncan et al., 2015, Wollenberg y Amasino, 2012).

La vernalización se conoce y estudia desde hace mucho tiempo, pero algunos mecanismos aún no se han dilucidado. Un número creciente de estudios ha aportado nuevos hallazgos que se han utilizado para desarrollar varios modelos del posible funcionamiento de la vernalización (Milec et al., 2023). En cereales, la vernalización activa la expresión de *VRN1* en el ápice del brote y en las hojas, y mantiene una elevada expresión al finalizar el invierno (Distelfeld et al., 2009, Sasani et al., 2009, Yan et al., 2003). *VRN2* es un represor de la floración que se expresa en las hojas en días largos (Dubcovsky et al., 2006, Trevaskis et al., 2006, Yan et al., 2004), por lo que parece probable que *VRN2* retrase la floración suprimiendo la inducción de *FTI* (*VRN3*) en días largos (Hemming et al., 2008). *FTI*, el cual es un activador conservado de la floración en plantas (Boden et al., 2015, Turner et al., 2005), solo se expresa tras la vernalización (Hemming et al., 2008, Yan et al., 2006). *VRN1* regula a la baja la expresión de *VRN2* (Trevaskis et al., 2006, Loukoianov et al., 2005), por lo que esta regulación de *VRN2* por *VRN1* proporciona un mecanismo para permitir la inducción de *FTI* en días largos en las hojas de plantas vernalizadas (Sasani et al., 2009, Hemming et al., 2008). La expresión de *FTI* estimula aún más la expresión de *VRN1* para reforzar esta vía inductiva y dar lugar a una transición irreversible a la floración (Lv et al., 2014) (figura 1).

La inducción de la floración por la vernalización en cereales es un proceso epigenético, en el que el estado de la cromatina de *VRN1* parecería tener un rol central. La vernalización provoca un aumento de los niveles de trimetilación de la histona 3 lisina 4 (H3K4me3) y una pérdida de H3K27me3 en *HvVRN1* (ortólogo de *VRN1* en

cebada), lo que sugiere que la vernalización promueve un estado de cromatina activa en *VRNI* (Oliver et al., 2009). Estos cambios en la cromatina de *VRNI* se mantienen tras la vernalización, lo que sugiere que la memoria de la vernalización en los cereales implica herencia epigenética de las modificaciones de las histonas asociadas a la transcripción activa en *VRNI*. Para trigo invernal, también se demostró que la cromatina de *VRNI* sufre cambios de metilación de histonas (H3K4me3 y H3K27me3) durante la vernalización, lo que posiblemente afecta la expresión de *VRNI* (Xiao et al., 2014).

Los segmentos cromosómicos están sujetos a reordenamientos (deleciones o duplicaciones), los que, si son mayores a 1 kb, se denominan como variaciones del número de copias (Zmieńko et al., 2014). En poliploides como trigo o Tinopiro, estas copias pueden traducirse en número de copias génicas por genoma (Würschum et al., 2015). En trigo, los homólogos *VRN-A1*, *VRN-B1* y *VRN-D1* están localizados en cromosomas diferentes (Snape et al., 2001), pero los genes *VRNI* individuales también pueden estar presentes en múltiples copias en el mismo cromosoma. Los diferentes genes involucrados en la respuesta a la vernalización y sus mutaciones, sumado a las diferentes copias que un individuo pueda contar de estos genes, estarían generando variabilidad genética y, por ende, posibilidades de selección. En efecto, el mayor número de copias de *vrn-A1* dentro del mismo cromosoma 5A, asociado a SNP en los exones 4 y 7 de *VRNI*, provocaron un mayor requerimiento de vernalización; las plantas con más de una copia necesitaron un período de frío más prolongado para iniciar la transcripción de *VRN-A1* (Li et al., 2013, Díaz et al., 2012).

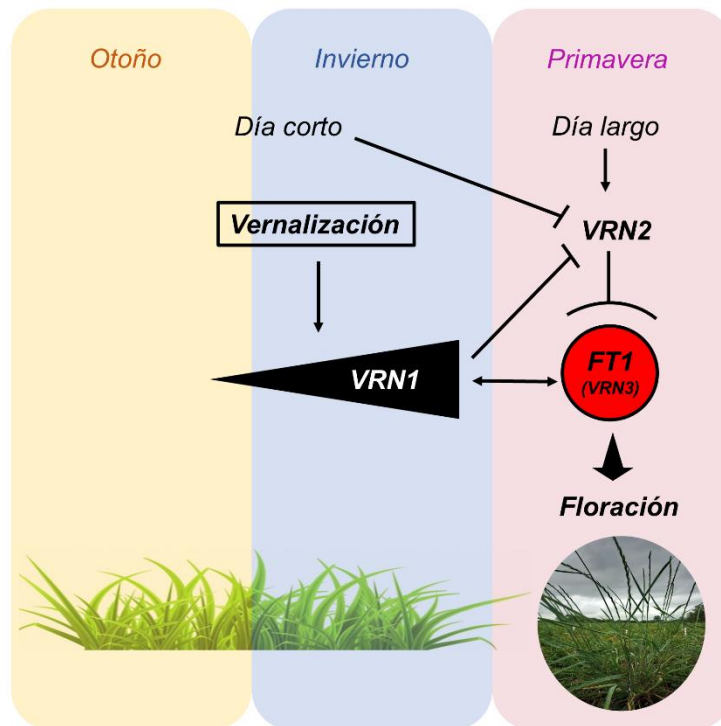


Figura 1. Modelo general de control de la floración en cereales invernales por los principales genes asociados a vernalización. Desde fines de otoño y durante el invierno, la acumulación de horas de frío permite llegar a la primavera con altos niveles de expresión de *VRN1*. Los días largos hacia principios de primavera permitirían el aumento de expresión de *VRN2* (represor de *FT1*), pero la elevada expresión de *VRN1* lo regula a la baja. Bajo estas condiciones, el producto de expresión de *FT1* se difunde al domo apical y estimula el inicio de formación de órganos florales.

1.3.3.1. Requerimientos de vernalización en gramíneas

La mayoría de las gramíneas perennes invernales tienen un requisito de inducción doble para la floración: 1) un requisito de inducción primario donde temperaturas bajas y días cortos son los factores principales y 2) un requisito de inducción secundario basado en la respuesta a días largos (Chastain y Young, 1998). En numerosas especies, los estímulos de día corto pueden sustituir a los estímulos de frío requeridos para florecer durante la inducción primaria. De todas formas, muchas especies, incluidas muchas gramíneas como *Poa Pratensis*, *Phalaris arundinacea*,

Dactylis glomerata L., *Festuca rubra*, *Festuca pratensis*, *Phalaris aquatica*, no pueden responder a las condiciones de inducción y florecer antes de que hayan alcanzado una determinada edad o tamaño (Aamlid, 2005, Havstad, 1996, Heide, 1987, Meijer, 1984, Heichel et al., 1980, Calder, 1963, Ketellapper, 1960). Luego de este período «juvenil», el cual está más asociado a la incapacidad de responder a estímulos fotoperiódicos (Huijser y Schmid, 2011), en el que las plantas aún no estarían preparadas para responder a los estímulos de frío o de día corto, pasarían a un estado maduro para florecer o estado adulto a partir del cual los estímulos de vernalización ofrecidos por el ambiente serían censados (Lang, 1965). La duración de esta fase de maduración o estado juvenil podría variar considerablemente en las gramíneas, como fue demostrado para maíz por Foerster et al. (2015), e incluso puede estar ausente en algunas especies del género *Lolium* y en *Hordeum bulbosum*, que responden a las bajas temperaturas durante la germinación de las semillas (Cooper, 1960, Koller y Highkin, 1960). Esta respuesta también ha sido demostrada en ecotipos adaptados a altas latitudes y/o regiones alpinas en *Arabidopsis thaliana* (Sheldon et al., 2000).

Las gramíneas perennes invernales difieren en sus requerimientos de inducción primaria (frío y día corto) para florecer (Heide, 1994). Raigrás perenne (*Lolium multiflorum* L.) en condiciones de día corto (8 h de luz) requirió entre 9 y 12 semanas a 6 °C para lograr los mayores niveles de floración y se demostró que tanto el frío como el día corto fueron estímulos determinantes para completar los requerimientos en inducción primaria en esta especie (Aamlid et al., 2000). *Dactylis glomerata* L. requiere 10 semanas de exposición entre 9 y 12 °C y 8 h de fotoperíodo para lograr plena inducción primaria de floración (Heide, 1987). Por otro lado, la cebada invernal requiere de por lo menos 12 días a temperaturas de alrededor de 9 °C para lograr la máxima elongación de los meristemos apicales (Trione y Metzger, 1970). Para centeno, aunque no es clara la duración necesaria del período de frío inductivo, las temperaturas óptimas estarían entre 1 y 7 °C (Hänsel, 1953). El trigo invernal requiere un mínimo de 3 a 4 semanas a 7 °C o menos para obtener la máxima eficacia de la vernalización (Trione y Metzger, 1970, Ahrens, 1957), aunque existe mucha variabilidad en los requerimientos de inducción primaria para esta especie

dependiendo del genotipo evaluado (Davidson et al., 1985, Ahrens y Loomis, 1963). De hecho, los requisitos de frío de inducción primaria son específicos del ecotipo dentro de la especie y diferentes ecotipos podrían tener diferentes requerimientos, como se ha visto en raigrás perenne (Aamlid et al., 2000), *Dactylis glomerata* L. (Heide, 1987) y *Poa annua* L. (Heide, 2001).

1.3.3.2. Requerimientos de vernalización en Tinopiro

Tinopiro ha mostrado adaptación a amplias zonas del norte de Europa y América del Norte con la clasificación climática de Köppen de *cold* (grupo D, temperatura media del mes más frío ≤ 0 °C) y algunas zonas categorizadas como templadas (grupo C, temperatura media del mes más frío entre 0 y 18 °C) (Peel et al., 2007). La definición de Köppen de las zonas templadas es muy amplia e incluye un grupo diverso de regiones del mundo, algunas de las cuales cumplen sistemáticamente los requisitos de vernalización de las gramíneas invernales (Heide, 1994), incluido el trigo invernal (Ahrens, 1957), mientras que otras no acumulan suficientes días de temperatura fría para satisfacer esos requisitos. El trigo invernal es producido principalmente entre las latitudes 35° y 55° (figura 2), es decir, en áreas del planeta donde las temperaturas mínimas del invierno son suficientes para cubrir los requerimientos de vernalización, pero no tan severas como para perjudicar el crecimiento de las plantas (Trethowan et al., 2005). Muchas regiones que contribuyen sustancialmente a la producción mundial de granos, entre las que se encuentra gran parte de Sudamérica, son regiones templadas bajo esta categorización; sin embargo, su oferta de frío invernal estaría por debajo de las demandas para florecer de varias especies de gramíneas (Heide, 1994).

Los requerimientos de frío para inducción primaria, así como la variabilidad genética dentro de la especie para este carácter, se desconocen en Tinopiro. DeHaan et al. (2018), trabajando con germoplasma adaptado a regiones frías de América del Norte, observaron que con 7 semanas a 7 °C y 16 h de fotoperíodo se evitó la floración en algunas plantas, pero 7 semanas a 4 °C y 10 h de fotoperíodo fueron condiciones suficientes para lograr la floración en la mayoría de ellas (L. DeHaan, comunicación personal, 2019). Aunque la información al respecto es muy escasa, Tinopiro, al igual

que muchas otras gramíneas templadas, parecería tener un control doble de estímulos (frío y día corto) a completar para la inducción primaria (Ivancic et al., 2021). Resultados de este último trabajo, demuestran que, aunque la floración es promovida por prolongadas exposiciones al frío en Tinopiro, 15 % de las plantas fueron capaces de florecer sin ninguna exposición a frío (Ivancic et al., 2021). Por lo tanto, estos resultados podrían sugerir la existencia de una importante diversidad para los requerimientos de vernalización en Tinopiro.

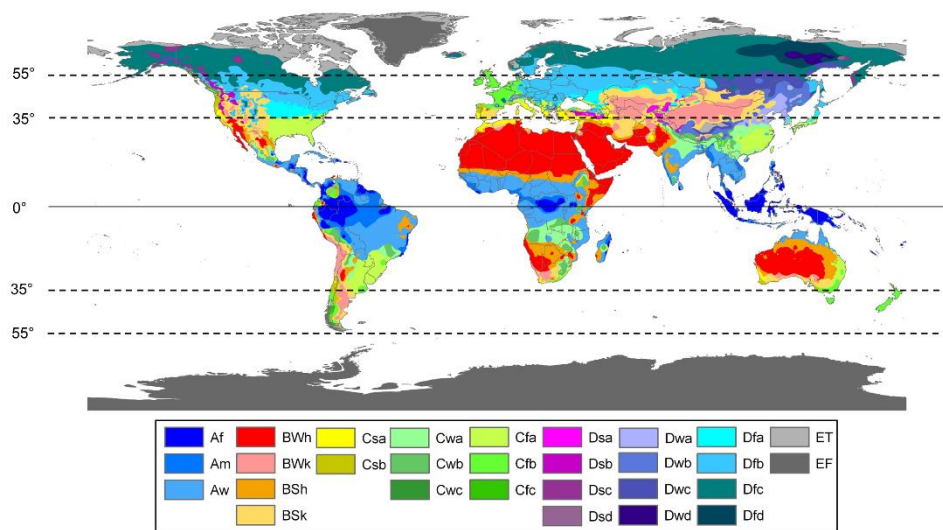


Figura 2. Mapa Köppen-Geiger de los tipos climáticos del mundo. Se resaltan entre líneas punteadas los paralelos donde el trigo invernal es producido. Peel et al. (2007) clasifica los tipos climáticos en diferentes climas tropicales (A), áridos (B), templados (C), fríos (D) y polares (E).

1.4. MEJORAMIENTO GENÉTICO EN TINOPIRO

1.4.1. Mejoramiento genético en gramíneas perennes

La mayoría de las gramíneas perennes como festuca alta, *Bromus inermis* Leyss, *Phalaris arundinacea* L., *Phleum pratense*, raigrás perenne y *Dactylis glomerata* L. son especies autoincompatibles, por lo que naturalmente presentan polinización abierta (Carnahan y Hill, 1961). Los métodos de selección de especies forrajeras

alógamas generalmente se han adaptado a partir de aquellos utilizados en maíz (*Zea mays* L.) (Nguyen y Sleper, 1983a). Sin embargo, debido a la estructura perfecta de la flor, la autoincompatibilidad, el hábito de crecimiento perenne y la poliploidía, gran parte de la metodología desarrollada para el maíz tiene una aplicación limitada en la selección de gramíneas forrajeras (Hill, 1977). La autoincompatibilidad favorece el entrecruzamiento, por lo que los esfuerzos de mejora genética generalmente en gramíneas con esta condición se dirigen básicamente a mejorar poblaciones heterogéneas y liberar tanto poblaciones segregantes como sintéticas (Majidi et al., 2009). En efecto, los principales caracteres de importancia económica en estas especies, como producción y calidad de forraje y producción de semilla, son caracteres de herencia cuantitativa, por lo que la selección recurrente ha sido el método más utilizado (Nguyen y Sleper, 1983a). Este tipo de mejora de poblaciones se basa, en gran medida, en la presencia de varianza genética aditiva, mientras que la utilización de varianzas genéticas no aditivas es poco común en ellas (Hill, 1977). Además, las estimaciones de varianza genética aditiva suelen ser mayores que otros componentes genéticos de la varianza y los caracteres agronómicos evaluados en gramíneas perennes no parecen ser una excepción (Bhandari et al., 2010, Ray y Harms, 1994, Barker y Kalton, 1989, Burton, 1989, Meyer y Funk, 1989, Vogel et al., 1989). La selección fenotípica recurrente, que utiliza únicamente el componente aditivo y un pequeño aporte de la interacción aditivo x aditivo de la varianza genética epistática, es común en el mejoramiento genético de especies forrajeras (Hallauer, 1981). Análisis de progenie como el apareamiento de medios hermanos, incluyendo policruzamiento (*policross*), *topcross* y polinización abierta son ampliamente utilizados como métodos convencionales de selección genotípica para la mejora de poblaciones en la mayoría de las especies forrajeras y también es utilizado para estimar parámetros genéticos en estudios de genética cuantitativa (Aastveit y Aastveit, 1990). De hecho, la estimación de la heredabilidad a partir de familias de medios hermanos proporciona una buena predicción de la heredabilidad en sentido estricto (h^2), ya que la varianza genética entre las familias de medios hermanos representa principalmente la varianza genética aditiva contenida en la varianza fenotípica (Kearsey y Pooni, 1996, Wricke y Weber, 1986). A partir de las estimaciones de heredabilidad podemos predecir la magnitud de la

respuesta que el proceso de mejoramiento tendrá sobre una determinada característica de interés a partir de la selección fenotípica (Falconer y Mackay, 1996).

1.4.2. Características genéticas generales de Tinopiro

Tinopiro es una de las especies en domesticación con mayor desarrollo para convertirse en un cultivo doble propósito perenne (DeHaan et al., 2018). Pertenece a la tribu de las tritíceas y a la subfamilia Pooideae y suele considerarse una especie con fecundación cruzada obligada y usualmente autoincompatible (Mahelka et al., 2011, Ros, 1963). Es una especie hexaploide ($2n = 6x = 42$; Dewey 1962), y se han identificado sistemáticamente tres juegos cromosómicos. Dos de ellos proceden de genomas J ancestrales de *Thinopyrum bessarabicum* (Savul. & Rayss) Á. Löve (genoma Jb) y *Thinopyrum elongatum* (Host) D. R. Dewey (genoma Je), mientras que se cree que el tercer genoma procede de especies del género *Pseudoroegneria* (genoma St; Wang et al., 2015). Más recientemente se confirmó que *T. intermedium* (Tinopiro) se comporta como un alohexaploide tras detectar 21 grupos de ligamiento, lo que sugiere que la herencia disómica sería el principal tipo de herencia en esta especie (Kantarski et al., 2017). Desde su introducción a EE. UU., muchos cultivares han sido liberados comercialmente (Jensen et al., 2016a, Vogel y Jensen, 2001) y se ha convertido en una de las gramíneas forrajeras mayormente sometida a selección por caracteres como producción y calidad de forraje (Jensen y Anderson, 2014). Debido a su moderada dehiscencia, a la facilidad del trillado de los granos, a su aceptable tamaño y al alto valor nutritivo de estos, sumado a su utilidad en productos panificados y bebidas, el grano de Tinopiro ha despertado gran interés hace ya más de 40 años (Wagoner y Schaeffer, 1990).

1.4.3. Desafíos para el progreso genético de Tinopiro como grano perenne

La selección directa de Tinopiro por tamaño de grano y su fertilidad comenzó en la década de 1980 por el Rodale Research Center (Kutztown, PA) con la participación del Big Flats Plant Materials Center (Corning, NY) (DeHaan et al., 2014). A principios

de este siglo, las mejores plantas seleccionadas pasaron a manos de científicos del Land Institute (Salina, KS), donde sus objetivos de selección pasaron a ser el aumento del rendimiento de grano por espiga y el tamaño del grano, la facilidad de trilla, la reducción de la altura de la planta y la madurez temprana (Zhang et al., 2016). Durante este proceso y tomando solo los primeros 5 ciclos de selección del programa del Land Institute, caracteres como peso de grano y su rendimiento han mostrado incrementos del 60 y 181 %, respectivamente (DeHaan et al., 2018). Si se toma en cuenta desde el ciclo 0 al 8 de ese programa, el rendimiento en grano se triplicó ($59 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$), el peso de grano aumentó un 75 % ($0,47 \text{ mg ciclo}^{-1}$ de peso de 1000 granos), el quebrado de grano se redujo 36 % y la presencia de semilla desnuda luego de la trilla se cuatuplicó (pasó de 12,5 % a 50 %) (Bajgain et al., 2022). Aunque los avances han sido constantes, la urgente necesidad de aumentar de forma sostenible la producción de alimentos a partir de cultivos perennes exige el desarrollo de métodos que aceleren el ritmo de domesticación. La implementación de la selección genómica a través de una reducción del intervalo entre ciclos de selección (Crain et al., 2021), así como la mutación inducida e identificación de regiones cromosómicas asociadas a genes de domesticación mediante la utilización de técnicas de TILLING y Eco TILLING (Barkley y Wang, 2008), son propuestas como herramientas clave para el mejoramiento acelerado de *T. intermedium* (DeHaan et al., 2020).

Como resultado del proceso de mejoramiento y de los esfuerzos de colaboración de distintas instituciones, Tinopiro se puso a disposición comercial de los agricultores en los EE. UU. bajo el nombre comercial Kernza™ (Lanker et al., 2019). La Universidad de Minnesota en el año 2020 lanzó MN-Clearwater como el primer cultivar de Kernza que produce grano aprobado para su venta como grano perenne de Kernza (Bajgain et al., 2020). A pesar de los beneficios ecosistémicos que ofrece Tinopiro y de la alta calidad del forraje y la producción demostrada, el bajo rendimiento en grano en comparación con los cereales anuales limita la viabilidad económica del cultivo, lo que, a su vez, crea una barrera para su adopción (Hunter et al., 2020a). Por lo tanto, centrarse en mejorar el rendimiento de grano es clave para el éxito del cultivo.

Aunque la capacidad de las gramíneas perennes para producir una cantidad razonable de semillas es esencial para su éxito comercial, este carácter ha recibido poca atención en los programas de mejoramiento. Para muchas de las especies comerciales, la producción de semilla satisface las demandas y, por lo tanto, sería innecesario adjudicar esfuerzos en mejorar dicho carácter (Vogel et al., 1989). Además, las heredabilidades de moderadas a bajas estimadas tanto para la producción de forraje como para el rendimiento de semillas, sumado a los diferentes manejos para promover algunos de estas variables, también podrían afectar el uso del rendimiento de semillas como criterio de selección en los programas de mejoramiento (Kalton et al., 1996, Bean, 1972). Por otro lado, mejorar el rendimiento de grano en este tipo de especies podría implicar un progreso lento, ya que la evaluación de caracteres se realiza generalmente en el segundo y/o tercer año, después del primer año de establecimiento, lo que implica que el ciclo de selección toma de 3 a 5 años dependiendo del sistema de mejoramiento empleado (Conaghan y Casler, 2011, Easton et al., 1994). En las regiones de alta latitud, las gramíneas templadas con requisitos de vernalización se establecen durante el otoño, previo al primer año de producción de semillas (verano), y la producción de inflorescencias depende del crecimiento vegetativo, es decir, del número y tamaño de los macollos antes del invierno (Boelt y Studer, 2010). Siembras tempranas en otoño en Kernza se asociaron con altos rendimientos de grano en el primer año, probablemente debido al mayor desarrollo morfológico de las plantas antes de que el suelo se congele, pudiendo vernalizar y producir grano (Jungers et al., 2022, Olugbenle et al., 2021) en el verano (figura 3), lo que sugiere el buen potencial de producción de grano en el primer año y la posibilidad de seleccionar para este u otros caracteres de interés en el primer año. No obstante, sería fiable utilizar el primer año de producción para la selección si la estimación de la interacción genotipo x año fuera despreciable y/o la selección indirecta para una variable medida en el primer año fuera eficaz en relación con la selección en el segundo año (Falconer y Mackay, 1996). La información sobre este tema es muy escasa, ya que, para la mayoría de las gramíneas perennes, el primer año (verano) no se utiliza para la recopilación de datos por considerarse un predictor poco fiable de la producción de semillas a largo plazo (DeHaan et al., 2018, Majidi et al.,

2017, Majidi et al., 2015). Sin embargo, en el ciclo 6 del programa de mejoramiento de Kernza del Land Institute (el único ciclo en el que se midieron varios caracteres durante el primer y el segundo año consecutivamente), las correlaciones genéticas entre el primer y el segundo año de varios caracteres relacionados con el rendimiento de grano fueron altas (DeHaan et al., 2018), aunque el manejo agronómico realizado fue netamente granífero, es decir, un solo corte de forraje luego de la cosecha de grano. Sería clave para el progreso genético del cultivo dilucidar si las evaluaciones del primer año podrían ser una forma eficiente de aumentar las ganancias genéticas por unidad de tiempo al disminuir el intervalo generacional.

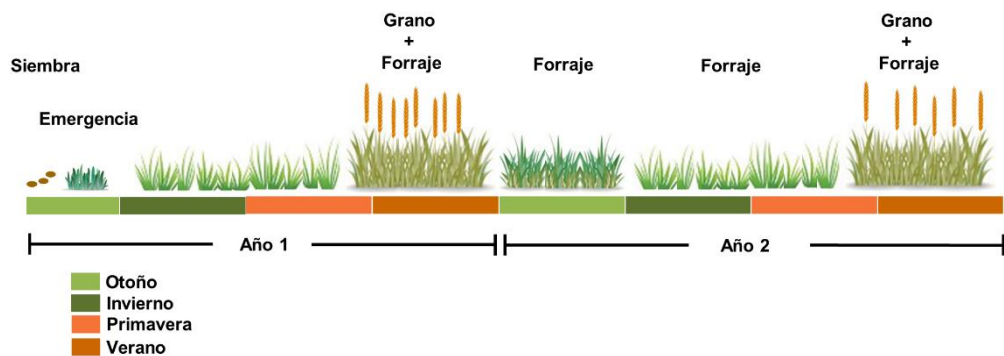


Figura 3. Diagrama del desarrollo de Tinopiro bajo siembra de otoño. Se muestra cronológicamente las posibles actividades de cosecha de grano y forraje para los primeros dos años de cultivo.

Es común que el objetivo en cualquier programa de mejoramiento sea lograr el progreso genético de varios caracteres al mismo tiempo, donde la presencia de diversidad genética, la magnitud y la dirección de las correlaciones genéticas entre esos caracteres son factores esenciales, ya que definirán las estrategias de mejora y los potenciales de ganancia genética. A menudo, la selección de un carácter secundario con el fin de obtener una respuesta positiva en un carácter de interés primario (es decir, selección indirecta) es necesaria para aumentar la eficiencia de la selección genética. El éxito de este enfoque dependerá principalmente de la correlación genética y la heredabilidad de los caracteres implicados, así como de cuestiones prácticas como el costo y tiempo necesario para medir el carácter primario a mejorar (Carena, 2008,

Searle, 1965). Rendimiento en grano, como otros caracteres de interés comercial, presentan medias a bajas heredabilidades y altas interacciones genotipo x ambiente, lo que hace muy difícil seleccionar genotipos de forma fiable, por lo que la inclusión de caracteres secundarios como criterios de selección podría ser clave (Bhatti et al., 1991, Comstock y Moll, 1963). De hecho, en regiones de altas latitudes, las características de la espiga como su fertilidad, el tamaño y el rendimiento de grano se han utilizado y/o propuesto como caracteres secundarios para la mejora del rendimiento de semilla tanto en *Kernza* (Bajgain et al., 2022, Knowles, 1977) como en otras gramíneas perennes (Armstead et al., 2008, Studer et al., 2008, Nguyen y Sleper, 1983b, Bugge, 1987, Bean, 1972, Griffiths et al., 1966). Por lo tanto, determinar los caracteres secundarios que puedan usarse como criterios de selección en una región de baja latitud y bajo un manejo del cultivo doble propósito aportaría información valiosa para el mejoramiento de la especie.

El interés por *Tinopiro* radica en presentar un grano apto para consumo humano y también ofrecer un forraje de alta calidad, por lo que no deberíamos perder de vista la interacción entre este tipo de caracteres durante el proceso de mejoramiento. El desafío de mejorar especies perennes con altos rendimientos de grano es grande debido a su menor proporción de asignación a órganos reproductivos (Smaje, 2015, González-Paleo y Ravetta, 2011, Silvertown y Dodd, 1996, Wagoner y Schaeffer, 1990). Una posible explicación podría ser que la mayoría de las plantas perennes producen pequeñas cantidades de semillas en relación con su crecimiento vegetativo no como un absoluto fisiológico infranqueable, sino más bien como resultado de la selección natural en un entorno estable y competitivo que favorece la longevidad como resultado del aumento de los órganos vegetativos de almacenamiento para competir mejor en esos hábitats (DeHaan et al., 2005). Este patrón de asignación de recursos es exitoso en entornos estables en los que tolerar el estrés es más ventajoso que recurrir a una vida corta y un gran esfuerzo reproductivo (Vico et al., 2016). En este escenario, la selección de genotipos con mayor asignación de recursos para grano y, por ende, la generación de aumentos en el índice de cosecha podría ser una vía posible incluso en entornos con menor competencia por los recursos, como son los ambientes agrícolas (DeHaan et al., 2005). De todas formas, este punto es controversial en gramíneas

perennes. Mientras que algunas investigaciones mostraron correlaciones negativas entre el rendimiento de semilla y el rendimiento de forraje en especies como *Poa Pratensis* y materiales de *Lolium sp* (Huff, 2010, Humphreys et al., 2010, Martiniello, 1998), otros, incluyendo a Tinopiro, mostraron una relación positiva o nula (Cattani y Asselin, 2018, Zhang et al., 2016, Sampoux et al., 2011, Thiele et al., 2009). No obstante, los experimentos que evaluaron esta relación en Tinopiro se llevaron a cabo con un manejo agronómico casi exclusivamente cerealista, es decir, una única cosecha de forraje en verano tras la cosecha de grano. Cosechar forraje puede tener un fuerte efecto sobre el rendimiento de grano en cultivos doble propósito, aunque este efecto puede ser tanto negativo como positivo (Richards, 1993). La dirección e intensidad del efecto dependerá de muchos factores, entre los que destacan: el manejo del pastoreo, el genotipo y las condiciones ambientales (Edwards et al., 2011). Al igual que ocurre con el rendimiento en grano, el índice de cosecha también se ve afectado por el pastoreo, muy probablemente a través de cambios en la partición de la materia seca durante la recuperación del cultivo dentro de la planta (Harrison et al., 2011). Para Kernza, también se ha demostrado lo importante que puede ser el manejo de la defoliación en el rendimiento de grano y forraje (Hunter et al., 2020a, Hunter et al., 2020b, Hopkins et al., 2003). Por lo tanto, debido al grado de domesticación de Tinopiro, tenemos la posibilidad histórica de focalizar el mejoramiento para aumentar tanto el rendimiento en grano como la producción de forraje, para lo cual conocer las relaciones entre biomas aérea y componentes reproductivos bajo un sistema doble propósito es esencial.

1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1.5.1. Objetivo general

Realizar la primera caracterización genética y fenotípica de Tinopiro-Kernza™ (*Thinopyrum intermedium*) como cultivo perenne doble propósito bajo condiciones templadas en una región de baja latitud.

1.5.2. Objetivos específicos e hipótesis

1) Explorar la capacidad de Tinopiro para florecer en regiones templadas a partir de la determinación de sus requerimientos de frío en inducción primaria.

1a) El comportamiento reproductivo de las poblaciones de Tinopiro aumentará con el número de semanas de vernalización hasta un máximo.

1b) Existe variabilidad entre las poblaciones de Tinopiro en cuanto a sus requerimientos de vernalización.

2) Evaluar el comportamiento agronómico en rendimiento en grano y forraje y su respuesta al nitrógeno de dos poblaciones de Tinopiro bajo un manejo doble propósito en una región templada de baja latitud.

2a) Germoplasma de Tinopiro seleccionado en un ambiente sin temperaturas vernalizantes producirá una progenie con mayores rendimientos de forraje y/o grano en latitudes bajas.

2b) La producción forrajera de Tinopiro y su valor nutritivo en latitudes bajas será similar al reportado en latitudes más altas. Por el contrario, el rendimiento en grano será menor en latitudes bajas.

2c) El rendimiento de grano y de forraje responderán al aumento de dosis de N.

2d) La biomasa de malezas no se incrementará con el tiempo bajo un sistema doble propósito de Tinopiro.

3) Comprender la arquitectura genética de los componentes del rendimiento de grano y forraje en Tinopiro bajo un manejo doble propósito.

3a) La interacción genotipo x año será significativa para la mayoría de los componentes de rendimiento en grano.

3b) La selección indirecta por alguno de los componentes de rendimiento en grano tendrá una mayor respuesta a la selección que la selección directa por rendimiento en grano por planta bajo un sistema de manejo doble propósito.

3c) Se detectarán compensaciones en Tinopiro entre producción de forraje y rendimiento en grano y sus componentes bajo un sistema doble propósito.

1.6. ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS

Esta tesis consiste en una introducción general (este capítulo), tres artículos científicos que constituyen la estructura central de la tesis y un capítulo final de discusión general y conclusiones globales.

El artículo titulado «Vernalization requirements of *Kernza intermediate wheatgrass*» (Requerimientos de vernalización de *Kernza intermediate wheatgrass*) fue publicado en la revista *Crop Science* [<https://doi.org/10.1002/csc2.20667>] y sus autores fueron Andrés Locatelli, Lucía Gutiérrez y Valentín Picasso. Los resultados obtenidos en este trabajo abordan el primer objetivo específico y constituyen el segundo capítulo de esta tesis. En este trabajo evaluamos para 8 poblaciones de Tinopiro los requerimientos de frío para inducción primaria, impuestos bajo cámaras decrecimiento. Además, evaluamos la variabilidad fenotípica presente para varios caracteres agronómicos en las poblaciones bajo estudio.

El artículo titulado «Agronomic assessment of two populations of intermediate wheatgrass - *Kernza*[®] (*Thinopyrum intermedium*) in temperate South America» (Evaluación agronómica de dos poblaciones de *intermediate wheatgrass* – *Kernza*[®] (*Thinopyrum intermedium*) in temperate South America), fue publicado en *Grassland Research* [<https://doi.org/10.1002/ghr2.12032>] y sus autores fueron Andrés Locatelli, Lucía Gutiérrez, Olivier Duchene, Pablo Speranza y Valentín Picasso. El objetivo de este trabajo fue evaluar en dos poblaciones de Tinopiro con supuestos diferentes

requerimientos de frío, el comportamiento productivo en términos de forraje y grano por primera vez en una región de baja latitud. Los resultados obtenidos en este trabajo se enmarcan en el segundo objetivo específico y corresponden al tercer capítulo de la tesis.

El tercer artículo, titulado «Trade-offs and genetic architecture of grain and forage yield component traits in KernzaTM intermediate wheatgrass», tiene por autores a Andrés Locatelli, Lucía Gutiérrez, Pablo Speranza y Valentín Picasso. Será enviado a la revista *Crop Science* a la brevedad. El objetivo de este trabajo fue comprender la arquitectura genética de los componentes del rendimiento de grano y forraje y detectar las compensaciones o *trade-offs* entre la asignación de recursos vegetativos y reproductivos en Tinopiro bajo un manejo doble propósito. En el marco de este trabajo se aborda el tercer objetivo específico y constituye el cuarto capítulo de la tesis.

Finalmente, en la discusión general y conclusiones se discuten los principales aprendizajes de esta tesis y las perspectivas para el futuro desarrollo de Tinopiro en la región.

2. VERNALIZATION REQUIREMENTS OF KERNZA INTERMEDIATE WHEATGRASS

Locatelli, A., Gutierrez, L., & Picasso Risso, V. D. (2022). *Crop Science*, 62(1), 524-535. <https://doi.org/10.1002/csc2.20667>

Running head: Kernza intermediate wheatgrass vernalization

Keywords: perennial grain, forages, adaptation, breeding, physiology, Triticeae

Abbreviations: TM, trade mark; KS, Kansas; MN, Minnesota; TLI, The Land Institute

2.1. ABSTRACT

Intermediate wheatgrass [*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth and D.R. Dewey] bred for high grain yield has become the first perennial grain in North America, and it is commercialized under the tradename Kernza™. The expansion of this crop from the US Midwest to areas with milder winters would require an understanding of its vernalization requirements for flowering and the availability of genetic diversity for this trait. The goal of this research was to determine the length of the cold period required for vernalization in Kernza intermediate wheatgrass. Two treatment factors (population and length of cold incubation period) were evaluated. Seeds from eight breeding populations from Kansas and Minnesota (USA) were evaluated in growth chambers at 5 °C and 10 h light for cold periods from 3 to 9 weeks. The percentage of plants that flowered increased from 30 to 96% as the length of the cold incubation period increased from 3 to 7 weeks, following a sigmoid model. For most yield components, no changes were observed after 7 weeks of cold incubation. There were no differences among populations for most traits and there was large within-population phenotypic diversity. These results confirm that Kernza intermediate wheatgrass populations have moderate vernalization requirements. Further research is needed to confirm the feasibility of breeding Kernza with lower vernalization requirements.

2.2. INTRODUCTION

Annual crops dominate global production of grain, occupying two-thirds of the arable land and they are associated with soil erosion, water contamination, high input use, and biodiversity loss (Tilman et al., 2001; Cox, Glover, Van Tassel, Cox & DeHaan, 2006). Perennial species can have more-developed root systems, provide continuous ground cover year-round, and use nutrients more efficiently than annual species (Glover et al., 2010). Although many species have shown potential for domestication as perennial grain crops, intermediate wheatgrass [*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth and D.R. Dewey], stands out because it has moderate shattering, and its grains are easy to thresh, have acceptable size, and have high nutritive values with the capacity to produce baked products or beverages (Wagoner y Schauer, 1990; Becker, Wagoner, Hamers & Saunders, 1991). Recently, intermediate wheatgrass became commercially available to farmers in the USA under the trade name Kernza™ (Lanker, Bell & Picasso, 2019). Its dual-use (grain and forage production) is a key factor for increasing productivity and profitability in this novel crop (Ryan et al., 2018; Pugliese, Culman & Sprunger, 2019). Kernza intermediate wheatgrass adapts well to a dual-use system since the harvesting of forage does not negatively impact the above- and belowground biomass productivity (Sakiroglu, Dong, Hall, Jungers & Picasso, 2020). Moreover, forage quality of Kernza intermediate wheatgrass in a dual-use system is suitable for lactating beef cows, dairy cows, and growing heifers (Favre, Munoz, Combs, Wattiaux & Picasso, 2019). Additionally, Kernza intermediate wheatgrass as a perennial crop with an extensive root system reduces nutrient leaching and increases water use efficiency and soil carbon content (Cox, Van Tassel, Cox, DeHaan & 2010; Glover et al., 2010; Culman, Snapp, Ollenburger, Basso & DeHaan, 2013). Although grain yields of Kernza intermediate wheatgrass have reached 1500 kg ha⁻¹ in experimental plots, they are usually still a small fraction of annual wheat (*Triticum aestivum* L.) grain yields (DeHaan, Wang, Larson, Kantarski, Zhang & Cattani, 2014). However, after five generations of recurrent selection, seed mass and grain yield increased by 60% and

181% respectively, showing the potential to achieve satisfactory performance in the medium term (DeHaan, Christians, Crain & Poland, 2018).

Like annual wheat, *T. intermedium* belongs to the Triticeae tribe in the Poaceae family and is a predominantly hexaploid ($2n = 6x = 42$) grass (Mahelka, Kopecky & Pastova, 2011). It can be crossed with wheat, and it is employed as an alien genetic resource for wheat improvement, mainly providing viral and fungal resistance genes (Sharma, Ohm, Goulart, Lister, Appels & Benlhabib, 1995; Friebe, Gill, Tuleenand & Gill, 1996; Li & Wang, 2009). The center of origin of *T. intermedium*, like many other members of the Triticeae tribe including wheat, is in south-central Europe and south-west Asia (Bor, 1970; Tzvelev, 1976). This species has shown adaptation to large areas of northern Europe and North America with Köppen's climate classification of "cold" (group D, mean temperature of the coldest month $\leq 0^{\circ}\text{C}$) and some "temperate" areas (group C, mean temperature of the coldest month between 0 and 18°C ; Peel, Finlayson & McMahon, 2007). Köppen's definition of temperate areas includes a diverse group of environments with some consistently meeting vernalization requirements of cool-season grasses (Heide, 1994) including winter wheat (Ahrens, 1957), while others do not accumulate enough days of cold temperature to meet those requirements. One of the main challenges for the expansion of this new crop to those temperate (group C) areas is its vernalization requirement for flowering (Ivancic, Locatelli, Tracy & Picasso, 2021). Most of the cool-season perennial grasses have a dual induction requirement for flowering: a primary induction requirement for low temperature and/or short days and a secondary induction requirement for long days (Chastain & Young, 1998). Recent studies indicate that *T. intermedium* might also have a dual floral induction pathway (Ivancic et al., 2021).

Cool-season perennial grasses differ in their cold and short-day requirements for primary induction for flowering (Heide, 1994). For instance, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) requires 9 to 12 weeks at 8 h photoperiod and 6°C to achieve maximum heading percentage and daylength and temperature were both important drivers of primary induction (Aamlid, Heide & Boelt, 2000). Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) requires 10 weeks of exposure to 9 to 12°C and 8 h photoperiod to achieve full primary induction for flowering, depending on the germplasm (Heide,

1987). On the other hand, winter wheat requires a minimum of 3 to 4 weeks at 7 °C or below to obtain maximum effectiveness of vernalization (Ahrens, 1957; Trione & Metzger, 1970), although there is much variability in the induction requirements for this species depending on the specific genotype involved (Ahrens & Loomis, 1963; Davidson, Christian, Jones & Bremner, 1985). Indeed, the primary induction cold requirements are ecotype-specific within species and different ecotypes might have different requirements as seen in perennial ryegrass (Aamlid et al., 2000), annual bluegrass (*Poa annua* L., Heide, 2001), and among winter wheat or barley ecotypes (*Hordeum vulgare* L.; Chouard, 1960; Flood & Halloran, 1984; Sung & Amasino, 2005). The primary requirement levels of cold and its genetic variability remain unknown for *T. intermedium*. DeHaan et al. (2018) working on germplasm adapted to northern North America found that 7 weeks at 7° C and 16 h photoperiod prevented flowering in some plants, but 7 weeks at 4° C and 10 h photoperiod was enough to achieve flowering in almost every plant (L. DeHaan, personal communication, 26 July 2019). Furthermore, Ivancic et al. (2021) found that although heading was promoted by longer cold exposure, 15% of plants were able to flower without cold exposure. This seems to indicate large diversity for vernalization requirements.

The aim of this research was to explore the ability of Kernza intermediate wheatgrass to flower in temperate regions with milder winters by determining cold requirements for primary induction. Our hypotheses were that: 1) reproductive performance of Kernza intermediate wheatgrass populations would increase with the number of weeks of vernalization up to a maximum and 2) there would be variability between Kernza intermediate wheatgrass populations in terms of their vernalization requirements.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Plant populations

Seeds from eight different Kernza intermediate wheatgrass breeding populations were used for this experiment. Populations TLIC4MN and TLIC4WI from The Land

Institute (Salina, KS, USA) were selected for grain yield per head, seed size, free threshing, height, and early maturity (Zhang et al., 2016; DeHaan et al., 2018) during four cycles in Kansas, and one year of production in either Becker, Minnesota (TLIC4MN) or Arlington, Wisconsin (TLIC4WI). Population TLIC5KS represents a fifth year of selection at The Land Institute breeding program with seed produced in Salina, Kansas. Populations MN1501, MN1502, MN1503, MN1504 and MN1505 are synthetic variety candidates whose parents were selected from the first cycle of the University of Minnesota breeding program (TLIC4MN) and all of them were derived from the second intercross (Synthetic 2) in Becker, Minnesota. MN1504 was the experimental designation of “MN-Clearwater”, which was released by the University of Minnesota and is the first Kernza intermediate wheatgrass cultivar that produces grain approved for sale as Kernza perennial grain (Bajgain et al., 2020).

2.3.2. Greenhouse conditions

The experiment was carried out in the University of Wisconsin – Madison Walnut Street Greenhouses. Plants were grown in cone-tube containers (25.4 mm diameter and 200 mm deep) in standard potting mix (85 % peat, 15 % clay) and fertilized two or three times per week with a complete nutrient solution. Three seeds from the same population were sown in each cone-tube at a depth of less than 1 cm, and thinned to a single plant after seedling emergence. Seedlings were grown in the greenhouse at 25 °C and 16 h light (8 h winter daylight plus 8 h low-intensity incandescent light) until plants reached the three-leaf stage, approximately one month later. Plants assigned to the control group without cold treatment (0 weeks of incubation) were kept in the greenhouse (at 25 °C and 16 h light) and were analyzed separately than incubated plants.

2.3.3. Cold incubation (vernalization) treatment

Plants at the three-leaf stage were moved to growth chambers with photosynthetic photon flux density of 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to start the vernalization

treatments. Plants were kept at 5 °C on average (between 4.1 and 5.1 °C with an average hourly temperature of 4.5 °C in chamber 1, and between 4.9 and 6.2 °C with an average hourly temperature of 5.2 in chamber 2; Supplemental Table S1) and 10 h light. A 10 h light photoperiod was chosen based on results from Ivancic et al. (2021).

2.3.4. Experimental design

The treatment design was a complete factorial with two factors: population (eight Kernza intermediate wheatgrass breeding populations) and length of cold incubation period (seven lengths: 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9 weeks) for a total of 56 treatments (combinations of population and length). The experimental design was a generalized randomized complete block design with two growth chambers as blocks. The experimental unit was each individual plant. Due to different availability of seeds, the populations TLIC4MN, TLIC4WI, and TLIC5KS had six experimental units (plants) for each length of incubation per block (12 replications per treatment), while populations MN1501, MN1502, MN1503, MN1504, and MN1505 had one experimental unit (plant) for each length of incubation per block (2 replications per treatment). Therefore, we used an unbalanced (i.e., different number of replications per treatment) generalized randomized complete blocks design. The large number of experimental units within blocks for some populations increases power in our analysis, overcoming any potential issues arising from unbalanced designs (González-Barrios, Diaz-García & Gutiérrez, 2019). Plants of each breeding population were randomly assigned to the different lengths of cold incubation period treatments before being moved to the growth chambers and labeled accordingly. Plants were placed in each growth chamber in random order, and they were removed once every week based on their individual labels. At the time of being removed from the growth chamber each plant was transplanted from cone-tube containers to plastic pots (150 mm diameter and 200 mm depth) and kept at 25 °C and 16 h light in the greenhouse. Plants were monitored three times a week to check for development, and at floral initiation, fans were added to the greenhouse and plants were moved weekly to promote pollination among plants. We also maintained as control 2 to 12 plants from each population in

the greenhouse for the entire experimental period, without any cold incubation, and these plants were analyzed independently. A total of 368 plants were evaluated in the experiment.

2.3.5. Phenotyping

The following traits were evaluated for each plant: plant heading, heading time, plant height, spikes per plant, spikelets per spike, spikelets per plant, spike weight per plant, weight per spike, weight per spikelet, and aboveground biomass dry weight per plant. Plant heading was monitored three times a week and was recorded when the first spike emerged from the flag leaf sheaf (stage R1, according to Moore et al., 1991). Plant heading was expressed as the percentage of plants that produced at least one head for a treatment. Heading time was calculated in growing degree days (GDD) from emergence to heading date for each plant, using 0 °C as base temperature as described by Jungers et al. (2018).

All plants were harvested at the same time after grain maturity, approximately 8 months after the experiment was started, and the following traits were measured at harvest. Plant height was measured from soil surface to the tip of the tallest spike. After harvest, plants were cut 2 cm above ground level and samples were placed in a forced-air dryer at 65 °C for 48 h, and then weighed to evaluate aboveground biomass dry weight. For estimating spikelets per spike, the mean of the number of spikelets per spike from three spikes was estimated for each plant. Spikelets per plant were calculated as the product of spikelets per spike and spikes per plant. Weight per spike was estimated as the ratio of spike weight per plant and number of spikes per plant. Weight per spikelet was estimated as the ratio of the weight per spike and the number of spikelets per spike. Except for plant heading and aboveground biomass, all other variables were only measured in the plants that flowered. However, we reported results of some reproductive traits as a ratio of the mean number of plants that flowered and the mean number of total plants. In this manuscript we use plant heading as a proxy for flowering to indicate a successful fulfillment of vernalization requirements.

2.3.6. Statistical analysis

An analysis of deviance was carried out on plant heading using the GLIMMIX procedure in SAS 9.4 (SAS Institute, 2004) with a binomial link because plant heading is a presence/absence trait. An analysis of variance (ANOVA) using the MIXED procedure in SAS 9.4 was used to analyze all other traits. The linear mixed model used was:

$$y_{ijk} = \mu + P_i + V_j + PV_{ij} + \beta_k + \varepsilon_{ijk} \quad [1]$$

where y_{ijk} is the response variable, μ is the overall mean, P_i is the effect of the i th breeding population (fixed effect), V_j is the effect of the j th cold incubation period length (fixed effect), PV_{ij} is the interaction between breeding population and vernalization length effect (fixed effect), β_k is the effect of the k th block (i.e. chamber, random effect), ε_{ijk} is the residual error (random effect), with $\beta_k \sim N(0, \sigma_b^2)$, $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$, and the covariance between β_k and ε_{ijk} zero. Contrasts were estimated for groups of breeding populations based on their breeding program group (Kansas vs Minnesota) using model [1].

Several regression models were compared for all traits using weeks of incubation (w_i) as the predictor variable in R statistical software (R Core Team, 2020). The models with the lowest AIC (Akaike information criterion) value and smallest RMSEP (root mean squared error of prediction) were selected for each trait. The linear and quadratic equations were fitted with the *lm* function of the R statistical software (R Core Team, 2020). The linear-plateau function was fitted with the *nlsfit* function of the *easynls* package (Arnhold, 2017). The logistic function was fitted with the *glm* package from MASS (Venables & Ripley, 2002). The asymptotic exponential function was fitted with the *nls* function of the *nlstools* package (Baty, Ritz, Charles, Brutsche, Flandrois & Delignette-Muller, 2015). The control treatment was not included in the previous analyses because experimental units of the control were not allocated to any block (growth chamber). We report means and standard errors of the control treatments, as well as statistical comparisons of population means between control treatments. The purpose of the control treatment was to have a reference of the traits

measured without any exposure to cold and therefore, demonstrate the need for cold requirements of the germplasm used.

2.4. RESULTS

2.4.1. Effect of length of incubation on growth and reproductive performance

There was no interaction between population and length of incubation period for any trait evaluated (F-test; $\alpha = 0.05$). The length of the cold incubation period affected plant heading, heading time, plant height, and aboveground biomass (Figure 1). Plant heading percentage increased from 30 to 96% in response to the length of the cold incubation period from 3 to 7 weeks (Figure 1a). After 7 weeks of cold incubation, plant heading percentage plateaued close to 95%. The sigmoid model (i.e. binary logistic model) provided the best model fit based on AIC (Table 1) and RMSEP values (data not shown). Control plants which were kept in the greenhouse throughout the experiment achieved only 25% of plant heading (Figure 1a). Heading time of plants that flowered was best fit by a linear-plateau model remaining relatively constant around the minimum of 2300 GDD except for the control plants and plants with only three weeks of incubation, which required about 3800 and 3600 GDD to reach plant heading respectively (Figure 1b; Table 1). Plant height of flowering plants was best fit by a 2-parameter asymptotic exponential model, increasing with the duration of the cold induction period and reaching a maximum at 7 weeks (Figure 1c; Table 1). Aboveground biomass (of all plants) declined linearly with the length of the cold period (Figure 1d; Table 1).

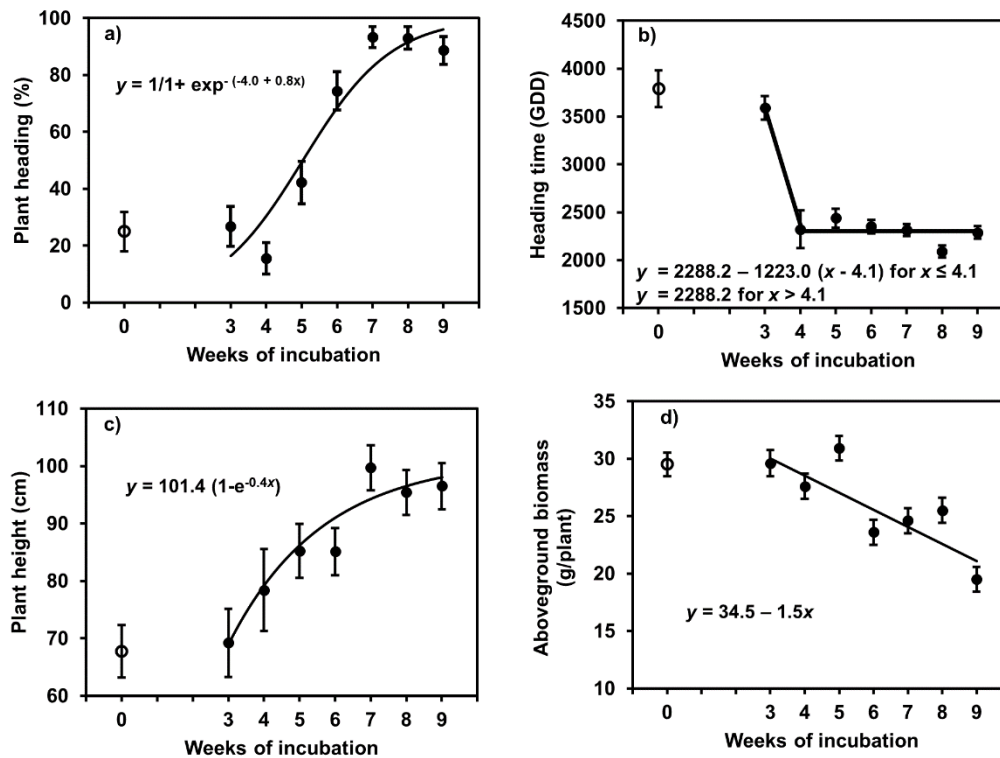


Figure 1. Effect of the length of the cold incubation period at 5 °C and 10 h light on (a) plant heading percentage, (b) heading time (of plants that headed), (c) plant height (of plants that headed), and (d) aboveground biomass (of all plants) across breeding populations of Kernza intermediate wheatgrass. Means \pm SE in each week of incubation (closed circles) are shown. Regression equations are shown. Control treatment (open circles) was not included in the regression models.

Table 1. Equations and functions evaluated for each trait in response to weeks of incubation (x) from three to nine weeks. Best fit model for each trait based on the Akaike information criterion (AIC) are highlighted in bold. P-values for each model parameter are shown. Functions evaluated include the linear, quadratic, linear-plateau, binary logistic, logistic, and the following asymptotic models: Michaelis-Menten (MM), and a 2- (2PE) and 3-parameter (3PE) exponential. Except for plant heading and aboveground biomass, all other variables were only measured in the plants that flowered.

Trait	Equation	Function	AIC	P-value of parameters		
				a	b	c
Plant heading (%)	$y = 1/[1 + \exp^{-(4.02 + 0.8x)}]$	Binary logistic	294.2	< 0.001	< 0.001	
	$y = -0.73 + 0.33x - 0.02x^2$	Quadratic	304.5	< 0.01	< 0.001	< 0.05
	$y = -0.23 + 0.14wi$	Linear	308.3	< 0.01	< 0.001	
Heading time (GDD)	$y = 2288.2 - 1223.0(x - 4.1)$ for $x \leq 4.1$	Linear-plateau	2672.3	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	$y = 2288.2$ for $x > 4.1$					
	$y = -1821.3 [x / (1 - 1.4x)]$	Asymptotic (MM)	2674.9	< 0.001	< 0.001	
Plant height (cm)	$y = 5438.5 - 850.3x + 55.7x^2$	Quadratic	2679.6	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	$y = 101.4(1 - e^{-0.4x})$	Asymptotic (2PE)	1618.5	< 0.001	< 0.001	
	$y = 56.1x / [1 + 0.5x]$	Asymptotic (MM)	1618.7	< 0.001	< 0.001	
Aboveground biomass (g/plant)	$y = 103.6 - 85.0e^{-0.3x}$	Asymptotic (3PE)	1620.3	< 0.001	< 0.05	0.09
	$y = 34.5 - 1.5x$	Linear	2087.0	< 0.001	< 0.001	
	$y = 28.9 + 0.6x - 0.2x^2$	Quadratic	2087.0	< 0.001	0.68	0.15
Spikes per plant	$y = -9.9 + 7.3x - 0.5x^2$	Quadratic	1315.4	0.19	< 0.01	< 0.001
	$y = 15.3 + 154.0e^{-1.0x}$	Asymptotic (3PE)	1317.4	< 0.001	0.7	0.2
	$y = 16.5(1 - e^{-0.3x})$	Asymptotic (2PE)	1317.7	< 0.001	< 0.05	
Spikelets per spike	$y = 14.6 - 0.6(x - 7.0)$ for $x \leq 7.0$	Linear-plateau	894.1	< 0.001	< 0.01	< 0.001
	$y = 14.6$ for $x > 7.0$					
	$y = 17.2 - 0.3x$	Linear	895.4	< 0.001	< 0.01	
Spikelets per plant	$y = 20.7 - 1.3x + 0.08x^2$	Quadratic	895.7	< 0.001	0.09	0.19
	$y = -88.7 + 91.8x - 6.6x^2$	Quadratic	2337.1	0.44	< 0.05	< 0.05
	$y = 230.7(1 - e^{-0.4x})$	Asymptotic (2PE)	2338.2	< 0.001	< 0.05	
Spike weight per plant (g)	$y = 198.1 / [1 + 1.6e^{-(0.7x)}]$	Logistic	2338.7	< 0.001	< 0.001	0.31
	$y = -4.0 + 2.3x - 0.2x^2$	Quadratic	874.1	0.06	< 0.001	< 0.01
	$y = 1.7 + 0.4x$	Linear	876.0	< 0.05	< 0.001	

	$y = 4.9 + 14.5e^{-0.5x}$	Asymptotic (3PE)	876.8	< 0.001	0.26	0.09
Weight per spike (g)	$y = 0.2x / (1 + 0.5x)$	Asymptotic (MM)	-247.4	< 0.05	0.1	
	$y = 0.23 + 0.01x$	Linear	-247.3	< 0.001	0.02	
	$y = 0.3 (1 - e^{-0.4x})$	Asymptotic (2PE)	-247.0	< 0.001	< 0.01	
Weight per spikelet (g)	$y = 0.02 + 0.0008x$	Linear	-1318.5	< 0.001	< 0.01	
	$y = 1.7e-02 + 2.5e-05x + 7.3e-05x^2$	Quadratic	-1317.1	< 0.001	0.9	0.4
	$y = 0.01 [x / (1 + 0.3x)]$	Asymptotic (MM)	-1279.8	< 0.05	0.08	

The length of the induction period affected most grain yield components (Figure 2). The number of spikes for plants that achieved flowering was best fit by a quadratic model which reached its maximum at 7 weeks of cold incubation period (Figure 2a; Table 1). The number of spikelets per spike was best fit by a linear-plateau model (Table 1) showing a declining trend until 7 weeks and then remaining constant (Figure 2b). The total number of spikelets per plant was best modeled with a quadratic function that reached a maximum at 7 weeks (Figure 2c; Table 1). Spike weight per plant was best modeled with a quadratic function that reached a maximum at 7 weeks (Figure 2d; Table 1). Weight per spike increased up to 7 weeks after which there was no response, therefore, the asymptotic Michaelis-Menten model was the model with the best fit (Figure 2e; Table 1). The linear model was similar in fit (Table 1). Weight per spikelet was best explained by a positive linear model (Figure 2f; Table 1).

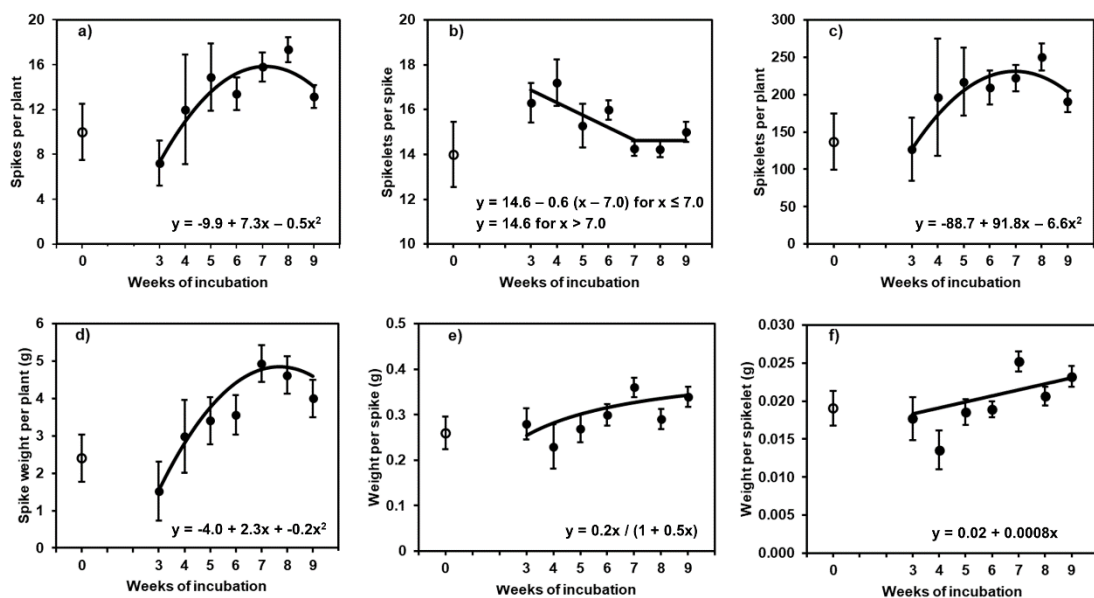


Figure 2. Effect of length of cold incubation period at 5 °C and 10 h light on grain yield components of plants that headed (a) spikes per plant, (b) spikelets per spike, (c) spikelets per plant, (d) spike weight per plant, (e) weight per spike and (f) weight per spikelet across breeding populations of Kernza intermediate wheatgrass. Means \pm SE in each week of incubation (closed circles) are shown. See text for regression equations

and P-values. Control treatment (open circles) was not included in the regression models.

2.4.2. Between and within population variability

There were significant differences among breeding populations for aboveground biomass, spikes per plant, and spikelets per plant (evaluated by counting all plants, not only the flowering plants), with MN1502 as the breeding population with the highest and MN1505 the one with the lowest values for these traits (Table 2). No differences were observed among populations for the other traits. Indeed, no differences were observed for the reproductive variables measured only on the plants that flowered (data not shown). The Minnesota group (MN1501 to MN1505) had higher values than the Kansas group (TLIC5KS, TLIC4MN, TLIC4WI) for plant heading percentage, spikes per plant, spikelets per plant, spikelets per spike, spike weight per plant, weight per spike, and weight per spikelet for all the control plants. The Minnesota group had higher values of heading time than the Kansas group for the control plants that flowered (Table 3). However, no differences between the Kansas and the Minnesota groups were observed for most variables with any cold incubation period (Table 3). On the other hand, there was a large phenotypic variability within populations for all traits evaluated (Supplemental Figure S1). For the populations with larger number of plants (TLIC4MN, TLIC4WI, TLIC5KS) the dispersion of the Kernel density plots for all quantitative traits was very large (Información complementaria: Tabla S1, Anexos correspondientes al artículo 1).

Table 2. Means and standard errors for each Kernza intermediate wheatgrass population across lengths of cold incubation periods for plant heading percentage, spikes per plant, spikelets per spike, spikelets per plant, spike weight per plant, and aboveground biomass (expressed for all plants). P-values for breeding population comparison are shown. Means within column followed by a common letter are not significantly different by the Tukey-Kramer test at the 5% level of significance.

Population	n	Plant heading (%)	Spikes per plant	Spikelets per spike	Spikelets per plant	Spike weight per plant (g)	Aboveground biomass (g/plant)
TLIC5KS	84	65±10	9.1±1.5 ab	8.7±0.9	132±20 b	2.8±0.4	26.1±0.7 b
TLIC4MN	81	72±9	8.8±1.5 b	9.4±0.9	129±20 b	2.4±0.4	25.2±0.8 bc
TLIC4WI	65	58±11	7.9±1.6 b	7.9±0.9	115±21 b	2.5±0.4	24.4±0.9 bc
MN1501	15	54±19	7.0±2.4 b	6.0±1.7	85±33 b	1.9±0.7	27.6±1.8 ab
MN1502	15	97±4	15.8±2.4 a	12.2±1.7	209±34 a	4.2±0.7	29.9±1.8 a
MN1503	15	69±16	6.9±2.4 b	7.9±1.6	89±32 b	2.3±0.7	25.3±1.8 abc
MN1504	15	86±10	9.2±2.4 b	10.5±1.7	108±34 b	2.7±0.7	28.0±1.8 ab
MN1505	16	72±17	6.6±2.3 b	9.5±1.6	88±32 b	2.4±0.7	20.9±1.7 c
P-value		0.19	0.03	0.15	0.04	0.13	0.01

Table 3. Means and standard errors of breeding population group for plants with either 0 (control) or 7 weeks of cold incubation period on plant heading, spikes per plant, spikelets per plant, spikelets per spike, spike weight per plant, weight per spike, weight per spikelet, aboveground biomass for all plants and plant height and heading time for plants that flowered. Means within column-groups followed by a common letter are not significantly different by the F-test at the 5% level of significance.

Group	All plants									Plants that flowered		
	n	Plant heading (%)	Spikes per plant	Spikelets per plant	Spikelets per spike	Spike weight per plant (g)	Weight per spike (mg)	Weight per spikelet (mg)	Aboveground biomass (g/plant)	n	Plant height (cm)	Heading time (GDD)
Control												
Kansas	32	16±6 b	1.2±0.6 b	9±6 b	1.2±0.7 b	0.2±0.1 b	40±20 b	2.3±1.2 b	29.1±1.2	5	59±5	3800±100 a
Minnesota	8	63±17 a	7.4±3.1 a	104±45 a	9.4±3.0 a	2.0±0.9 a	200±70 a	12.5±4.1 a	31.2±1.4	5	76±6	2900±0 b
7 weeks												
Kansas	34	95±5	15.5±1.5	217±22	13.3±1.2	5.0±0.7	334±42	23.8±2.2	23.9±1.4	32	103±3	2300±100
Minnesota	13	78±16	10.5±2.5	150±35	11.1±1.6	3.9±1.0	292±56	20.0±3.4	20.7±2.2	10	92±5	2300±100

2.5. DISCUSSION

2.5.1. Primary induction requirements for flowering

Our first hypothesis was confirmed: the reproductive performance of *Kernza* intermediate wheatgrass increased with the number of weeks of vernalization up to a maximum of 7 weeks. These results demonstrate the strong dependence of plant heading percentage on the exposure time to cold under short-days and also the moderate (i.e., non-extreme) primary induction requirements for flowering of *Kernza* intermediate wheatgrass. Other perennial grasses require longer periods of exposure to cold temperatures for flowering induction. For instance, Scandinavian meadow fescue (*Festuca pratensis* L.) cultivars showed a logistic response of heading plants percentage to incubation time at 10 h photoperiod and 6 °C, but they required 16 to 20 weeks of cold incubation for full flowering (Heide, 1988). Similarly, red fescue (*Festuca rubra* L.) populations required 15 to 18 weeks at 6 °C and 8 h photoperiod to be fully induced (Heide, 1990). Reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) required 12 to 14 weeks to reach full flowering at 6 °C and 8 h photoperiod (Heichel, Hovin & Henjum, 1980). Because the secondary induction conditions cited in the literature are very similar to those experienced by the plants in our experiment (i.e., high temperature and long-days), we can claim that primary induction requirements of *T. intermedium* are lower than those from these species. Also, a logistic relationship between flowering and weeks of incubation was reported for some perennial ryegrass varieties at 6 °C and 8 h photoperiod, and full induction requirements were fulfilled between 6 to 12 weeks of incubation, depending on the genotypes (Aamlid et al., 2000). Those genotypes with the least exposure time requirements to reach full induction within this species seem to have very similar primary induction requirements to *T. intermedium*. On the other hand, germplasm with possible minor primary induction requirements might be found in species such as supina bluegrass (*Poa supine* Schrad.) (Heide, 2001) and *Dactylis glomerata* (Heide, 1987).

Time to heading dropped sharply from 3 to 4 weeks of incubation (Figure 1b) in our study. After 4 weeks of incubation, plants were able to flower with the

accumulation of 2200 GDD, similarly to what was reported by Frahm (2017) in field experiments of *T. intermedium*. There was high variability between plants for time to heading (Figure 1b) at 4 and 5 weeks of cold incubation, and this plant-to-plant variability was reduced as the length of cold incubation increased, being minimum from 7 to 9 weeks (Figure 1b). This behavior was also observed with several accessions of purple false brome (*Brachypodium distachyon* L.) by Schwartz et al. (2010), where vernalization led to a decrease in the variation between accessions, and a decrease in the numbers of days required to flower for most of the accessions.

We used a ten-hour light photoperiod during the cold incubation phase in our study. This makes our results relevant for some of the temperate regions between 30 and 40 degrees of latitude that have winter months with 10.3 h and 9.5 h daylight respectively (<https://gml.noaa.gov/grad/solcalc/sunrise.html>).

2.5.2. Impact of length of incubation on reproductive traits

Plant height increased with the length of incubation period up to 7 weeks (Figure 1c). Our plants in the greenhouse were shorter than plants grown in field experiments (Jungers et al., 2018; Zimbric, Stoltenberg & Picasso, 2020). Plants at 7 weeks had the largest number of spikes per plant and spikelets per plant (Figure 2a, c). We found a positive linear correlation between plant height and spikes per plant ($r = 0.51$, $\alpha = 0.05$) using data from 3 to 7 weeks of cold incubation. This positive linear relationship between plant height and spikes per plant is often found in normal-tillered cereals such as wheat and barley (Richards, 1988). Meadow fescue (*Festuca pratensis* L.) also showed a positive linear relationship between plant height, panicles per plant, and length of the cold incubation period (Heide, 1988). A few weeks of exposure to cold provided low levels of vernalization and few spikes per plant as if the vernalization stimuli were only received by a few tillers, and these stimuli could not be transferred to other (later-formed) tillers of the plant (Evans, 1964). The positive relationship between length of cold incubation period and spikes per plant may be explained by the positive association between length of the exposure period to cold and rate of expansion of leaves (Stapleton & Jones, 1987), and the further positive association

between number of leaves and tillers per plant (Robson, Ryle & Woledge, 1988). In our study we did not measure tillers per plant directly, but the number of spikes per plant, which is highly associated to tillers per plant ranged between 8 and 18 (Figure 2a).

Aboveground biomass per plant decreased following 3 weeks of cold incubation until 9 weeks, which might be explained by the lower accumulation of growing degree days due to plants being incubated for a longer period at lower temperatures in growth chambers, and therefore, shorter time to warmer greenhouse conditions. The decrease in aboveground biomass might have directly affected the number of reproductive structures, which explained the decrease in spikes per plant, spikelets per plant and spike weight per plant from 7 to 9 weeks of incubation (Figure 2a, c, d). Previous studies suggest that about 50 % of the tillers die out due to competition for assimilates between stem elongation and flowering (Colvill & Marshall, 1984). Therefore, a reduction in the source could be the cause of the decrease in grain yield components.

The number of spikelets per spike decreased from 3 to 7 weeks of cold incubation while spikes and spikelets per plant increased. This suggests that spikelets per spike behave as a buffering trait compensating for available resources for other reproductive structures (Figure 2b). Weight per spike and weight per spikelet increased until 7 weeks of cold incubation (Figure 2e, f). The negative relationship between number of spikelets per spike and weight per spike noted in the range from 3 to 7 weeks of incubation also was reported for some wheat cultivars (Pinthus & Millet, 1978). A reduction of the number of spikelets from initiation to terminal spikelet differentiation would be expected with longer cold incubation periods because if the apex becomes competent to flower earlier, fewer potential spikelet sites are established, and spikelet number decreases (Rawson, 1970).

According to these results *T. intermedium* is a species with moderate vernalization requirements which could potentially be expanded from cold regions to many temperate regions of the world. Furthermore, in regions where the accumulation of cold equivalent to 7 weeks at 5 °C throughout their winters is not met, reproduction may still be induced by short days (Duchene et al., 2021; Ivancic et al., 2021). Therefore, in many temperate regions the accumulation of short days could substitute

for the lesser accumulation of cold hours. A high percentage of flowering was observed for the same germplasm in temperate regions of the southern cone of South America (unpublished data, 2021).

2.5.3. Variability of induction requirements to flowering

No differences for vernalization requirements were detected among Kernza intermediate wheatgrass populations, hence our second hypothesis was rejected. The fact that population effects were not significant for most traits is not surprising since they only differ by one cycle of selection and many traits evaluated in this study were not targets of selection during that cycle. A clear example of this point is plant heading percentage, a trait closely associated with vernalization requirements in *T. intermedium* that has not been used as a selection goal either directly or indirectly because all populations have been bred in northern North America where its requirements of vernalization are fully covered, masking any potential genetic variability. However, when the entire plant set was analyzed (flowering plants and non-flowering plants), yield components such as spikes per plant and spikelets per plant showed significant differences among populations, with MN1502 having the highest values (Table 2). The Minnesota plants in the control (non-vernalization) treatment flowered earlier and had more plants heading than the Kansas plants. This could be the result of the selection for earliness conducted by the Minnesota breeding program (Bajgain et al., 2020). This could suggest that early flowering may be associated with lower vernalization requirements. On the other hand, the large phenotypic diversity within breeding populations (Supplemental Figure S1) may indicate a strong potential for large genetic variation in vernalization requirement, and that individual plant genotypes might carry beneficial alleles for low vernalization requirements. Furthermore, the phenotypic diversity within populations decreases with longer cold exposures, when vernalization requirements are met, hinting at a possible genetic control of this trait because the residual error variance would be expected to remain constant over time. This is consistent with the fact that for species with self-

incompatibility as *T. intermedium* within-population genetic variation is usually higher than among-population variation (Saha, 2014).

2.6. CONCLUSION

The reproductive performance of Kernza intermediate wheatgrass increased with the duration of cold exposure up to seven weeks. With respect to the demand for stimuli to satisfy primary induction, Kernza intermediate wheatgrass might be classified as a species with moderate requirements. The large within-breeding population phenotypic variation for vernalization observed suggests that there could be also large genetic variability for this trait. Further research is needed to confirm the feasibility of breeding Kernza intermediate wheatgrass with lower vernalization requirements.

2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Kernza intermediate wheatgrass breeders Lee DeHaan from The Land Institute and Jim Anderson from University of Minnesota for sharing the seeds from the populations included in this study. This research was funded by competitive grants from CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica, UDELAR, Uruguay) to A.L., full-time funds (DT, UDELAR, Uruguay) granted to A.L., The Land Institute gift funds to V.P., and University of Wisconsin-Madison funds to V.P.

2.8. REFERENCES

- Aamlid, T.S., Heide, O.M., & Boelt, B. (2000). Primary and secondary induction requirements for flowering of contrasting European varieties of *Lolium perenne*. *Annals of Botany*, 86, 1087- 1095.
- Ahrens, J.F. (1957). Vernalization and photoperiodism of winter wheat. PhD Dissertation. Retrospective Theses and Dissertations. 1334. Iowa State University.

- Ahrens, J. F., & Loomis, W.E. (1963). Floral induction and development in winter wheat. *Crop Science*, 3, 463-466.
- Arnhold, E. (2017). easynls: Easy Nonlinear Model. R package version 5.0. <https://CRAN.R-project.org/package=easynls>.
- Bajgain, P., Zhang, X., Jungers, J., DeHaan, L., Heim, B., Sheaffer, C., Wyse, D. & Anderson, J. (2020). ‘MN-Clearwater’, the first food-grade intermediate wheatgrass (*Kernza* perennial grain) cultivar. *Journal of Plant Registrations*, 14(3), 288-297.
- Baty, F., Ritz, C., Charles, S., Brutsche, M., Flandrois, J.P., & Delignette-Muller, M.L. (2015). A toolbox for nonlinear regression in R: The Package nlstools. *Journal of Statistical Software*, 66(5), 1-21.
- Becker, R., Wagoner, P., Hanners, G.D., & Saunders, R.M. (1991). Compositional, nutritional and functional-evaluation of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum-Intermedium*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 15(1), 63–77.
- Bor, N.N. (1970). Flora Iranica. Vol. 70. In: K. H. Rechner (ed), Gramineae, Tribus VII. Triticeae Dumort, (pp. 147-244). Akad. Druck-u,Verlagsanstalt, Graz, Austria.
- Chastain, T.G., & Young, W.C. III. (1998). Vegetative plant development and seed production in cool-season perennial grasses. *Seed Science Research*, 8, 295-301.
- Chouard, P. (1960). Vernalization and its relations to dormancy. *Annual Review of Plant Physiology*, 11, 191–238.
- Colvill, K.E., & Marshall, C. (1984). Tiller dynamics and assimilate partitioning in *Lolium perenne* with particular reference to flowering. *Annals of Applied Biology*, 104, 543-557.
- Cox, T.S., Glover, J.G., Van Tassel, D.L., Cox, C.M., & DeHaan, L.R. (2006). Prospects for developing perennial grain crops. *Bioscience*, 56, 649–659.
- Cox, T.S., Van Tassel, D.L., Cox, C.M., & DeHaan, L.R. (2010). Progress in breeding perennial grains. *Crop Pasture Science*, 61, 513–521.

- Culman, S.W., Snapp, S.S., Ollenburger, M. Basso, B., & DeHaan, L.R. (2013). Soil and water quality rapidly responds to the perennial grain Kernza wheatgrass. *Agronomy Journal*, *105*, 735–744.
- Davidson, J. L., Christian, K. R., Jones, D. B., & Bremner, P. M. (1985). Responses of wheat to vernalization and photoperiod. *Australian Journal of Agricultural Research*, *36*, 347-359.
- DeHaan, L., Christians, M., Crain, J., & Poland, J. (2018). Development and evolution of an intermediate wheatgrass domestication program. *Sustainability*, *10*, 1499.
- DeHaan, L., Wang, S., Larson, S., Kantarski, T., Zhang, X., & Cattani, D. (2014). Current efforts to develop perennial wheat and domesticate *Thinopyrum intermedium* as a perennial grain. In: C. Batello et al., editors, Perennial crops for food security: Proc. of the FAO expert workshop. p. 72–89.
- Duchene, O., Dumont, B., Cattani, D.J., Fragnant, L., Schlautman, B., DeHaan, L.R., Barriball, S., Jungers, J.M., Picasso, V.D., David, C., & Celette F. (2021). Process-based analysis of *Thinopyrum intermedium* phenological development highlights the importance of dual induction for reproductive growth and agronomic performance. *Agricultural and Forest Meteorology*, 301-302, 108341.
- Evans, L.T. (1964). Reproduction. In: Barnard, C. (Ed.), *Grasses and grasslands*. London: Macmillan, (pp. 126-153).
- Favre, J.R., Munoz, T., Combs, D.K., Wattiaux, M.A., & Picasso, V.D. (2019). Forage nutritive value and predicted fiber digestibility of Kernza intermediate wheatgrass in monoculture and in mixture with red clover during the first production year. *Animal Feed Science Technology*, *258*, 114298.
- Flood, R.G., & Halloran, G.M. (1984). The nature and duration of gene action for vernalization response in wheat. *Annals of Botany*, *53*, 363-368.
- Frahm, C.S. (2017). Developing agronomics of intermediate wheatgrass as a perennial grain. MS Thesis. University of Minnesota, Minneapolis, USA.
- Friebe, B., Gill, K.S., Tuleenand, N.A., & Gill, B.S. (1996). Transfer of wheat streak mosaic virus resistance from *Agropyron intermedium* into wheat. *Crop Science*, *36*, 857-861.

- Glover, J.D., Culman, S.W., DuPont, S.T., Broussard, W., Young, L., Mangan, M.E., Mai, J.G., Crews, T.E., DeHaan, L.R., Buckley, D.H., Ferris, H., Turner, R.E., Reynolds, H.L., & Wyse, D.L. (2010). Harvested perennial grasslands provide ecological benchmarks for agricultural sustainability. *Agriculture Ecosystems and Environments*, *137*, 3–12.
- González-Barrios, P., Diaz-Garcia, L., & Gutierrez, L. (2019). Mega-Environmental Design: using genotype by environment interaction to optimize resources for cultivar testing. *Crop Science* *59*, 1–17
- Heichel, G.H., Hovin, A.W., & Henjum, K.I. (1980). Seedling age and cold treatment effects on induction of panicle production in reed canarygrass. *Crop Science*, *20*, 135-142.
- Heide, O.M. (1987). Photoperiodic control of flowering in *Dactylis glomerata*. a true-short-long-day plant. *Physiologia Plantarum*, *70*, 523-529.
- Heide, O.M. (1988). Flowering requirements of Scandinavian *Festuca pratensis*. *Physiologia Plantarum*, *74*, 487-492.
- Heide, O.M. (1990). Primary and secondary induction requirements for flowering of *Festuca rubra*. *Physiologia Plantarum*, *79*, 51-56.
- Heide, O.M. (1994). Control of flowering and reproduction in temperate grasses. *New Phytologist*, *128*, 347-362.
- Heide, O.M. (2001). Flowering responses of contrasting ecotypes of *Poa annua* and their putative ancestors *Poa infirma* and *Poa supina*. *Annals of Botany*, *87*, 795–804.
- Ivancic, K., Locatelli, A., Tracy, B., & Picasso, V.D. (2021). Kernza intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) response to a range of vernalization conditions. *Canadian Journal of Plant Science*.
- Jungers, J.M., C.S. Frahm, N.E. Tautges, N.J. Ehlke, M.S. Wells, D.L. Wyse & C.C. Sheaffer. 2018. Growth, development, and biomass partitioning of the perennial grain crop *Thinopyrum intermedium*. *Annals of Applied Biology*, *172*, 346-354.

- Lanker, M., Bell M., & Picasso, V.D. (2019). Farmer perspectives and experiences introducing the novel perennial grain Kernza intermediate wheatgrass in the US Midwest. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 1-10.
- Li, H.J., & Wang, X.M. (2009). *Thinopyrum ponticum* and *Th. intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. *Journal of Genetics and Genomics*, 36, 557-565.
- Mahelka, V., Kopecky, D. & Pastova, L. (2011). On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC Evolutionary Biology*, 11.
- Moore, K.J., Moser, L.E., Vogel, K.P., Waller, S.S., Johnson, B.E., & Pedersen, J.F. (1991). Describing and quantifying growth stages of perennial grasses. *Agronomy Journal*, 83, 1073–1077.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., & McMahon, T.A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11, 1633-1644.
- Pinthus, M.J., & Millet, E. (1978). Interactions among number of spikelets, number of grains and grain weight in the spikes of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany*, 42, 839-848.
- Pugliese, J.Y., Culman, S.W., & Sprunger, C.D. (2019). Harvesting forage of the perennial grain crop Kernza (*Thinopyrum Intermedium*) increases root biomass and soil nitrogen. *Plant and Soil*, 437, 241-254.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rawson, H.M. (1970). Spikelet number, its control and relation to yield per ear in wheat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 23, 1-15.
- Richards, A. (1988). A tiller inhibitor gene in wheat and its effect on plant growth. *Australian Journal of Agricultural Research*, 39, 749:757.
- Robson, M.J., Ryle, G.J.A., & Woledge, J. (1988). The grass plant – its form and function. In: Jones, M.B., and A. Lazenby (Ed). The grass crop. *The physiological basis of production*. Chapman Hall, New York. (pp. 25-84).

- Ryan, M.R., Crews, T.E., Culman, S.W., DeHaan, L.R., Hayes, R.C., Jungers, J.M., & Bakker, M.G. (2018). Managing for multifunctionality in perennial grain crops. *BioScience*, 68, 294–304.
- Saha, M.C. (2014). Tall Fescue. In: H. Cai, T. Yamada and C. Kole (Ed.). *Genetics, Genomics and Breeding of Forage Crops*. CRC Press, Boca Raton, FL. (pp. 58-89).
- Sakiroglu, M., Dong, C., Hall, M.B., Jungers, J., & Picasso, V.D. (2020). How does nitrogen and forage harvest affect belowground biomass and nonstructural carbohydrates in dual-use Kernza intermediate wheatgrass. *Crop Physiology and Metabolism*, 60, 2562-2573.
- SAS Institute. (2004). Statistical analysis system online documentation. Cary, NC.
- Schwartz, C.J., Doyle, M.R., Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Mitchell-Olds, T., & Amasino, R.M. (2010). Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *BioEnergy Research*, 3, 38–46.
- Sharma, H., Ohm, H., Goulart, L., Lister, R., Appels, R., & Benlhabib, O. (1995). Introgression and characterization of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Genome*, 38, 406-413.
- Stapleton, J., & Jones, M.B. (1987). Effects of vernalization on the subsequent rates of leaf extension and photosynthesis of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Grass and Forage Science*, 47, 27–31.
- Sung, S. & Amasino, R.M. (2005). Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 491–508.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D’Antonio, C., Dobson, A., Howart, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff D., & Swackhamer D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292, 218–284.
- Trione, E.J., & Metzger, R.J. (1970). Wheat and barley vernalization in a precise temperature gradient. *Crop Science*, 10, 390–392.
- Tzvelev, N.N. (1976). Poaceae, URSS. In: A. A. Fedorov (Ed.), *Triticeae Dum.* Nauka Publ. House, Leningrad, USSR. (pp. 105—206).
- Venables, W.N. & Ripley, B.D. (2002). *Modern applied statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.

- Wagoner, P., & Schauer, A. (1990). Intermediate wheatgrass as a perennial grain crop. In: Janick, J., J.E. Simon (Ed.), *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, OR (pp. 143-145).
- Zhang, X., Sallam, A., Gao, L., Kantarski, T., Poland, J., DeHaan, L.R., Wyse, D.L., & Anderson, J.A. (2016). Establishment and optimization of genomic selection to accelerate the domestication and improvement of Intermediate wheatgrass. *Crop Science Society of America, 9 (1)*, 1-18.
- Zimbric, J.W., Stoltenberg, D.E., & Picasso, V.D. (2020). Strategies to reduce plant height in dual-use intermediate wheatgrass cropping systems. *Agronomy Journal, 2021*, 1-11.

3. AGRONOMIC ASSESSMENT OF TWO POPULATIONS OF INTERMEDIATE WHEATGRASS - KERNZA® (THINOPYRUM INTERMEDIUM) IN TEMPERATE SOUTH AMERICA

Locatelli, A., Gutierrez, L., Duchene, O., Speranza, P. R., & Picasso Risso, V. D. (2023). *Grassland Research*. <https://doi.org/10.1002/glr2.12032>

3.1. ABSTRACT

Background: Kernza® intermediate wheatgrass is a perennial grain and forage crop which can provide multiple ecosystem services. Kernza's major research efforts have taken place in high latitudes. The goal of this study was to evaluate for the first time the agronomic performance of Kernza in a low latitude region with mild winters.

Methods: A KS-Cycle 4 Kernza population (A) was planted in spring in Wisconsin, USA, and selected in one cycle for lower vernalization requirements, obtaining a new population (B). These two populations under three nitrogen fertilization rates were evaluated in a full factorial, completely randomized field experiment in Uruguay over two years.

Results: The populations were similar in grain yields and flowering time the first year, but population B had 63% lower grain yield in the second year and 20% lower forage yield throughout the experiment. Increasing N rate to 160 kg ha⁻¹ increased 63% grain and 28% forage yield across populations. Forage yields and nutritive values were similar to those reported in the northern hemisphere. However, grain yields for both first (316 kg ha⁻¹) and second year (41 kg ha⁻¹) were lower due to reduced flowering and weed competition.

Conclusions: Expansion of Kernza to lower latitude regions will require further breeding to improve reproductive performance.

Keywords: *Thinopyrum intermedium*, vernalization requirements, nitrogen fertilization rates, low-latitude regions, perennial grains

3.2. INTRODUCTION

Annual grain crops widely dominate the world's arable land and are the main source of food on the planet (Pimentel et al., 2012). Due to shorter growing seasons and less developed root systems, annual crops provide less protection against soil erosion, have lower water and nutrient use efficiency, store less carbon in the soil and make the production system less resilient to both biotic and abiotic stresses than perennial plant communities (King & Blesh, 2018; Osterholz et al., 2019; Sanford, 2014; Sanford et al., 2021). Intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey, Kernza[®]) is a cool season perennial grass with vernalization requirements to flowering which has been domesticated as a perennial grain crop in cold regions of north America based on its seed size, mechanical harvesting possibilities, and easy threshing (Wagoner & Schauer, 1990). At the beginning of this century, scientists at the Land Institute, Salina, KS, started to work on the domestication of *T. intermedium* by selection for improved yield per head, increased seed size, free threshing, shatter resistance, reduced height, among other qualities (DeHann et al., 2018; Zhang et al., 2016). As a result of this process of conventional breeding, *T. intermedium* became commercially available to farmers in the USA under the trade name Kernza[™] (DeHann et al., 2014). Later, "MN-Clearwater", was released by the University of Minnesota and is the first Kernza cultivar that produces grain approved for sale as Kernza perennial grain (Bajgain et al., 2020). On the other hand, its forage potential has always been remarkable, since *T. intermedium* was introduced from Eurasia to North America a century ago, and before it began to be improved as a grain crop, it has demonstrated to be a forage with good qualities and many forage cultivars were released (Jensen et al., 2016a). Although the size of Kernza grain has increased throughout its breeding, it is still 4 to 5 times smaller than wheat grain (Rahardjo et al., 2018). In comparison to wheat, Kernza has a higher content of protein, ash, fat, dietary fiber, and antioxidants, but a lower content of starch (Hayek, 2020; Mathiowetz, 2018; Rahardjo et al., 2018; Tyl & Ismail, 2019). Although its grain yield is currently lower than annual cereals (Franco et al., 2021), harvesting grain and forage can narrow the economic gap with annual grain systems (Bell et al.,

2008), and satisfy farmers that have shown interest in the dual use (grain-forage) potential of Kernza (Lanker et al., 2019). Improvements in grain and forage yield, as well as additional forage harvests could improve the economic sustainability of Kernza (Law et al., 2022). Indeed, the harvest of forage and grain promoted nutrient availability and productivity of forage, root and grain biomass which highlights Kernza's dual-purpose possibilities (Pugliese et al., 2019; Sakiroglu et al., 2020).

Low-latitude regions of South America have contributed substantially to global grain production, after transforming native grasslands into annual crop systems, which led to the deterioration of natural resources and crop vulnerability to severe weather events (Modernel et al., 2016). In the low latitude regions of South America, the main winter crops are wheat, barley and oilseed rape, whose cultivars used are mostly spring cultivars. The winters are predominantly mild and temperatures increase rapidly during the spring, so late anthesis leads to grain filling under unfavorably high temperatures, decreasing yield (Locatelli et al., 2022a). Kernza's geographic expansion to these regions could be seriously threatened as a dual-purpose crop due to its vernalization requirements, though phenotypic variability has been detected for these requirements (Locatelli et al., 2022b). As most temperate perennial grasses, Kernza could also require a dual induction to flowering: a primary induction by short day or low temperature, followed by secondary induction by long day with interchangeable effects of temperature and daylength (Heide, 1994; Ivancic et al., 2021). Primary induction, requires some combination of cool temperatures (vernalization) and/or short days which enables the plant to initiate inflorescence primordia, while secondary induction involves long days and increasing temperatures, allowing culm elongation, inflorescence development and anthesis (Chastain & Young, 1998; Heide, 1994). Low-latitude regions may not accumulate enough days of cold temperature to meet those requirements to initiate flowering, resulting in lower grain yields. The vernalization requirements of Kernza may not only be a constraint to its agronomic adaptation to low latitude regions, but are also being studied in high latitude regions of the world with cold winters due to their negative impact on first year grain yields (Cattani & Asselin, 2022; Jungers et al., 2022). Although the expansion of a perennial crop such as Kernza would be advantageous for every region, breeding advances have

only taken place in cold areas of North America. Therefore, finding Kernza germplasm with adaptation to low-latitude regions testing the adaptation of Kernza populations with potentially contrasting vernalization requirements is needed. Under non-vernalizing temperatures, research conducted in growth chambers with Kernza germplasm showed that about 15% to 25% of the plants were able to keep the ability to flower (Ivancic et al., 2021; Locatelli et al., 2022b). Selecting plants with the ability to flower in low-stimulus environments to fulfill the vernalization requirements of Kernza should lead to germplasm with a higher ability to produce grain and thus be used as a dual-purpose crop in low-latitude regions. Therefore, our first hypothesis is that a Kernza population selected in an environment without vernalization temperatures would produce higher yields in low latitudes.

Forage yields of Kernza intermediate wheatgrass have been reported from northern and central regions of North America, averaging 6450 kg ha⁻¹ year⁻¹ and 7419 kg ha⁻¹ year⁻¹ for the first year and older stands (second, third, or fourth year), respectively (Franco et al., 2021). Kernza can be managed as dual use crop, harvesting grain in the summer, and harvesting forage in the spring, summer, and fall. Spring and fall forage harvests contribute one-third to one-quarter of the biomass harvested in the summer, and they have higher forage nutritive value, contributing substantially to the profitability of Kernza (Favre et al., 2019; Hunter et al., 2020a; Pinto et al., 2021a). Kernza forage nutritive value in high-latitude regions was suitable for lactating beef cows, dairy cows, and growing heifers when harvested in the spring and fall, and for beef cows in summer (Favre et al. 2019; Pinto et al., 2021a). The forage quality can be strongly modified by factors of the production environment, such as climate, defoliation management, time of cutting and fertilization (Hoveland & Monson, 1980; Nelson & Moser, 1994). Grain yield in pure stand has had widely varying values, from 112 kg ha⁻¹ (Culman et al., 2013) to 1089 kg ha⁻¹ (Favre et al., 2019) for the first year and from 3 kg ha⁻¹ (Pugliese, 2017) to 1662 kg ha⁻¹ (Culman et al., 2013) for the second year (Franco et al., 2021). Although grain yield is highly variable, there is consensus in a decline in performance over time (Law et al., 2021; Pinto et al., 2021b; Tautges et al., 2018; Zimbric et al., 2020). Grain yields are still low, although the response to selection for this trait has been high and stable (DeHaan et al., 2014; DeHaan, 2022).

The high variability in grain yields could be due to several combined factors such as differences between breeding cycles, pedoclimatic context and field agronomic management operations. Therefore, our second hypothesis is that Kernza grown in low latitudes would have similar forage yield and nutritive value than Kernza grown in higher latitudes, but lower grain yields.

Nitrogen availability can influence timing and success of reproductive growth and plant fertility (Gungula et al., 2003; Amanullah et al., 2009; Wang & Tang, 2019). N fertilization in a dual-purpose crop is a key factor as it can affect both grain and forage production, for which knowing the response to the application of N is critical to the management of the crop (Koeritz et al., 2013; Vogel et al., 2002). Kernza's grain and forage yields response to N fertilization had a quadratic behavior, with an optimum N rate of 61–96 kg N ha⁻¹ and 81–121 kg ha⁻¹, respectively (Jungers et al., 2017). Zimbric et al. (2020) found increases in both biomass and grain yield from 90 to 135 kg N ha⁻¹ rates. Therefore, our third hypothesis is that higher N rates will increase grain and forage yields.

Weed suppression is another key agronomic management factor in perennial crops. Depending on the timing, frequency and intensity of forage harvesting, each cut may offer an opportunity for weeds to utilize resources and grow, damaging future forage and grain performance or, on the contrary, to offer competitive advantages to the seeded species (Ghanizadeh & Harrington, 2019; Meiss et al., 2010). Severe defoliation (i.e., high intensity and high frequency) decreases the survival of perennial grasses in pastures, which is exacerbated by increased competition from invasive species (O'Connor, 1991). Indeed, farmers identified weed suppression as a major information gap in dual use Kernza cropping systems (Lanker et al., 2019). During a three-year experiment, weed biomass under dual-use Kernza systems decreased by an average of 88%, and weedy and weed-free treatments had similar grain and forage production, suggesting that weed competition may not have negative effects on Kernza (Zimbric et al., 2020). However, Weik et al. (2002) reported weed biomass increase from the first year to the second one, although the magnitudes were too low to affect grain and forage productivity. Therefore, our fourth hypothesis is that weed biomass in dual-use Kernza systems would decrease over time.

In this study, we report for the first-time agronomic performance of Kernza managed for dual-use in a temperate low-latitude region with mild winters. Specifically, we evaluated plant heading, heading time, grain and forage yield, harvest index, weed biomass, and forage nutritive value of Kernza intermediate wheatgrass in a replicated field experiment over two years.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. Plant Material

Two Kernza populations were developed at the University of Wisconsin – Madison, using seeds from Kernza selection cycle 4 from The Land Institute (TLIC4 - Salina, KS, USA): A and B (Figure 1). The population A consisted of seeds harvested in summer 2017 from plants seeded in the fall 2016 so they had fulfilled their vernalization requirements in the field in Arlington, WI, USA (43°18' N, 89°19' W). We expected that seeds from this population A would have diversity regarding vernalization requirements (Locatelli et al., 2022b), and only 15%-25% of their plants would flower in an environment without vernalization according to Locatelli et al. (2022b) results from greenhouse study. The population B consisted of seeds harvested on November 9, 2017 from plants of TLIC4 sown on April 19, 2017 in the field in Arlington, WI (AK3 Field 350B), so these plants completed their life cycle during one spring-summer-fall period, elongated in late July, flowered in August, and were harvested in November experiencing little vernalizing stimuli. To obtain each population, seed from the same original population (TLIC4) was sown at two contrasting times in Wisconsin: fall 2016 and spring 2017. Therefore, plants from both trials were subject to contrasting vernalizing stimuli before being harvested in the summer and fall of 2017 (Figure 1). We expected that seeds from population B would have a higher proportion of plants flowering in environments with low vernalization stimuli, because they were progeny from plants which flowered with restrictive vernalization conditions. We consider population B the product of one cycle of selection for reduced vernalization requirements. The plants that produced the seeds

that comprised population B had fewer fertile stems (3.3 ± 1.7 spikes per plant) than those in A (14.0 ± 3.6 spikes per plant), they had smaller spikes (spike weight was 0.4 ± 0.1 g for B and 0.6 ± 0.2 g for A). The seeds from population B were also smaller (1000 seed weight was 5.6 ± 0.3 g for B and 7.7 ± 0.4 g for A). Seeds of both populations were imported to Uruguay subject to phytosanitary inspection and authorization (MGAP-AFIDI # 1318855, species code: THIIN21301034).

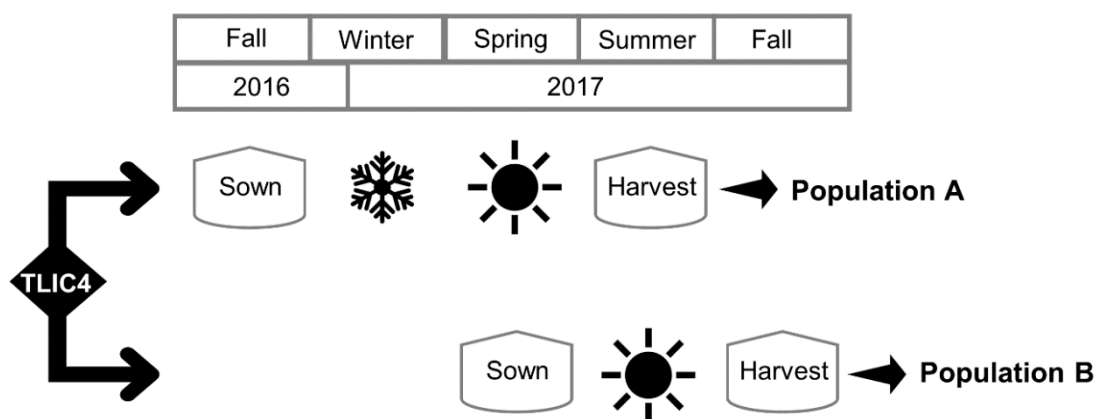


FIGURE 1 Explanatory scheme for the development of the populations in Arlington, WI, used in the study.

3.3.2. Experimental design and management

The experiment was sown in the fall (April) of 2018 at the Experimental Station “Dr Mario A. Cassinoni” from the University of Uruguay (UDELAR), $32^{\circ}55' S$, $58^{\circ}03' W$, in Paysandu Uruguay. Soils were clay loamy fertile Typic Argiudoll with less than 1% slope which had previously been under perennial pasture. The treatment design was a complete factorial with two factors: Kernza population origin (2 levels: A and B) and nitrogen fertilization rate (3 levels: 0, 80, and $160 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$). The experimental design was completely randomized with 6 replications per treatment (Figure S1). The experiment consisted of 36 plots, each one of 1 m^2 , which consisted of 25 Kernza plants planted equidistantly to 20 cm, with 0.4 m alleys (Figure 2). Seeds were sown in conetainers (75 ml) and were grown in standard potting compost

(composition for 1 m³: 70% milled pine bark, 30% peat, 1 kg triple phosphate, 1 kg of a controlled-release fertilizer 19-6-10). Seedlings were grown in greenhouse at natural light, until plants reached the three-leaf stage (from mid-April 2018 until mid-May 2018) and then transplanted to field. From transplanting until the plants reached tillering stage, a plastic shade net was used to control early weed infestation (Figure 2b). The previous perennial pasture, whose predominant species were white clover (*Trifolium repens* L.), dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir) and Westerworld (annual) ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. var. *westerwoldicum*), was killed with herbicide (glyphosate, 5 L ha⁻¹) and then minimally tilled with a cultivator two months before transplant. The nitrogen fertilizer, urea (46-0-0), was applied in fall and winter of the second and third years according to the schedule in Figure 3. Each N application was half the respective annual rate. Due to the impact of weeds on Kernza performance under field production conditions surveyed by Lanker et al. (2019) for northern hemisphere conditions, after establishment the weeds were not controlled in order to evaluate weed biomass and its impact on Kernza production conditions in this new region.

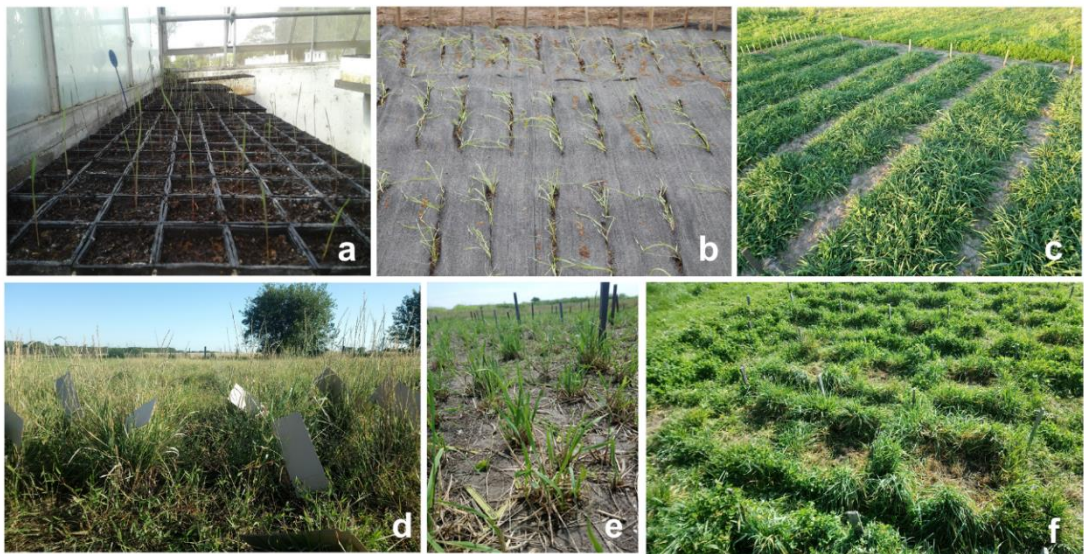


FIGURE 2 Pictures of Kernza in Paysandu, Uruguay experiment at seedling (a), establishment in the field (b), beginning of stem elongation (c), grain and forage harvest in summer (d), fall regrowth (e), and winter forage harvest with quadrats (f).

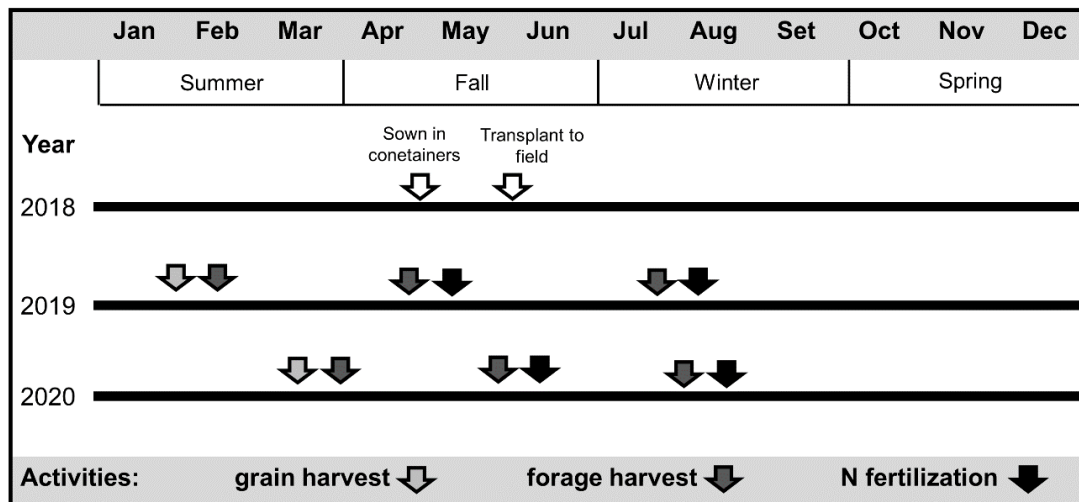


FIGURE 3 Schedule of management activities for each year of the experiment.

3.3.3. Grain, forage, and weed sampling

The grain samples were collected in the summer while the forage and weeds samples were collected three times a year in fall, winter, and summer, respectively (Figure 3). Grain harvests were done when the crop had reached physiological maturity (stage S4-5, Moore et al., 1991). Grain and forage samples were collected on January 21, 2019 (accumulated forage since sowing) and on March 3, 2020 (Figure 2d). A 60 cm-by-60 cm quadrat per plot was used, located in the center of the plot. The seed heads from these samples (corresponding to the 9 plants in the center of the plot) were cut 5 cm below the lowest seeds, dried, weighed, and threshed manually to estimate grain yield. The dry weight for spikes was added to the forage dry weight to estimate total dry biomass for the harvest index calculations. The seed heads from these samples (corresponding to the 9 plants in the center of the plot) were cut 5 cm below the lowest seeds and threshed manually to estimate grain yield. Forage and weeds samples were collected by hand-harvesting quadrat samples at 2.5 cm above the soil. Both Kernza and weeds were separated in the field and placed in individual paper bags. Samples were then placed in a forced-air dryer at 65°C for 48 h. Biomass dry matter (DM) yields per hectare were then extrapolated from the quadrat data on an area basis and one sample per plot was analyzed for nutritive value for each combination of

treatments. Forage yield/weed biomass ratio was calculated as the result of dividing DM forage (kg ha^{-1}) by DM weed biomass (kg ha^{-1}). The forage fall 2019 and fall 2020 samples were collected on April 11, 2019 and May 18, 2020, respectively and the winter ones on July 15, 2019 and July 21, 2020, respectively (Figure 2e, f; Figure 3). Forage and weeds outside the quadrants were also cut at 2.5 cm above the soil and removed after each harvest. Harvest index was calculated by dividing the mass of grain (grain yield) by the total mass of grain and straw (forage yield) at summer.

For all forage samples, a 30-g subsample was ground twice using a Wiley mill (Model 4 Thomas-Wiley Laboratory Mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) to pass through a 1-mm screen for chemical composition analysis. Analysis of forage crude protein (CP, %) (Kjeldhal N percentage \times 6.25) according to Horwitz and Latimer (2005), and neutral detergent fiber (NDF, %) as well as acid detergent fiber (ADF, %) (Fiber analyzer 200, Ankom Technology Corporation, Fairport, NY; Van Soest et al., 1991) were performed at the Nutrition Laboratory of the Faculty of Agronomy, University of Uruguay. CP, NDF, and ADF values for forage samples were reported as a proportion of the DM. Relative feed value (RFV) was calculated by multiplying digestible dry matter [DDM, %; $\text{DDM} = 88.9 - (0.779 \times \text{ADF})$] by dry matter intake ($120/\text{NDF}$) and then dividing by 1.29 (Linn & Martin, 1991).

3.3.4. Weather data

Temperature and precipitation were recorded at an automatic weather station located within 100 m from the field experiment (Table S2). The accumulation of heat units, expressed in growing degree-days (GDD) was calculated using daily average temperatures and the equation from McMaster and Wilhelm (1997), using 0°C as base temperature as described by Jungers et al. (2018). The accumulated Photo-Vernalo-Thermic Units (UPVT) and vernalization units (VU) between crop emergence and the first grain harvest and between the first and second grain harvests were calculated using the formalisms employed by Duchene et al. (2021) from the STICS soil-crop model (Brisson et al., 1998; 2002; 2009).

From the STICS model, the impacts of temperature, photoperiod, and cold requirements were kept, therefore the UPVT were computed at the daily time step as follow:

$$UPVT(i) = GDD_t(i) \cdot SFP(i) \cdot SFV(i) \quad (1)$$

where i is the considered day, GDD_t are the growing degrees-days limited by thresholds, SFP is a slow-down factor accounting for photoperiod, and SFV is a slowdown factor accounting for vernalization.

The impacts of temperature respond to a triangular function:

$$\begin{cases} GDD_t(i) = 0 & \text{if } T_{\text{mean}}(i) \leq DT_{\text{min}} \text{ or } T_{\text{mean}}(i) \geq DT_{\text{max}} \\ GDD_t(i) = T_{\text{mean}}(i) - DT_{\text{min}} & \text{if } DT_{\text{min}} < T_{\text{mean}}(i) \leq DT_{\text{opt}} \\ GDD_t(i) = \frac{DT_{\text{opt}} - DT_{\text{min}}}{DT_{\text{opt}} - DT_{\text{max}}} \cdot (T_{\text{mean}}(i) - DT_{\text{max}}) & \text{if } DT_{\text{opt}} < T_{\text{mean}}(i) < DT_{\text{max}} \end{cases} \quad (2)$$

where DT_{min} , DT_{opt} and DT_{max} are the minimal, optimal and maximal temperature to allow for crop development. DT_{min} is equal to base temperature, and the values for DT_{opt} and DT_{max} used were 28 and 35°C, respectively (Brisson et al., 2009).

The photoperiod ($PhotoP(i)$) was calculated using astronomical input on the basis of the calendar day and the latitude using the NOAA solar calculator (<https://gml.noaa.gov/grad/solcalc/sunrise.html>).

The slow-down photoperiodic effect ($SFP(i)$) could be calculated as follow:

$$\begin{cases} SFP(i) = \frac{(PhotoP(i) - PhotoP_{\text{sat}})}{(PhotoP_{\text{sat}} - PhotoP_{\text{base}})} + 1 \\ SFP(i) = \max(\min(SFP(i), 1), 0) \end{cases} \quad (3)$$

where $PhotoP_{\text{base}}$ is the photoperiod below which there is no development and $PhotoP_{\text{sat}}$ is the saturation photoperiod, above which there is no limitation. The second term of this equation keeps $SFP(i)$ values between 0 and 1 in mathematical terms.

The estimation of the cold requirements consisted of two steps: vernalizing value of a given day was firstly computed ($VV(i)$), and then the slow-down factor ($SFV(i)$) was calculated as the ratio of completion of the total vernalization requirements:

$$VV(i) = \max\left(1 - \left[\frac{T_{\text{vern}} - T_{\text{mean}}(i)}{\text{Ampli}_{\text{vern}}}\right]^2, 0\right) \quad (4)$$

$$\begin{cases} SFV(i) = \frac{[\sum_{j=D_{\text{emer}} \text{ or } D_{\text{harv}}}^i VV(j)] - VV_{\text{min}}}{VV_{\text{req}} - VV_{\text{min}}} \\ SFV(i) = \max(\min(SFV(i), 1), 0) \end{cases} \quad (5)$$

where $VV(i)$ is the vernalization units on day i , T_{vern} is the temperature to reach an optimal vernalization value, T_{mean} is the mean temperature on day i , and $\text{Ampli}_{\text{vern}}$ is the temperature range with vernalizing effects. In this study we used the best estimates calculated by Duchene et al. (2021) and also used by Jungers et al. (2022): $T_{\text{vern}} = 4.5$ and $\text{Ampli}_{\text{vern}} = 7.4$. The accumulation of vernalization units was calculated by summing VV_i from the day of emergence to the first grain harvest and between this one and the second grain harvest (Table 1). Therefore, the accumulation of VU included all days that had vernalizing temperatures (within the $\text{Ampli}_{\text{vern}}$ range) for both grain production years.

For each of the activities carried out throughout the experiment (grain harvests, forage harvests), days, thermal accumulation (GDD) and accumulated rainfall (mm) during the whole experiment were calculated (Table 1).

TABLE 1. Days, thermal accumulation (GDD), and accumulated rainfall (mm) during each experimental management activity (first grain and forage harvest, first fall forage harvest, first winter forage harvest, second grain and forage harvest, second fall forage harvest, and second winter forage harvest). With every grain harvest the unit count resets to zero. Photo-Vernalo-Thermic Units (UPVT) and vernalization units (VU) accumulations were calculated for the first and second grain and forage harvests.

Harvest	Date	Days	GDD (°C day)	Accumulated rainfall (mm)	VU	UPVT
First grain and forage harvest	Jan 21, 2019	267	4320	1128	43	1210
First fall forage harvest	Apr 11, 2019	80	1756	282	-	-
First winter forage harvest	Jul 15, 2019	175	3148	512	-	-
Second grain and forage harvest	Mar 3, 2020	407	7551	1363	29	1033
Second fall forage harvest	Mar 3, 2020	76	1480	211	-	-
Second winter forage harvest	Jul 20, 2020	139	2263	355	-	-

Note: For the first grain and forage harvest the thermal (GDD), days, UPVT and VU accumulations are shown from emergence in conetainers (May 1, 2018), while rainfall accumulation began to be counted from transplanting to the field (May 15, 2018).

Abbreviations: GDD, growing degree-days; UPVT, Photo-Vernalo-Thermic Units; VU, vernalization units.

3.3.5. Plant heading and heading time

Plant heading and heading time were measured for the first year of production only. Plant heading was monitored three times a week and was recorded when the first

spike emerged from the flag leaf sheaf (stage R1, according to Moore et al., 1991). Plant heading was expressed as the percentage of plants that produced at least one head. Heading time was calculated in GDD from the emergence to heading date for each plant. During the first year also, number of spikes per plant was assessed for the 90 plants with earliest flowering.

3.3.6. Statistical analysis

Because the first N application was done after the first fall forage harvest (April 2019, Figure 3), the statistical models used for the first year did not include N fertilization factor, whereas the models used for the second year did. Therefore, for the first year, the treatment design consisted of only one factor (population) with two levels (A and B), and each treatment was replicated 18 times (i.e., 18 plots or experimental units) in a completely randomized design. The second year was a complete factorial with the 2 populations and 3 nitrogen application rates (0, 80 and 160 kg N ha⁻¹), and each treatment combination was replicated 6 times (i.e., 6 plots) in a completely randomized design.

Treatment effect on forage yield, grain yield, harvest index, weeds biomass, heading time, NDF, ADF, CP and RFV were tested with analysis of variance conducted using R version 4.0.3 (R Core Team, 2020) and considered significant at $p < 0.05$.

For the first-year analysis, for grain yield, harvest index, heading time, NDF, ADF, CP and RFV, a randomized complete design was used and only the effect of population was included in the following linear model:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij} \quad (6)$$

where Y_{ij} is the response variable, μ is the overall mean, P_i is the effect of the i^{th} population (fixed effect) and e_{ij} is the residual error. An analysis of deviance using this same model was carried out on plant heading using the GLIMMIX procedure in SAS 9.4 (SAS Institute, 2004) with a binomial link because plant heading is a presence/absence trait.

For the second year the effects of population, N rate and their two-way interaction on grain yield and harvest index were included in the following linear model:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + N_j + PN_{ij} + e_{ijk} \quad (7)$$

where Y_{ijk} is the response variable, μ is the overall mean, P_i is the effect of the i^{th} population (fixed effect), N_j is the effect of the j^{th} N rate (fixed effect), PN_{ij} is the interaction between population and harvest season (fixed effect), e_{ijk} is the residual error.

During the first year, population, harvest season and their two-way interaction effects on forage yield, weed biomass and forage/weed biomass ratio were analyzed with a randomized complete design with population as treatment and harvest season as repeated measures. The following linear mixed model was used:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + S_j + PS_{ij} + e_{ijk} \quad (8)$$

where Y_{ijk} is the response variable, μ is the overall mean, P_i is the effect of the i^{th} population (fixed effect), S_j is the effect of the j^{th} harvest season (fixed effect), PS_{ij} is the interaction between population and harvest season (fixed effect), e_{ijk} is the residual error.

For the second year of the experiment, effects of population, N rate, and harvest season and their two and three-way interactions on yield forage, weed biomass and forage/weed biomass ratio were analyzed with a randomized complete design with population and N rate combinations as the treatment and harvest season as repeated measures. The following linear mixed model was used:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + N_j + S_k + PN_{ij} + PS_{ik} + NS_{jk} + PNS_{ijk} + e_{ijkl} \quad (9)$$

where Y_{ijkl} is the response variable, μ is the overall mean, P_i is the effect of the i^{th} population (fixed effect), N_j is the effect of the j^{th} N rate (fixed effect), S_k is the effect of the k^{th} harvest season (fixed effect), PN_{ij} , PS_{ik} , NS_{jk} and PNS_{ijk} are the effects of the two and three-way interactions and e_{ijkl} is the residual error.

3.4. RESULTS

3.4.1. Weather and field conditions

From emergence in containers to the first grain harvest 4320 GDD, 43 VU, and 1210 UPVT were accumulated. From the first grain harvest to the second one 7551 GDD, and 29 VU, and 1033 UPVT were accumulated (Table 1). From the first grain harvest to the first fall forage harvest more than 1700 GDD were accumulated; from the later to the first winter forage harvest more than 1300 GDD were accumulated. The phenological delay observed in the second year caused the grain to mature later (March), so thermal accumulation of regrowth period was shorter. From transplanting to the field to the first grain harvest rainfall was 1128 mm, and from the first to the second grain harvest there were 1363 mm of rainfall. For each fall and winter forage regrowth period, the average rainfall was well over 200 mm (Table 1).

Kernza plant density did not change during the first year of the experiment, all Kernza plants survived. In the second year some plants were lost, mainly to weed competition

3.4.2. Plant heading, heading time, grain yield and harvest index

Populations A and B had no differences in plant heading or heading time in the first year (Table 2). Both populations had an average 47.5% plant heading percentage (A: 49.2 %, B: 45.8 %) and average 2892 GDD accumulation (A: 2874 GDD, B: 2909 GDD) at plant heading in the first year. The number of spikes per plant was very similar for both populations (A: 23.3, B: 22.5). Heading was not recorded in the second year.

TABLE 2. Percentage of the sum of squares of each effect over the total sum of the sources of variation from the analysis of variance of the effect of Kernza population (A vs B), N rate (0, 80, 160 Kg N ha⁻¹), harvest season (summer, fall and winter) and their respective interactions on grain yield, forage yield, weeds biomass, harvest index, forage/weed biomass ratio, for each year (1st and 2nd) of the experiment, and plant heading, heading time, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), crude protein (CP) and relative feed value (RFV) for the first year of the experiment in Paysandu, Uruguay.

Item	Year	Source of variance						
		Population (P)	Nitrogen (N)	Harvest season (HS)	P×N	P×HS	N×HS	P×N×HS
Grain yield	1	2.26	-	-	-	-	-	-
	2	15.57*	11.96	-	3.00	-	-	-
Forage yield	1	1.21**	-	85.46**	-	0.80*	-	-
	2	0.52	2.44*	74.77**	0.70	1.55*	1.90*	0.27
Weed biomass	1	3.90	-	32.2**	-	0.16	-	-
	2	0.91	0.88	40.78**	0.15	1.60	2.36	0.25
Harvest index	1	0.02	-	-	-	-	-	-
	2	11.8*	7.68	-	1.97	-	-	-
Forage/weed biomass ratio	1	5.70**	-	12.57**	-	11.34**	-	-
	2	0.55	2.71	1.07	0.64	2.33	2.94	5.02
Plant heading	1	a	-	-	-	-	-	-
Heading time	1	3.46	-	-	-	-	-	-
NDF	1	3.49 ⁻³	-	87.15**	-	0.31	-	-
ADF	1	2.95 ⁻⁴	-	84.71**	-	0.34	-	-
CP	1	0.40	-	89.50**	-	0.09	-	-
RFV	1	0.01	-	86.56**	-	0.38	-	-

Note: *= Significant at $p < 0.05$, **= Significant at $p < 0.01$.

^adeviance analysis was carried out for plant heading ($p = 0.40$) using the GLIMMIX procedure in SAS 9.4.

Abbreviations: ADF, acid detergent fiber; CP, crude protein; NDF, neutral detergent fiber; RFV, relative feed value.

Kernza grain yield in the first year averaged $316 \pm 29 \text{ kg ha}^{-1}$, and it was not different between Kernza populations ($p = 0.38$). In the second year an 87% reduction in grain yield occurred on average. No population-by-N rate interaction ($p = 0.53$) was detected, however, both effects population ($p < 0.05$) and N rate ($p = 0.09$) affected grain yield in the second year (Table 2). Population A had three times the grain yield in the second year than population B (Figure 4). Grain yield in second year ranged from 23 kg ha^{-1} without N, 37 kg ha^{-1} with N80 and 63 kg ha^{-1} with N160.

As with grain yield, the harvest index in the first year was not affected by the Kernza population ($p = 0.95$). In the second year the population had an effect on harvest index ($p < 0.05$), but not the N rate ($p = 0.20$) or their interaction ($p = 0.54$, Table 2). Population A had a higher harvest index in the second year (Figure 4).

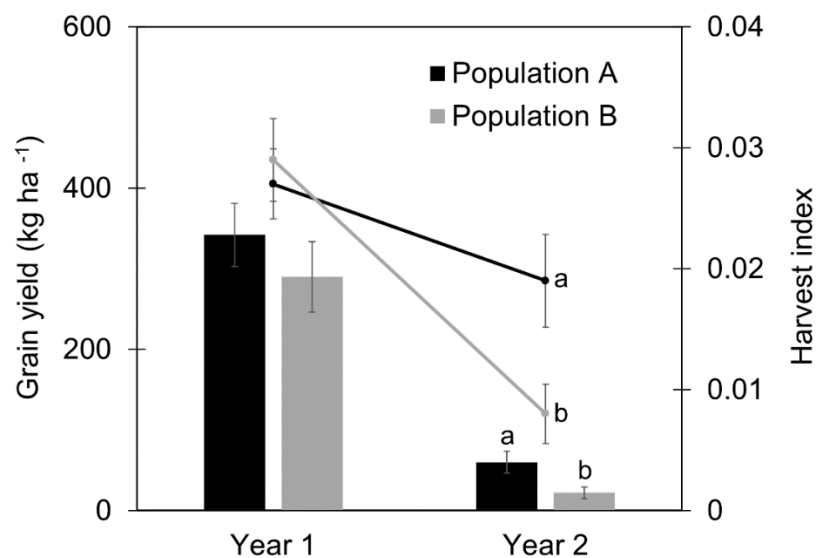


FIGURE 4 Grain yield (bars) and harvest index (lines) for the Kernza populations A (black) and B (grey) from the two first years of Kernza intermediate wheatgrass managed for dual-use (forage harvest in the fall and winter, grain and forage harvest in the summer) in Paysandu Uruguay. Means with the same letter within each parameter and for each year are not different at $p = 0.05$.

3.4.3. Forage yield and nutritive value

Population ($p < 0.01$), harvest season ($p < 0.01$) and population-by-harvest season interaction ($p < 0.05$) effects were detected on forage yield in the first year (Table 2). During the first year, population A accumulated more forage in the summer than population B (Figure 5). In contrast, average forage accumulation in both fall ($2043 \pm 167 \text{ kg ha}^{-1}$) and winter ($1356 \pm 116 \text{ kg ha}^{-1}$) was lower than summer and no differences were detected between populations (Figure 5). For the second year, as in the first year, population A accumulated more forage than population B in the summer, but not in the following seasons (Figure 5).

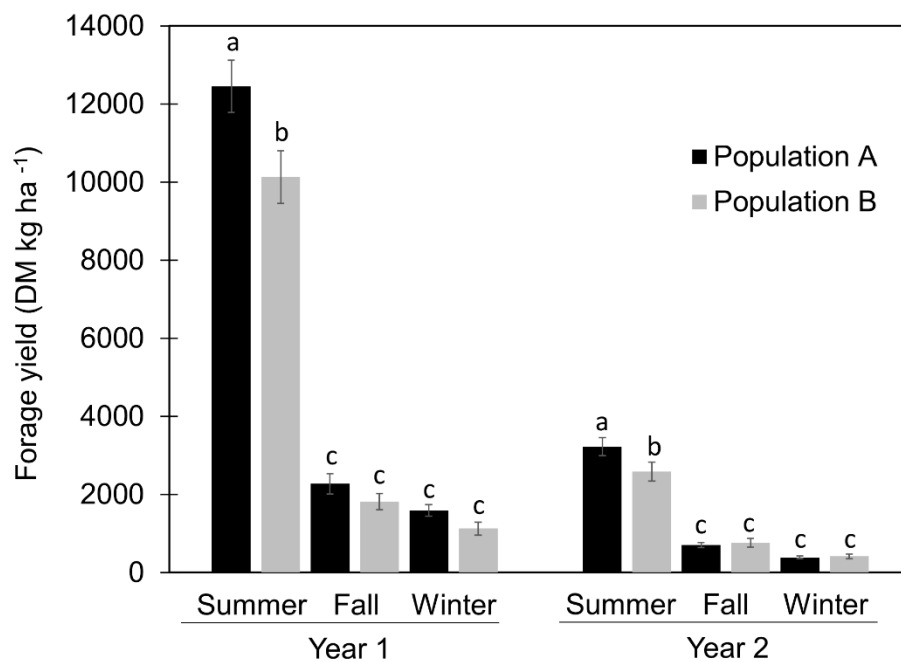


FIGURE 5 Forage yield for the Kernza populations A (black bars) and B (grey bars) in each of the harvests throughout the experiment in Paysandu, Uruguay. For the second-year there was a N rate by harvest season interaction, but means averaged over N rates are shown. Means with same letters within each year are not different at $p=0.05$.

In the second-year, N rate ($p < 0.05$), harvest season ($p < 0.01$), population-by-harvest season interaction ($p < 0.05$) and N rate-by-harvest season interaction ($p <$

0.05) affected forage yield (Table 2). N160 produced more forage than the treatment with no N (1626 vs 1173 DM kg ha⁻¹), whereas N80 (1237 DM kg ha⁻¹) did not differ from either N0 or N160 across populations and harvest seasons. The N160 treatment produced the most forage in the summer compared to the other N rates, but no differences in forage production were observed among N rates during fall or winter (Figure 6). Forage production decreased from summer to fall and winter, and no significant differences were detected between these in the last harvest season.

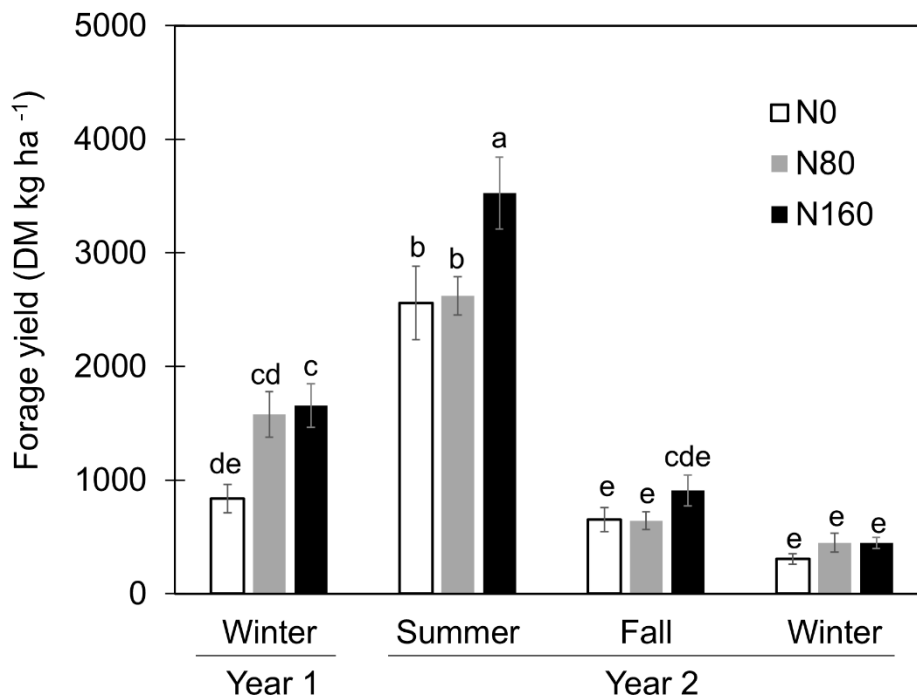


FIGURE 6. Forage yield for summer, fall and winter harvest, across Kernza populations in response to N rate (N0: white bars, N80: grey bars, N160: black bars) in Paysandu, Uruguay. Analysis of variance was performed for four seasons (winter 2019 and summer, fall and winter 2020). Different letters indicate significant differences among N rates and harvest seasons at $p = 0.05$.

No population-by-harvest season interaction nor population effects were detected on any forage quality parameters. Harvest season affected ($p < 0.01$) all of them (Table 2). Forage quality increased from summer to winter, i.e. NDF and ADF

were greatest in the summer, intermediate in the fall, and lowest in the winter, on the contrary, CP and RFV were lowest in the summer, intermediate in the fall and, greatest in the winter (Table 3).

TABLE 3. Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), crude protein (CP) and relative feed value (RFV) of first-year Kernza intermediate wheatgrass managed for dual-use (forage harvest in the fall and winter, grain and forage in the summer) in Paysandu, Uruguay

Parameter	Harvest season		
	Summer	Fall	Winter
NDF (g kg ⁻¹ DM)	706 ±0.4 a	663± 0.3 b	561± 0.4 c
ADF (g kg ⁻¹ DM)	430± 0.5 a	352± 0.3 b	305± 0.5 c
CP (g kg ⁻¹ DM)	82± 0.3 c	142± 0.2 b	197± 0.3 a
RFV	73± 0.9 c	86± 0.7 b	109± 1.2 a

Values are present as mean±standard error. Means were calculated over two populations (A and B); means with the same letter within each parameter are not different at $p = 0.05$.

3.4.4. Weed biomass

For the first year, weed biomass was very low in summer, high in fall and intermediate in winter, and for the second year it was high in summer and lower in both fall and winter harvest seasons (Figure 7). Weed biomass accumulation doubled in the second year in relation to the first year and this increase was mainly explained by the weed invasion that occurred by the second summer (Figure 7). Annual ryegrass and white clover from the previous pasture were the predominant weeds in both years. However, the ryegrass/white clover ratio increased sharply for the second year as well as the presence of some perennial grasses such as dallisgrass. Since the first harvest (summer 2019), forage/weed biomass ratio decreased and remained low during the successive cuts (Figure 7). Population ($p < 0.01$), harvest season ($p < 0.01$) and population -by-harvest season interaction ($p < 0.01$) effects were detected on

forage/weed biomass ratio during the first year (Table 2). Instead, no effect of the treatments evaluated was detected in the second year. For the first year, population A had a much higher forage/weed biomass ratio than population B (1582 vs 48) at summer only. Also, this ratio was lower in both fall and winter (Figure 7). In both years, only harvest season ($p < 0.01$) affected weed production (Table 2).

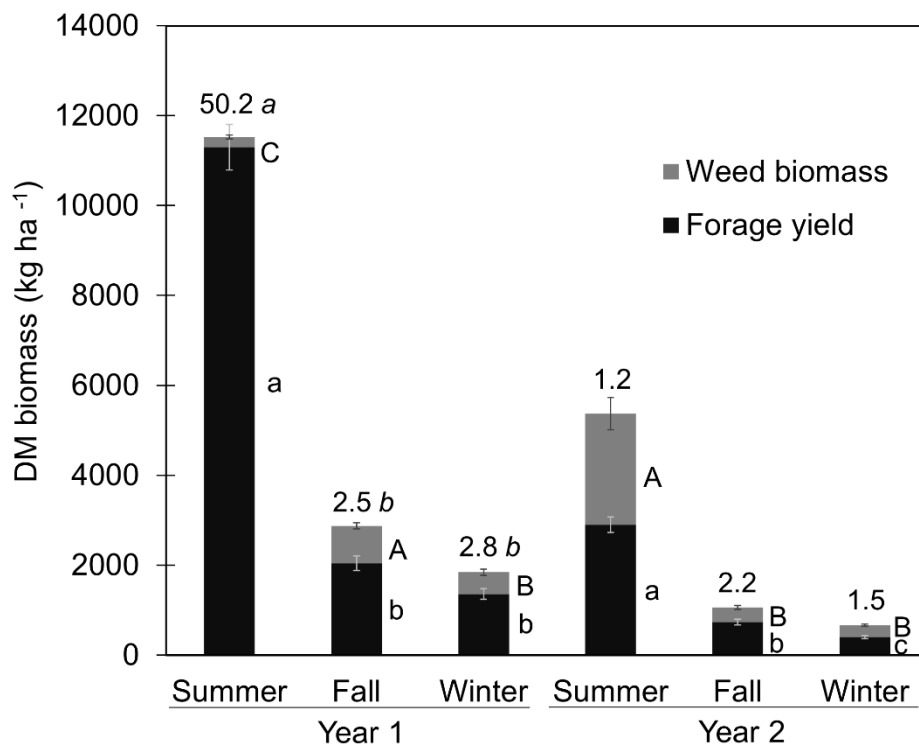


FIGURE 7. Forage yield (black bars), weed biomass (grey bars) and forage/weed biomass ratio (values placed on top of each joint bar) for each harvest season throughout the experiment. Forage yield, weed biomass, and forage/weed biomass ratio with the same letter within each year are not different at $p = 0.05$. Within each year, italics, capital and lower-case letters correspond to forage/weed biomass ratio, weed biomass and forage yield, respectively.

3.5. DISCUSSION

3.5.1. Population effects on agronomic performance

Our first hypothesis was rejected: the population from seed harvested from plants that completed their life cycle during one spring-summer-fall period (population B) did not have superior agronomic performance for any of the traits evaluated. Several non-contradictory mechanisms can explain this surprising finding, and may serve as hypothesis to test in future studies: a) lack of response to selection due to genetic mechanisms, b) experimental conditions providing enough vernalization stimuli, c) seed quality (small seeds) masking genetic differences, d) photoperiod (short days) as substitute for vernalization stimuli in *Kernza*. These potential mechanisms are discussed next.

Although the environmental conditions in Wisconsin where selection was performed to obtain the population B were adequate for the purpose of obtaining germplasm with lower vernalization requirements (i.e., there was no cold accumulation during spring-summer-fall to fulfill vernalization), population B differed from population A by only one selection cycle. Although the genetic basis for the response to vernalization is still unknown in *Kernza*, in annual wheat (genetically close to *Kernza*) there is allelic diversity and/or different number of gene copies in the main group of genes involved in vernalization requirements (*VRN1*, *VRN2*, *VRN3* and *VRN4*), which strongly modifies both flowering ability and time to flowering (Goncharov, 2004; Diaz et al., 2012; Hyles et al., 2020; Kippes et al., 2018; Li et al., 2013). Therefore, the possible high genetic diversity associated with vernalization requirements in addition to the polyploidy present in *Kernza*, could be key factors in explaining the lack of progress in agronomic adaptation expected for population B with a single selection cycle. However, population B was not grown in Wisconsin and further studies are needed to confirm this.

Additionally, the cold stimuli for vernalization where the seed of population B was produced was more restrictive than what was offered in this experiment. In Wisconsin the plants that formed population B underwent high and rising temperatures

from emergence to plant heading (month temperature averages: May 13°C, June 20°C, July 21°C, August 19°C, September 17°C). Although these plants were probably able to accumulate a few hours of vernalizing nocturnal temperatures without experiencing devernalization since the contrast with diurnal temperatures is not as strong under field conditions (Preston & Fjellheim, 2022), such accumulation was poor. In contrast, in Paysandu (Uruguay) the populations underwent a winter with lower temperatures (June 10.2°C, July 10.3°C, August 11.1°C). Therefore, considering the variability in flowering and grain yield components shown in Kernza in response to different vernalizing stimuli in greenhouse studies (Ivancic et al., 2019; Locatelli et al., 2022b), under Paysandu conditions, part of the germplasm of population A could have fulfilled vernalization requirements.

Contrary to our expectations, population A had higher forage yield accumulation in the summer of both years (Figure 5), possibly explained by its higher initial seed weight. We observed that the seedlings of population A had a noticeably larger size than population B at transplant (visual observation but no experimental measures). The effects of seed size on plant growth have been studied mostly in annual species but also in perennials, though no consensus has been reached yet. While some research reports that large seeds promote higher rates of seedling growth (Arnott, 1969; Bretagnolle et al., 1995; Glewen & Vogel, 1984; Kosiński, 2008; Leger et al., 2019; Peterson et al., 1989; Smith et al., 2003; Thomas, 1966; Trupp & Carlson, 1971), other research highlights the limited effect of large seeds which is quickly lost (Beveridge and Wilsie, 1959; Lewis & Garcia, 1979; Naylor, 1980; Smart & Mosser, 1999). As in other perennial crops, there is controversy about the effects of seed size on seedling growth in Kernza as well (Cattani & Asselin, 2022; Hunt and Miller, 1965), and there are no studies on the effects of seed size on the growth and development of adult plants. However, for annual species, there is evidence that seed size had effects after the seedling stage, affecting grain yields (Baalbaki & Copeland, 1997; Burris et al., 1973; Gan & Stobbe, 1995; Kumar & Seth, 2004; Mian & Nafizger, 1992; Stobbe et al., 2008; Stougaard & Xue, 2005). Because most of the studies conducted on the issue, compared different seed sizes between pots or plots but not intra-pot or intra-plot and that the weed control was strict, it was expected that early growth was related to seed

size, but as intraspecific competition increase, average plant yield was determined by density within the stand rather than by seed size (Harper & Obeid, 1967; Stanton, 1984). In our work similar to what has been reported in natural populations (Ehrlén & Lehtila 2002; Leishman & Westoby 1994; Leishman et al. 1995; Rees 1996), intra plot competition occurred between *Kernza* plants and other species (no weed control), so the advantages of large seeds could be seen well beyond the seedling stage.

Although the population effect was not significant for the second year on forage production, significant effect of the population-by-harvest season interaction was detected (Table 2). Population A had higher forage production in the summer than population B, and no population differences were detected in subsequent fall and winter harvests (Figure 5). With the hypothesis that the larger seed size of population A resulted in more vigorous plants and greater ability to compete with weeds during the first year, it is logical to assume that for the second-year part of these strengths already generated will be maintained at least in the periods of greater forage accumulation (summer). Although initial vigor was not measured, the higher forage/weed biomass ratio of the population with higher seed weight (A) during the first year, could indicate the positive effect of seed size in the early stages of development on plant stand.

Our second hypothesis was not rejected: *Kernza* grown in low latitudes had similar forage yield and nutritive value than *Kernza* grown in higher latitudes, but lower grain yields. Grain yields were below the ones usually observed in the higher latitudes of the northern hemisphere (Figure 4), which was expected. This experiment was the first time that this species was evaluated in a region with mild winters, which suggests the low degree of agronomic adaptation for the germplasm used. Indeed, due to the vernalization requirements for primary induction of the populations used, initially grown in northern regions (between 4 and 5°C for 7 weeks as a putative optimal; Ivancic et al., 2021; Locatelli et al., 2022b; Duchene et al., 2021), heading was strongly reduced with only 47.5% of the plants reached flowering in the first year. However, considering that the grain yields in the first year was generated by less than half of the plants in the stand, it can be inferred that the yield per plant of the plants which produced grain, was similar to that observed in the northern hemisphere. Such

observation underlines that the populations considered are highly diverse (Jensen et al., 2016b; Zhang et al., 2016) and could adapt quickly to a novel environment as it was shown previously (Cattani & Asselin, 2018). In our situation, the fact that 47.5% flowering was observed in the first year could suggest a partial control of primary induction by short days, which has already been observed in other perennial grasses (Heide, 1994). A regular long day induction in spring can also be considered but seems less likely as it is essentially found with annual species (Heide, 1994). The average daylength during the winter months is between 10.1 and 11 h (Table S2) and can be considered as “short day”. Such putative short day induction could be reinforced by further use of Kernza in low-latitudes regions or by specific breeding programs in order to get populations that don’t rely on cold temperature to induce fertile tillers primordia, like smooth brome (*Bromus inermis* Leyss) (Heide, 1984). On the other hand, another factor that could be explaining the low flowering percentage is the supply of long days needed for secondary induction. For cool season perennial grasses the critical photoperiods for secondary induction can vary from 9 to 10 h in Mediterranean ecotypes to more than 16 h (Heide, 1994). Although the photoperiod in the inductive months (August, September, October, November) in Uruguay ranges from 11 to 14 h (Table S1), part of the germplasm evaluated could have higher long-day requirements. In addition, the degree to which primary induction requirements have been completed may be modifying the demands of secondary induction requirements, i.e., the more complete the primary induction process, the fewer long-day cycles may be required in secondary induction (Evans, 1964; Heide, 1994). This said, the interactions between vernalization, cold-temperature tolerance, photoperiod, flowering and yields remain largely unclear (Fowler et al., 1996; Jokela et al., 2015; Limin & Fowler, 2006; Seppänen et al., 2013) and claim for continuous and progressive evaluation of new ecotypes in fields, rather than designing new breeding programs decontextualized and based on simplified factors.

3.5.2. Weed competition and yield decline

Grain yields for the second year decreased, consistent with what was reported by several authors (Hunter et al., 2020b; Law et al., 2021). In our experiment the yield reduction was very steep, which might be explained by the weed competition (Figure 7). Annual ryegrass was the dominant weed, which has a short life cycle. The large seed bank in the soil (seeds produced before the first-year grain harvest) and the large interval between forage and grain harvests, can account for this weed increase. The timing of forage harvests affects annual ryegrass seed production which has a strong impact on subsequent weed invasion (Piltz et al., 2021). Furthermore, the abundance of this weed can also be increased by their short life cycle because it can complete their life cycle between two consecutive mowings or forage harvests (Meiss et al., 2010). Assuming a base temperature of 0°C, the total phenological cycle (emergence - physiological maturity) of annual ryegrass can be reached between 750 and 1000 GDD (Cousens, 1996). Therefore, from the first winter forage harvest (July 2019), all ryegrass seeds in the soil accumulated before harvest of Kernza grain in the first year, could complete their cycle by October or November, well ahead of the second Kernza grain harvest. In summary, by the second year grain harvest, the accumulation of annual ryegrass biomass was very noticeable (Figure 7). Additionally, in the second year an increase in the presence of perennial species was observed, which was led by dallisgrass, a warm-season grass native to temperate grasslands in southern South America (Speranza, 2009). This is consistent with what was reported by Zimbric et al. (2020). Thereby, our fourth hypothesis was rejected: weed biomass in the dual-purpose system carried out in this experiment, increase over time.

Another factor that could explain the deep drop in grain yield in the second year is the mean temperature during the winter months (June, July and August), whose records for the second year (14.7, 11.2 and 11.7°C) were well above the ones for the first year (10.2, 10.3 and 11.1°C) (Table S2), which resulted in lower accumulation of UPVT from lower accumulation of VU for the second grain harvest (Table 1). The lower VU accumulated in the second year could have led to both lower plant heading percentages and lower number of fertile stems, thus contributed to the decrease in grain

yield. In this study, the accumulation of VU for the second year (29), were lower than the optimum reported by Locatelli et al. (2022b) working under controlled conditions (49) and 10 h, by Duchene et al. (2021) under field conditions in Europe (71) or the minimum VU needed reported by Jungers et al. (2022) to produce grain in field experiments in North America (78). This lower VU accumulation in the second year may have resulted in increases in demand requirements during secondary induction and thus delayed harvest

3.5.3. Forage yield

Forage yield accumulation for the first year was high in the summer (Figure 5), which is explained by the long forage accumulation period between transplanting (May 2018) until the first harvest (January 2019). The interaction observed between population and harvest season is explained by this first summer forage accumulation, which was greater for population A, while no population differences were found in the fall or winter cuts (Figure 5).

Contrary to what has been mostly reported in previous literature (Culman et al., 2013; Fernandez et al., 2020; Hunter et al., 2020a; Law et al., 2020; Pugliese, 2017), forage yield in the second year decreased strongly (Figure 5). As for grain yield, the increase in weeds by the second summer also negatively affected forage production. In addition to the timing, the intensity of forage harvesting can also have a strong effect on weed establishment. Although severe forage cuts can be a powerful strategy to remove flower heads from some weeds in spring, during summer and/or fall this could provide an opportunity for new weeds to establish in pastures (Bourdôt et al., 2007; Ghanizadeh & Harrington, 2019). Indeed, the stubble height after forage cuts performed in this experiment (2.5 cm), could be excessively low, causing lower regrowth rates and thus promoting the proliferation and competitiveness of weeds. Reducing the height of defoliation below 5 cm strongly increased the proportion of dead roots of perennial grass species, such as perennial ryegrass, orchardgrass, and timothy (*Phleum pratense* L.) (Evans, 1973). For perennial ryegrass, a stubble height from 4 to 8 cm instead of more severe cuts, optimizes its persistence and productivity

by allowing more rapid replenishment of water-soluble carbohydrate reserves which will be allocated to maintain a more active root system and promote tillering (Donaghy & Fulkerson, 1998; Lee et al., 2008). Despite the negative impact that weeds may have had on this experiment, the cumulative forage production of Kernza on the first two years (19 320 kg DM ha⁻¹) was similar to the average forage production of modern perennial cool-season grass cultivars evaluated in the same years with an annual nitrogen fertilization of about 100 kg ha⁻¹; indeed, it was higher than orchardgrass (15 755 kg DM ha⁻¹) and lower than Tall fescue (22 344 kg DM ha⁻¹; INIA-INASE, 2022).

3.5.4. Harvest index

Harvest index had a similar pattern than grain yield. For the first year no effect of population was detected, but for the second year, population A was higher (Figure 4). Values for this trait in the northern hemisphere have ranged from 0.04 to 0.11 for the first year and from 0.02 to 0.16 for the second year with similar germplasm (Cattani & Asselin, 2018; Frahm et al., 2018; Olugbenle et al., 2021). Forage production declined in the second year which could suggest that the steep reduction in the harvest index was due to resource constraints. However, Kernza grain yield declines with stand age have not been previously attributed to resource limitation, because total biomass production remains constant or increases with age (Law et al., 2021). In our experiment, both the lower supply of cold and the heavy weed invasion detected months before the second-year grain harvest, were the main factors behind the strong reduction in the harvest index in the second year. In addition, the increase in weeds could further reduce light penetration which is one of the main factors reported that could explain the reduction in grain yield and harvest index in Kernza as stand age increases (Hunter et al., 2020b).

3.5.5. Nutritional parameters

The nutritional value of Kernza was similar to that reported in other latitudes for the same phenological stages. Since the geographical area in which the experiment

was conducted has adequate climatic conditions for Kernza to maintain active growth during the winter (no soil freezing), forage harvesting is possible during winter. The highest nutritional values of forage in the northern hemisphere correspond to early spring harvests, when the plants have not yet reached stem elongation, while in low latitude regions the plants remain in tillering throughout the winter (June, July, August) and do not reach stem elongation until spring (September, October). Therefore, the winter nutritional values observed closely resemble those in the northern hemisphere for spring harvest with around 201–225 g kg⁻¹ CP, 456–504 g kg⁻¹ NDF and 249–299 g kg⁻¹ ADF (Barriball, 2020; Favre et al., 2019; Jensen et al., 2016b; Pinto et al., 2021a). At grain harvest a sharp decline in nutritional values was observed (Table 3). This drop has also been reported in the northern hemisphere, with values around 49–100 g kg⁻¹ CP, 702–828 g kg⁻¹ NDF and 427–501 g kg⁻¹ ADF (Barriball, 2020; Favre et al., 2019; Jensen et al., 2016b; Nelson et al., 1989; Pinto et al., 2021a). Nutritional values of the fall regrowth were intermediate, in agreement with those reported in the northern hemisphere; 100–119 g kg⁻¹ CP, 575–590 g kg⁻¹ NDF and 316–337 g kg⁻¹ ADF (Coleman et al., 2010; Favre et al., 2019). With respect to RFV, our values are very similar to those in the northern hemisphere for summer harvest (57–75) and somewhat below those for fall (100–107) and spring (120–161) (Hunter et al., 2020b; Pinto et al., 2021a). The cause of these differences could be the cutting height: while we cut the forage at 2.5 cm from the ground, the other experiments made the cuts at approximately 7.5 cm, excluding the lower proportion of lignocellulosic tissue with lower nutritional value.

For most of the nutritional parameters, Kernza intermediate wheatgrass values were within the same range as what was reported for other cool-season grasses. Tall fescue, orchardgrass and canarygrass (*Phalaris* sp. L.) had mean nutritional values during fall and winter around 128–170 g kg⁻¹, 464–622 g kg⁻¹, 283–344 g kg⁻¹, and summer harvest residue values around 84–102 g kg⁻¹, 650–705 g kg⁻¹, 366–390 g kg⁻¹ for CP, NDF, and ADF respectively (NRC, 2000). Orchardgrass and tall fescue evaluated in the same region as our experiment had higher nutritional value in summer, and similar fall and winter nutritional values than Kernza (Mieres et al., 2004). Kernza forage harvested in winter was more nutritious than Orchardgrass (157 g kg⁻¹ CP, 555

g kg⁻¹ NDF, 381 g kg⁻¹ ADF), while tall fescue had lower values for NDF (393 g kg⁻¹) and ADF (254 g kg⁻¹) but similar to Kernza for CP (219 g kg⁻¹) at this season (Mieres et al., 2004).

3.5.6. Nitrogen fertilization

Our third hypothesis was not rejected: N fertilization increased grain and forage yields. Grain yield responded to the higher N rate (N160), which is above the 61 -96 kg N ha⁻¹ observed by Jungers et al. (2017). The detection of response to higher rates of N could be due to the high weed invasion observed in the second year, which competed for N with the Kernza plants. The N split applications (in fall and winter) could also explain the response in grain yields at a higher application rate than observed in Jungers et al. (2017), where N was applied once in spring. Application of all N once at spikelet initiation resulted in higher seed yields than splitting N in the fall and spring in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) (Hampton, 1986). Also, the split application of N was not better than application of all N at double ridge or spikelet initiation in Chewing's fescue (*Festuca rubra* L. ssp. *Fallax* (Thuill) Nyman), tall fescue (*Schedonorus arundinaceus* (Schreb.) Dumort., nom. cons.) and orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) (Young et al., 1999).

Although in this study, yield responses to N rates were only measured for the winter of the first year and throughout the second year (summer, fall, winter), forage yield response was observed with the highest N rate (160), which is consistent with Fernandez et al. (2020) results for a two-year Kernza stand, of a linear increase in forage production with the addition of N up to 80 kg ha⁻¹. Jungers et al. (2017) found a quadratic relationship between biomass yield and N rates, with an agronomically optimum nitrogen rate ranging from 81 to 121 kg N ha⁻¹. It is actually from the second year onwards when greater effects of N on productive parameters are expected, because as stands age, root biomass increases and therefore its capacity to intake nutrients such as N increases (Pugliese et al., 2019). The detection of the N rate-by-harvest season interaction can be explained by the differential growth of the plants in each season: no differences in forage production were detected with N addition in fall

or winter, when low biomass was observed overall due to vegetative stage, but the N addition rate of 160 kg ha⁻¹ increased forage production in summer, when biomass accumulation was higher overall due to reproductive stage (Figure 6). This experiment was done in only one location, so more research in other locations and years is needed to further understand the interaction between nitrogen fertilization, weather conditions, and weed invasion on Kernza yields

3.6. CONCLUSIONS

Kernza low grain yields and the low plant heading percentage highlights the necessity to make further efforts to obtain germplasm with truly lower vernalization requirements in order to expand this promising grain to lower latitudes. Germplasm more adapted to low latitudes is currently being developed (A. Locatelli, unpublished). Kernza intermediate wheatgrass forage productivity and nutritional quality are comparable to other cool-season forage species adapted to low latitudes. Nitrogen fertilization has demonstrated to be a key management factor to achieve better results in both forage and grain production, but the precise timing and number of applications should be given more research attention. The development of weed management strategies also emerges as a major issue for the agronomic development of this crop in this region. Unlike in high latitudes, in low latitudes Kernza maintains an active growth throughout the winter increasing the possibilities of forage harvest, thus the management of defoliation and its interaction with nitrogen fertilization and weeds management emerge as key research questions for the development of this crop under a dual-purpose system.

3.7. REFERENCES

Amanullah, Khattak, R. A., & Khalil, S. K. (2009). Plant density and nitrogen effects on maize phenology and grain yield. *Journal of plant nutrition*, 32(2), 246-260. <https://doi.org/10.1080/01904160802592714>

- Arnott, R. A. (1969). The effect of seed weight and depth of sowing on the emergence and early seedling growth of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Grass and Forage Science*, 24(2), 104-110. <https://doi.org/10.1080/00288230709510288>
- Baalbaki, R. Z., & Coopeland, L. O. (1997). Seed size density and protein content effect on field performance of wheat. *Seed Science Technology*, 25, 511-521.
- Bajgain, P., Zhang, X., Jungers, J. M., DeHaan, L. R., Heim, B., Sheaffer, C. C., & Anderson, J. A. (2020). ‘MN-Clearwater’, the first food-grade intermediate wheatgrass (*Kernza* perennial grain) cultivar. *Journal of Plant Registrations*, 14(3), 288-297. <https://doi.org/10.1002/plr2.20042>
- Barriball, S. (2020). Growth, development, and forage quality of Intermediate wheatgrass when grown for Kernza® perennial grain production. (Master thesis, Iowa: Iowa State University). Iowa State University Digital Repository. <https://lib.dr.iastate.edu/creativecomponents/628>
- Beveridge, J. L., & Wilsie, C. P. (1959). Influence of depth of planting, seed size, and variety on emergence and seedling vigor in alfalfa 1. *Agronomy Journal*, 51(12), 731-734. <https://doi.org/10.2134/agronj1959.00021962005100120011x>
- Bell, L. W., Byrne, F., Ewing, M. A., & Wade L. J. (2008). A preliminary whole-farm economic analysis of perennial wheat in an Australian dryland farming system. *Agricultural Systems* 96, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2007.07.007>
- Bourdôt, G. W., Fowler, S. V., Edwards, G. R., Kriticos, D. J., Kean, J. M., Rahman, A., & Parsons, A. J. (2007). Pastoral weeds in New Zealand: Status and potential solutions. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50(2), 139–161. <https://doi.org/10.1080/00288230709510288>
- Bretagnolle, F., Thompson, J. D., & Lumaret, R. (1995). The influence of seed variation on seed germination and seedling vigour in diploid and tetraploid *Dactylis glomerata* L. *Annals of Botany*, 76, 607-615. <https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1138>
- Brisson, N., Mary, B., Ripoche, D., Jeuffroy, M. H., Ruget, F., Nicoullaud, B., Gate, P., Devienne-Barret, F., Antonioletti, R., Dürr, C., Richard, G., Beaudoin, N., Recous, S., Tayot, X., Plenet, D., Cellier, P., Machet, J. M.M., Meynard, J. M. J. M., & Delécolle, R. (1998). STICS: A generic model for the simulation of

- crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. *Agronomie*, 18(5-6), 311-346. <https://doi.org/10.1051/agro:19980501>
- Brisson, N., Ruget, F., Gate, P., Lorgeou, J., Nicoullaud, B., Tayot, X., Plenet, D., Jeuffroy, M.-H., Bouthier, A., Ripoche, D., Mary, B., & Justes, E. (2002). STICS: A generic model for simulating crops and their water and nitrogen balances. II. Model validation for wheat and maize. *Agronomie*, 22(1), 69-92. <https://doi.org/10.1051/agro:2001005>
- Brisson, N., Launay, M., Mary, B., Beaudoin, N. & (2008). *Conceptual basis, formalisations and parameterization of the STICS crop model*. Éditions Quae, c/o INRA.
- Burris, J. S., Edje, O. T., & Wahab, A. H. (1973). Effects of seed size on seedling performance in soybeans: II. Seedling growth and photosynthesis and field performance 1. *Crop Science*, 13(2), 207-210. <https://doi.org/10.2134/agronj1975.00021962006700050025x>
- Cattani, D.J., & Asselin, S.R. (2018). Extending the growing season: Forage seed production and perennial grains. *Canadian Journal of Plant Science*, 98, 235–246. <https://doi.org/10.1139/cjps-2017-0212>
- Cattani, D. J., & Asselin, S. R. (2022). Early plant development in intermediate wheatgrass. *Agriculture*, 12(7), 915. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070915>
- Chastain, T. G., & Young, W. C. (1998). Vegetative plant development and seed production in cool-season perennial grasses. *Seed Science Research*, 8(2), 295–301. <https://doi.org/10.1017/s0960258500004190>
- Coleman, S.W., Rao, S.C., Volesky, J.D., & Phillips, W.A. (2010). Growth and nutritive value of perennial C₃ grasses in the southern Great Plains. *Crop Science*, 50, 1070–1078. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.04.0177>
- Cousens, R. D. (1996). Comparative growth of wheat, barley and annual ryegrass (*Lolium rigidum*) in monoculture and mixture. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47, 449–464. <https://doi.org/10.1071/AR9960449>

- Culman, S. W., Snapp, S. S., Ollenburger, M. , Basso, B. , & DeHaan, L. R.. (2013). Soil and water quality rapidly responds to the perennial grain Kernza wheatgrass. *Agronomy Journal*, 105, 735–744. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0273>
- DeHaan, L. R., Wang, S., Larson, S., Cattani, D. J., Zhang, X. I., Kantarski, T., ... & Choptiany, J. (2014). Current efforts to develop perennial wheat and domesticate *Thinopyrum intermedium* as a perennial grain. In C. Batello, L. Wade, S. Cox, N. Pogna, & A. Bozzini, J. Choptinay (Eds.). *Perennial Crops for Food Security: Proceedings of the FAO Expert Workshop 28-30 August, 2013, Rome, Italy* (pp. 72-89). FAO.
- DeHaan, L., Christians, M., Crain, J., & Poland, J. (2018). Development and evolution of an intermediate wheatgrass domestication program. *Sustainability*, 10(5), 1499. <https://doi.org/10.3390/su10051499>
- DeHaan, L. (2022, April). The Land Institute Kernza breeding updates. Kernza^R Meeting. The Land Institute, Salina, Kansas. <https://kernza.org/2022-kernza-meeting-recording/>
- Donaghy, D. J., & Fulkerson, W. J. (1998). Priority for allocation of water-soluble carbohydrate reserves during regrowth of *Lolium perenne*. *Grass and Forage Science*, 53(3), 211–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.1998.00129.x>
- Díaz, A., Zikhali, M., Turner, A. S., Isaac, P., & Laurie, D. A. (2012). Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PloS one*, 7(3), e33234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033234>
- Duchene, O., Dumont, B., Cattani, D. J., Fagnant, L., Schlautman, B., DeHaan, L. R., Barriball, S., Jungers, J. M., Picasso, V. D., David, C., & Celette, F. (2021). Process-based analysis of *Thinopyrum intermedium* phenological development highlights the importance of dual induction for reproductive growth and agronomic performance. *Agricultural and Forest Meteorology*, 301, 108341. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108341>
- Ehrlén, J., & Lehtilä, K. (2002). How perennial are perennial plants?. *Oikos*, 98(2), 308-322. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.980212.x>

- Evans, L. T., (1964). Reproduction. In C. Barnard (Ed.), *Grasses and grasslands*. (pp. 126-153). Macmillan.
- Evans, P. S. (1973). The effect of repeated defoliation to three different levels on root growth of five pasture species. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, *16*(1), 31–34. <https://doi.org/10.1080/00288233.1973.10421155>
- Favre, J. R., Castiblanco, T. M., Combs, D. K., Wattiaux, M. A., & Picasso, V. D. (2019). Forage nutritive value and predicted fiber digestibility of Kernza intermediate wheatgrass in monoculture and in mixture with red clover during the first production year. *Animal Feed Science and Technology*, *258*, 114298. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114298>
- Fernandez, C. W., Ehlke, N., Sheaffer, C. C., & Jungers, J. M. (2020). Effects of nitrogen fertilization and planting density on intermediate wheatgrass yield. *Agronomy Journal*, *112*(5), 4159-4170. <https://doi.org/10.1002/agj2.20351>
- Fowler, D. B., Limin, A. E., Wang, S. Y., & Ward, R. W. (1996). Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Canadian Journal of Plant Science*, *76*(1), 37-42. <https://doi.org/10.4141/cjps96-007>
- Frahm, C. S., Tautges, N. E., Jungers, J. M., Ehlke, N. J., Wyse, D. L., & Sheaffer, C. C. (2018). Responses of intermediate wheatgrass to plant growth regulators and nitrogen fertilizer. *Agronomy Journal*, *110*(3), 1028-1035. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.11.0635>
- Franco, J. G., Berti, M. T., Grabber, J. H., Hendrickson, J. R., Nieman, C. C., Pinto, P., Van Tassel, D., & Picasso, V. D. (2021). Ecological intensification of food production by integrating forages. *Agronomy*, *11*(12), 2580. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122580>
- Gan, Y., & Stobbe, E. H. (1995). Effect of variations in seed size and planting depth on emergence, infertile plants, and grain yield of spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, *75*(3), 565-570. <https://doi.org/10.4141/cjps95-098>
- Ghanizadeh, H., & Harrington, K. C. (2019). Weed management in New Zealand pastures. *Agronomy*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy9080448>

- Glewen, K. L., & Vogel, K. P. (1984). Partitioning the genetic variability for seedling growth in sand bluestem into its seed size and seedling vigor components. *Crop Science*, 24(1), 137-141. <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400010032x>
- Goncharov, N. P. (2004). Response to vernalization in wheat: its quantitative or qualitative nature. *Cereal Research Communications*, 32(3), 323-330. <https://doi.org/10.1007/BF03543317>
- Gungula, D. T., Kling, J. G., & Togun, A. O. (2003). CERES-Maize predictions of maize phenology under nitrogen-stressed conditions in Nigeria. *Agronomy Journal*, 95(4), 892-899. <https://doi.org/10.2134/agronj2003.8920>
- Hampton, J. G. (1986). Effect of seed and seed lot 1000-seed weight on vegetative and reproductive yields of 'Grasslands Moata'tetraploid Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). *New Zealand journal of experimental agriculture*, 14(1), 13-18. <https://doi.org/10.1080/03015521.1986.10426118>
- Harper, J. L., & Obeid, M. (1967). Influence of seed size and depth of sowing on the establishment and growth of varieties of fiber and oil seed flax. *Crop Science*, 7(5), 527-532. <https://doi.org/10.2135/cropsci1967.0011183X000700050036x>
- Hayek, J. (2020). *Effect of steam treatment on chemical changes over storage of intermediate wheatgrass (Thinopyrum intermedium) refined, partially refined, and whole flour*. [Master's thesis, University of Minnesota]. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy, <http://hdl.handle.net/11299/214999>
- Heide, O. M. (1994). Control of flowering and reproduction in temperate grasses. *New Phytologist*, 128(2), 347-362. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04019.x>
- Heide, O. M. (1984). Flowering requirements in *Bromus inermis*, a short-long-day plant. *Physiologia Plantarum*, 62(1), 59-64. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb05923.x>
- Hyles, J., Bloomfield, M. T., Hunt, J. R., Trethowan, R. M., & Trevaskis, B. (2020). Phenology and related traits for wheat adaptation. *Heredity*, 125(6), 417-430. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0320-1>

- Horwitz, W., & Latimer, G.W. (Eds.). (2005). *Official methods of analysis of AOAC international* (18th ed.). AOAC International.
- Hoveland, C. S., & Monson, W. G. (1980). Genetic and environmental effects on forage quality. In C. S. Hoveland (Ed.), *Crop quality, storage, and utilization*, (pp. 139-168). ASC, CSSA, SSSA. <https://doi.org/10.2135/1980.cropquality.c6>
- Hunter, M. C., Sheaffer, C. C., Culman, S. W., Lazarus, W. F., & Jungers, J. M. (2020a). Effects of defoliation and row spacing on intermediate wheatgrass II: Forage yield and economics. *Agronomy Journal*, 112(3), 1862-1880. <https://doi.org/10.1002/agj2.20128>
- Hunter, M. C., Sheaffer, C. C., Culman, S. W., & Jungers, J. M. (2020b). Effects of defoliation and row spacing on intermediate wheatgrass I: Grain production. *Agronomy Journal*, 112(3), 1748-1763. <https://doi.org/10.1002/agj2.20128>
- Hunt, O. J., & Miller, D. G. (1965). Coleoptile Length, Seed Size, and Emergence in Intermediate Wheatgrass (*Agropyron intermedium* (Host) Beauv.) 1. *Agronomy Journal*, 57(2), 192-195. <https://doi.org/10.2134/agronj1965.00021962005700020017x>
- INIA-INASE. (2022). Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de especies forrajeras (Período 2021). Unidad de comunicación y transferencia de tecnología. http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_EF/Ano2021/PubForrajerPeriodo2021.pdf
- Ivancic, K., Locatelli, A., Tracy, W. F., & Picasso, V. (2021). Kernza intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) response to a range of vernalization conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, 101(5), 770-773. <https://doi.org/10.1139/cjps-2020-0251>
- Jensen, K. B., Robins, J. G., Rigby, C., & Waldron, B. L. (2016a). Comparative trends in forage nutritional quality across the growing season in 13 grasses. *Canadian Journal of Plant Science*, 97(1), 72-82. <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0328>
- Jensen, K. B., Yan, X., Larson, S. R., Wang, R. R. C., & Robins, J. G. (2016b). Agronomic and genetic diversity in intermediate wheatgrass (*Thinopyrum*

- intermedium*). *Plant Breeding*, 135(6), 751-758.
<https://doi.org/10.1111/pbr.12420>
- Jokela, V., Trevaskis, B., & Seppänen, M. M. (2015). Genetic variation in the flowering and yield formation of timothy (*Phleum pratense* L.) accessions after different photoperiod and vernalization treatments. *Frontiers in Plant Science*, 6, 465. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00465>
- Jungers, J. M., DeHaan, L. R., Betts, K. J., Sheaffer, C. C., & Wyse, D. L. (2017). Intermediate wheatgrass grain and forage yield responses to nitrogen fertilization. *Agronomy Journal*, 109(2), 462-472.
<https://doi.org/10.2134/agronj2016.07.0438>
- Jungers, J.M., C.S. Frahm, N.E. Tautges, N.J. Ehlke, M.S. Wells, D.L. Wyse & C.C. Sheaffer. (2018). Growth, development, and biomass partitioning of the perennial grain crop *Thinopyrum intermedium*. *Annals of Applied Biology*, 172, 346-354. <https://doi.org/10.1111/aab.12425>
- Jungers, J. M., Schiffner, S., Sheaffer, C., Ehlke, N. J., DeHaan, L., Torrion, J., ... & Franco, J. (2022). Effects of seeding date on grain and biomass yield of intermediate wheatgrass. *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.1002/agj2.21083>
- King, A. E., & Blesh, J. (2018). Crop rotations for increased soil carbon: Perenniality as a guiding principle. *Ecological applications*, 28(1), 249-261.
<https://doi.org/10.1002/eap.1648>
- Kippes, N., Guedira, M., Lin, L., Alvarez, M. A., Brown-Guedira, G. L., & Dubcovsky, J. (2018). Single nucleotide polymorphisms in a regulatory site of VRN-A1 first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(5), 1231-1243.
<https://doi.org/10.1007/s00438-018-1455-0>
- Koeritz, E. J., Watkins, E., & Ehlke, N. J. (2013). A split application approach to nitrogen and growth regulator management for perennial ryegrass seed production. *Crop Science*, 53(4), 1762-1777.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2012.08.0505>

- Kosiński, I. (2008). Long-term variability in seed size and seedling establishment of *Maianthemum bifolium*. *Plant Ecology*, 194(2), 149-156. <https://doi.org/10.1007/s11258-007-9281-1>
- Kumar, D., & Seth, R. (2004). Seed yield response of fodder cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) varieties to varying seed rate and seed size. *Seed Research*, 32, 149-153.
- Lanker, M., Bell, M., & Picasso, V. D. (2019). Farmer perspectives and experiences introducing the novel perennial grain Kernza intermediate wheatgrass in the US Midwest. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 35(6), 653-662. <https://doi.org/10.1017/S1742170519000310>
- Law, E. P., Pelzer, C. J., Wayman, S., DiTommaso, A., & Ryan, M. R. (2021). Strip-tillage renovation of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) for maintaining grain yield in mature stands. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 36(4), 321-327. <https://doi.org/10.1017/S1742170520000368>
- Law, E. P., Wayman, S., Pelzer, C. J., Culman, S. W., Gómez, M. I., DiTommaso, A., & Ryan, M. R. (2022). Multi- criteria assessment of the economic and environmental sustainability characteristics of intermediate wheatgrass grown as a dual- purpose grain and forage crop. *Sustainability*, 14(6), 3548. <https://doi.org/10.3390/su14063548>
- Lee, J. M., Donaghy, D. J., & Roche, J. R. (2008). Effect of defoliation severity on regrowth and nutritive value of perennial ryegrass dominant swards. *Agronomy Journal*, 100(2), 308–314. <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0099>
- Leger, E. A., Atwater, D. Z., & James, J. J. (2019). Seed and seedling traits have strong impacts on establishment of a perennial bunchgrass in invaded semi-arid systems. *Journal of Applied Ecology*, 56(6), 1343-1354. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13367>
- Leishman, M. R., & Westoby, M. (1994). Hypotheses on seed size: Tests using the semiarid flora of western New South Wales, Australia. *The American Naturalist*, 143(5), 890-906. <https://doi.org/10.1086/285638>

- Leishman, M. R., Westoby, M., & Jurado, E. (1995). Correlates of seed size variation: a comparison among five temperate floras. *Journal of ecology*, 517-529. <https://doi.org/10.2307/2261604>
- Lewis, E. J., & Garcia, J. A. (1979). The effect of seed weight and coleoptile tiller development on seedling vigour in tall fescue, *Festuca arundinacea* Schreb. *Euphytica*, 28(2), 393-402. <https://doi.org/10.1007/BF00056597>
- Li, G., Yu, M., Fang, T., Cao, S., Carver, B. F., & Yan, L. (2013). Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by T a VRN-A 1 at the protein level. *The Plant Journal*, 76(5), 742-753. <https://doi.org/10.1111/tpj.12326>
- Limin, A. E., & Fowler, D. B. (2006). Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): Response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta*, 224(2), 360-366. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0219-y>
- Linn, J. G., & Martin, N. P. (1991). Forage quality analyses and interpretation. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 7(2), 509-523. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30790-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30790-8)
- Locatelli, A., Bhatta, M., Gutiérrez, L., Mastandrea, N., Viega, L., & Castro, A. J. (2022a). Genetic control of barley phenology in South American environments. *Euphytica*, 218(5), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10681-022-02993-2>
- Locatelli, A., Gutierrez, L., & Picasso Risso, V. D. (2022b). Vernalization requirements of Kernza™ intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *Crop Science*, 62, 524-535. <https://doi.org/10.1002/csc2.20667>
- Mathiowetz, A. (2018). *Evaluation of the Chemical and Functional Stability of Intermediate Wheatgrass (Thinopyrum intermedium) over Storage and in Response to Steam Treatment* (Doctoral dissertation, University of Minnesota). Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy. <https://hdl.handle.net/11299/202079>.
- McMaster, G. S., & Wilhelm, W. W. (1997). Growing degree-days: One equation, two interpretations. *Agricultural and forest meteorology*, 87(4), 291-300. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(97\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(97)00027-0)

- Meiss, H., Médiène, S., Waldhardt, R., Caneili, J., & Munier-Jolain, N. (2010). Contrasting weed species composition in perennial alfalfas and six annual crops: Implications for integrated weed management. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 657–666. <https://doi.org/10.1051/agro/2009043>
- Mian, A. R., & Nafziger, E. D. (1992). Seed size effects on emergence, head number, and grain yield of winter wheat. *Journal of production Agriculture*, 5(2), 265-268. <https://doi.org/10.2134/jpa1992.0265>
- Mieres, J. M., Assandri, L. & Cúneo, M. (2004). *Guía para la alimentación de rumiantes*. (Serie Técnica 142). INIA. <http://www.inia.uy/publicaciones/documentos%20compartidos/111219240807141556.pdf>
- Modernel, P., Rossing, W. A., Corbeels, M., Dogliotti, S., Picasso, V., & Tiftonell, P. (2016). Land use change and ecosystem service provision in Pampas and Campos grasslands of southern South America. *Environmental Research Letters*, 11(11), 113002. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/11/113002>
- Moore, K. J., Moser, L. E., Vogel, K. P., Waller, S. S., Johnson, B. E., & Pedersen, J. F. (1991). Describing and quantifying growth stages of perennial forage grasses. *Agronomy Journal*, 83(6), 1073-1077. <https://doi.org/10.2134/agronj1991.00021962008300060027x>
- Naylor, R. E. (1980). Effects of seed size and emergence time on subsequent growth of perennial ryegrass. *New Phytologist*, 84(2), 313-318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04431.x>
- National Research Council (NRC). 2000. *Nutrient Requirements of Beef Cattle: Seventh Revised Edition: Update 2000*. The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9791>
- Nelson, C. J., & Moser, L. E. (1994). Plant factors affecting forage quality. In G. C., Fahey Jr (Ed.), *Forage quality, evaluation, and utilization*, (pp. 115-154). ASC, CSSA, SSSA. <https://doi.org/10.2134/1994.foragequality.c3>
- Nelson, M. L., Finley, J. W., Scarnecchia, D. L., & Paris, S. M. (1989). Diet and forage quality of intermediate wheatgrass managed under continuous and short-duration

- grazing. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 42(6), 474-479. <https://doi.org/10.2307/3899231>
- O'Connor, T. (1991). Local extinction in perennial grasslands: A life-history approach. *The American Naturalist*, 137(6), 753-773.
- Osterholz, W. R., Renz, M. J., Jokela, W. E., & Grabber, J. H. (2019). Interseeded alfalfa reduces soil and nutrient runoff losses during and after corn silage production. *Journal of Soil and Water Conservation*, 74(1), 85-90. <https://doi.org/10.2489/jswc.74.1.85>
- Olugbenle, O., Pinto, P., & Picasso, V. D. (2021). Optimal planting date of Kernza intermediate wheatgrass intercropped with red clover. *Agronomy*, 11(11), 2227. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112227>
- Peterson, C. M., Klepper, B., & Rickman, R. W. (1989). Seed reserves and seedling development in winter wheat. *Agronomy Journal*, 81(2), 245-251. <https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100020022x>
- Pimentel, D., Cerasale, D., Stanley, R. C., Perlman, R., Newman, E. M., Brent, L. C., Mullan, A. & Chang, D. T. I. (2012). Annual vs. perennial grain production. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 161, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.05.025>
- Piltz, J. W., Morris, S. G., & Weston, L. A. (2021). Winter forage crop harvest time impacts regeneration of the annual weeds barley grass, annual ryegrass and wild radish. *Agronomy*, 11(9), 1700. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091700>
- Pinto, P., Culman, S., Crews, T., DeHaan, L., Jungers, J., Larsen, J., Maul, J., Pugliese, J., Ryan, M. R., Schipanski, M. E., Sulc, R. M., Wayman, S., Wiedenhoef, M. H., & Picasso, V. D. (2021a) Dual- use Kernza intermediate wheatgrass seasonal forage yield and nutritional value across North America [Abstract]. ASA, CSSA, SSSA International Annual Meeting, Salt Lake City, UT. <https://scisoc.confex.com/scisoc/2021am/meetingapp.cgi/Paper/135198>
- Pinto, P., De Haan, L., & Picasso, V. (2021b). Post-harvest management practices impact on light penetration and kernza intermediate wheatgrass yield components. *Agronomy*, 11(3), 442. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030442>

- Pugliese, J. Y. (2017). *Above-and belowground response to managing Kernza (Thinopyrum intermedium) as a dual-use crop for forage and grain* (Doctoral dissertation, The Ohio State University). <https://docslib.org/doc/8441734/above-and-belowground-response-to-managing-kernza-thinopyrum-intermedium-as-a-dual-use-crop-for-forage-and-grain>
- Pugliese, J. Y., Culman, S. W., & Sprunger, C. D. (2019). Harvesting forage of the perennial grain crop kernza (*Thinopyrum intermedium*) increases root biomass and soil nitrogen cycling. *Plant and Soil*, 437(1), 241-254. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03974-6>
- Preston, J. C., & Fjellheim, S. (2022). Flowering time runs hot and cold. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac111>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Rees, M. (1996). Evolutionary ecology of seed dormancy and seed size. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1345), 1299-1308. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0113>
- Rahardjo, C. P., Gajadeera, C. S., Simsek, S., Annor, G., Schoenfuss, T. C., Marti, A., & Ismail, B. P. (2018). Chemical characterization, functionality, and baking quality of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *Journal of Cereal Science*, 83, 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.09.002>
- Sakiroglu, M., Dong, C., Hall, M. B., Jungers, J., & Picasso, V. (2020). How does nitrogen and forage harvest affect belowground biomass and nonstructural carbohydrates in dual-use Kernza intermediate wheatgrass?. *Crop Science*, 60(5), 2562-2573. <https://doi.org/10.1002/csc2.20239>
- Sanford, G. R. (2014). Perennial grasslands are essential for long term SOC storage in the Mollisols of the North Central USA. In A. Hartemink, & K. McSweeney (Eds.), *Soil carbon* (pp. 281-288). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04084-4_29
- Sanford, G. R., Jackson, R. D., Booth, E. G., Hedtcke, J. L., & Picasso, V. (2021). Perenniality and diversity drive output stability and resilience in a 26-year

- cropping systems experiment. *Field Crops Research*, 263, 108071.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108071>
- SAS Institute. (2004). *Statistical analysis system online documentation*. SAS Institute, Inc.
- Seppänen, M. M., Korhonen, P., Jokela, V., Isoaho, M., & Virkajärvi, P. (2013). The role of vernalization in freezing tolerance and tiller composition of forage grasses. *Proceedings of the 17th Symposium of the European Grassland Federation, Akureyri, Iceland*, 18, 297-299.
https://www.europeangrassland.org/fileadmin/documents/Infos/Printed_Matter/Proceedings/EGF2013.pdf
- Smart, A. J., & Moser, L. E. (1999). Switchgrass seedling development as affected by seed size. *Agronomy Journal*, 91(2), 335-338.
<https://doi.org/10.2134/agronj1999.00021962009100020025x>
- Smith, K. F., McFarlane, N. M., Croft, V. M., Trigg, P. J., & Kearney, G. A. (2003). The effects of ploidy and seed mass on the emergence and early vigour of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43(5), 481-486. <https://doi.org/10.1071/EA01130>
- Speranza, P. R. (2009). Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 282(1), 43-56.
<https://doi.org/10.1007/s00606-009-0205-5>
- Stanton, M. L. (1984). Seed variation in wild radish: effect of seed size on components of seedling and adult fitness. *Ecology*, 65(4), 1105-1112.
<https://doi.org/10.2307/1938318>
- Stobbe, E., Moes, J., Gan, Y., Ngoma, H., & Bourgeca, L. (2008). Seeds, seed vigor and seeding research report. *Department of Plant Science, NDSU Agriculture and University Extension, North Dakota, USA*.
- Stougaard, R. N., & Xue, Q. (2005). Quality versus quantity: spring wheat seed size and seeding rate effects on *Avena fatua* interference, economic returns and economic thresholds. *Weed research*, 45(5), 351-360.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2005.00468.x>

- Tautges, N. E., Jungers, J. M., DeHaan, L. R., Wyse, D. L., & Sheaffer, C. C. (2018). Maintaining grain yields of the perennial cereal intermediate wheatgrass in monoculture v. bi-culture with alfalfa in the Upper Midwestern USA. *The Journal of Agricultural Science*, 156(6), 758-773. <https://doi.org/10.1017/S0021859618000680>
- Thomas, R. L. (1966). The influence of seed weight on seedling vigour in *Lolium perenne*. *Annals of Botany*, 30(1), 111-121. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084052>
- Trupp, C. R., & Carlson, I. T. (1971). Improvement of seedling vigor of smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss.) by recurrent selection for high seed weight. *Crop Science*, 11(2), 225-228. <https://doi.org/10.2135/cropsci1971.0011183X001100020017x>
- Tyl, C., & Ismail, B. P. (2019). Compositional evaluation of perennial wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) breeding populations. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 660-669. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13925>
- Van Soest, P. V., 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(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vogel, K. P., Brejda, J. J., Walters, D. T., & Buxton, D. R. (2002). Switchgrass biomass production in the Midwest USA: Harvest and nitrogen management. *Agronomy Journal*, 94(3), 413-420. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.0413>
- Wagoner, P., & Schauer, A. (1990). Intermediate wheatgrass as a perennial grain crop. In *Advances in new crops. Proceedings of the first national symposium 'New crops: research, development, economics', Indianapolis, Indiana, USA, 23-26 October 1988*. (pp. 143-145). Timber Press.
- Wang, C., & Tang, Y. (2019). Responses of plant phenology to nitrogen addition: A meta-analysis. *Oikos*, 128(9), 1243-1253. <https://doi.org/10.1111/oik.06099>
- Weik, L., Kaul, H. P., Kübler, E., & Aufhammer, W. (2002). Grain yields of perennial grain crops in pure and mixed stands. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188(5), 342-349. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037X.2002.00580.x>

- Young, W. C., Chilcote, D. O., & Youngberg, H. W. (1999). Spring-applied nitrogen and productivity of cool-season grass seed crops. *Agronomy Journal*, *91*(2), 339–343. <https://doi.org/10.2134/agronj1999.00021962009100020026x>
- Zhang, X., Sallam, A., Gao, L., Kantarski, T., Poland, J., DeHaan, L. R., Wyse D. L. & Anderson, J. A. (2016). Establishment and optimization of genomic selection to accelerate the domestication and improvement of intermediate wheatgrass. *The Plant Genome*, *9*(1), plantgenome2015-07. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.07.0059>
- Zimbric, J. W., Stoltenberg, D. E., & Picasso, V. D. (2020). Effective weed suppression in dual-use intermediate wheatgrass systems. *Agronomy Journal*, *112*(3), 2164-2175. <https://doi.org/10.1002/agj2.20194>

4. GENETIC ARCHITECTURE OF GRAIN AND FORAGE YIELD COMPONENT IN INTERMEDIATE WHEATGRASS

Locatelli, A., Gutiérrez, Speranza, P. R., & Picasso Risso, V. D.

Core ideas

- Phenotypic selection in the first year in intermediate wheatgrass will result in higher genetic gains per unit of time than selecting after two years.
- Yield per spike and spikes per plant are the most important traits for improving intermediate wheatgrass grain yield in low latitudes.
- Simultaneous improvement of intermediate wheatgrass grain and forage performance is feasible.

Andrés Locatelli*, Valentín D. Picasso, Pablo R. Speranza and Lucía Gutiérrez

4.1. ABSTRACT

Integrating perennial grain crops into agricultural systems can become a major milestone to increase provision of ecosystem services of food production. Intermediate wheatgrass is a dual-purpose perennial crop (grain and forage) that is undergoing domestication to improve its grain performance. Our goals were to understand the genetic architecture of grain and forage yield components and to quantify potential trade-offs between vegetative and reproductive allocation in Intermediate wheatgrass under a dual-purpose management. Thirty half-sib families were space-planted in the field in a randomized complete block design with three replications. Phenological, grain and forage traits were measured for each plant over two years. Most of the traits had no genotype x stand age interaction, suggesting that selection for traits measured in the first year of production will provide greater genetic progress per unit of time compared to selecting in the second year. Narrow-sense heritability estimates were moderate to high for most traits, so phenotypic selection would be successful in this species. Candidate secondary traits as grain yield per spike and harvest index for use in indirect selection for grain yield per plant were identified. No trade-offs were

detected between traits related to grain and forage yield, indicating that simultaneous improvement of both types of traits is feasible. We conclude that dual-use Intermediate wheatgrass germplasm can effectively be developed by mass selection in the first production year.

4.2. INTRODUCTION

Intermediate wheatgrass [*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth and D.R. Dewey] is one of the most promising dual purpose (grain and forage) perennial grain crops undergoing domestication (DeHaan et al., 2018). Intermediate wheatgrass is a perennial cool-season grass with vernalization requirements to flowering and is generally considered an obligate outcrossing species (Locatelli et al., 2022; Mahelka et al., 2011). As a perennial crop, intermediate wheatgrass also provides many ecosystem services including soil health and water quality improvements, and a high capacity to store carbon in the soil, being a well-suited species to contribute to climate change mitigation (Ashworth et al., 2023; Jungers et al., 2019; Reilly et al., 2022; Sprunger et al., 2019). Despite the ecosystem benefits offered and the high forage quality and production shown (Favre et al., 2019), low intermediate wheatgrass grain yield compared to annual small grains limits the economic viability of the crop (Hunter et al., 2020a). Therefore, the focus on improving grain yield is key to the success of the crop. This trait has received little attention in perennial grasses breeding programs for reasons such as: the interest of grain yield is only to satisfy the demand for seed, moderate to low heritability values of grain yield in addition to the fact that different management practices are needed to promote grain and forage yield (Bean, 1972; Kalton et al., 1996; Vogel et al., 1989). Nevertheless, for intermediate wheatgrass significant progress has been made in grain yields in the last two decades (Bajgain et al., 2022). Much of this progress has been explained by the increase in genetic gain rates by reducing the generation interval, moving from classical recurrent phenotypic selection (with evaluations in the second and/or third year of production) to the use of genomic selection (Bajgain et al., 2022; Crain et al., 2021). Another way to reduce the generation interval without the routine use of genomic selection, which may not yet be

available to all breeding programs, is to use the first year of the crop for evaluation under phenotypic selection schemes. Although the first year of evaluation has been partially used for phenotypic selection in intermediate wheatgrass, the maturity attained by plants is uneven (DeHaan et al., 2018), which can lead to awkwardness and errors in the selection of genotypes. Early fall seeding date in intermediate wheatgrass was associated with high grain yields in the first year probably due to the greater morphological development of plants that can vernalize and produce grain (Jungers et al., 2022; Olugbenle et al., 2021). This suggests that it may be possible to obtain plants with more complete maturity and select for this or other traits as early as the first year. It would be reliable to use the first year of production for selection if the estimation of genotype x stand age interaction is negligible and/or indirect selection for a given trait in the first year is effective in relation to selection in the second year (Falconer & Mackay, 1996). There is little data about this issue since for most perennial species the first-year data is not collected as it is considered an unreliable predictor of long-term seed yield (Majidi et al., 2015; Majidi et al., 2017). In the cycle 6 of The Land Institute's Kernza breeding program (the only cycle in which several traits were measured during the first and second year consecutively), heritability declined sharply for most of the traits in the second year and genetic correlations between the first and second year of several grain yield related traits were medium (DeHaan et al., 2018). Therefore, our first hypothesis is that the genotype by stand age interaction for grain yield components would be significant, suggesting that first-year evaluations would not be an effective way to increase genetic gains per unit time.

In most of the genetic improvement programs multiple traits are targeted by selection and the magnitude and direction of the genetic correlations among those traits defines the breeding strategies and genetic gain potentials. Selection on a secondary trait with the purpose of obtaining a positive response in the desirable or primary trait (i.e., indirect selection) is beneficial to increase the response to selection (Falconer & Mackay, 1996). Although grain yield per se is the main selection goal in crops (Loss & Siddique, 1994), the high genotype x environment interaction for this trait possesses a challenge for reliably discriminating genotypes via direct selection (Bhatti et al., 1991; Comstock & Moll, 1963). Furthermore, the high correlations between grain

yield and several of its yield components in plants can make indirect selection a successful practice (Das & Taliaferro, 2009; McNeal et al., 1978). Indeed, in high latitude regions, spike characteristics such as fertility, size and grain yield per spike have been used and/or proposed as secondary traits for seed yield improvement in Intermediate wheatgrass (Bajgain et al., 2022; Knowles, 1977) and other perennial grasses (Armstead et al., 2008; Bean, 1972; Bugge, 1987; Griffiths et al., 1966; Nguyen & Sleper, 1983a; Studer et al., 2008). Therefore, our second hypothesis is that response to selection of indirect selection for Kernza grain yield components could be higher than direct selection for grain yield per plant under a dual-purpose production system.

Breeding perennial species with high grain yields is challenging due to their lower reproductive allocation or trade-off between seed and perennial organs (González-Paleo & Ravetta, 2011; Silvertown & Dodd, 1996; Smaje, 2015; Wagoner & Schaeffer, 1990). However, most perennials produce small amounts of seed relative to their vegetative growth not as a physiological absolute, but rather as a result of natural selection in a stable, competitive environments which favored longevity as a result of increased storage organs to better compete in crowded habitats (DeHaan et al., 2005). Therefore, selecting genotypes with higher seed allocation to increase harvest index could be a desirable pathway even in environments with less competition for resources (DeHaan et al., 2005). In this process would be key to select germplasm with higher grain yields and also to evaluate the impact of this process on other traits such as forage production that contribute to the sustainability of the crop (Law et al., 2022). This point is controversial in perennial grasses: while some research showed negative correlations between seed yield and forage yield in some species (Boelt & Studer, 2010; Huff, 2010; Humphreys et al., 2010), other species, including intermediate wheatgrass, showed positive correlations or no relationship (Cattani & Asselin, 2018; Sampoux et al., 2011; Thiele et al., 2009; Zhang et al., 2016). Nevertheless, the experiments that evaluated this relationship in Intermediate wheatgrass were carried out under an agronomic management that was focused on grain harvest, with only one forage harvest in the summer after the grain harvest. Forage harvesting can have a strong effect on grain yield in dual-purpose crops,

although this effect can be negative as well as positive (Richards, 1993). The direction and intensity of the effect will depend on many factors, among which the following stand out: grazing management, genotype and environmental conditions (Edwards et al., 2011). As with grain yield, harvest index is also affected by severe and late grazing (after stem elongation has started), most likely through changes in dry matter partitioning during crop recovery within the plant (Harrison et al., 2011). For Intermediate wheatgrass, it has also been shown how important defoliation management can be on grain and forage yield (Hopkins et al., 2003; Hunter et al., 2020a; Hunter et al., 2020b). Therefore, our third hypothesis is that there are emerging trade-offs between vegetative and reproductive allocation of resources under management as a dual-crop.

In this experiment, 30 half-sib families derived from open pollination of an intermediate wheatgrass *Kernza* population were evaluated for agronomic traits over two years in a low latitude region with milder winters than those to which this crop has been adapted. The aim of this research was to: (1) understand the genetic architecture of grain and forage yield components in intermediate wheatgrass *Kernza* under a dual-purpose management, (2) estimate the response to selection for grain yield using secondary grain yield components and 3) quantify potential trade-offs between vegetative and reproductive allocation under dual-purpose management.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. Base population

The germplasm consisted of seeds from the Land Institute Cycle 4 (TLIC4). TLIC4 can be considered a reliable representative of *Kernza* since it is the germplasm that has been used most widely in scientific research (Hunter et al., 2020 a, b; Favre et al., 2019; Fernandez et al., 2020; Larson et al., 2019; Pinto et al., 2021; Zimbric et al., 2020 a, b). Seedlings from the TLIC4 population were grown in the greenhouse with natural light, until plants reached the three-leaf stage (from mid-April to mid-May 2018) and then transplanted to the field at the Experimental Station “Dr. Mario A.

Cassinoni”, located at 32°55’S, 58°03’W, Paysandú, Uruguay. Soils were a fertile loamy clay Typic Argiudoll with less than 1 % slope which had previously been under perennial pasture. This perennial pasture was killed with herbicide (glyphosate, 5 L ha⁻¹) and then minimally tilled with a cultivator two months before transplant. A total of 1,050 individual plants were planted equidistantly to 20 cm apart with 0.4 m alleys (Figure 1a, b, c). From transplanting until the plants reached tillering stage, a plastic shade net was used to control early weed infestation (Figure 1a). The plants that reached flowering (47.5 %) showed a high phenological variability, with average flowering 17 November 2018 and average harvest 21 January 2019. Thirty individual plants from this population were selected in January 2019 as parents of half-sib families based on a simple index (Lima et al., 2015) with number of spikes per plant and early maturity (whose sign was changed to positive), calculated as the sum of the Z-score of each trait for each individual.

4.3.2. Half-sib families and experimental management

The half-sib progeny from each selected plants from the base population were evaluated in the field between 2019 and 2021. Seeds from each selected plant were sown in containers (75 cc) and were grown in standard potting compost (70 % milled pine bark, 30 % peat, 1 kg triple phosphate, 1 kg of a controlled-release fertilizer 19-6-10 for 1 m³) in April 2019 (Fall season). Seedlings were grown in the greenhouse with natural light until plants reached the four-leaf stage (early April to late May 2019) and then transplanted to the field at Paysandú (Figure 1d). Seedlings of the 30 half-sib families were spaced-planted in the field according to a randomized complete block design with three replications. Each plot consisted of 12 plants arranged in two rows of 3.6 x 0.6 m each. Plants were spaced 0.6 m in both rows and columns. The soil type was a fertile clay loam soil (Typic Argiudoll), with less than 1 % slope. Temperature and precipitation were recorded at a weather station located within 100 m from the field experiment (Supplemental Table S1). Intermediate wheatgrass was planted following a perennial pasture terminated by herbicide. Prior to transplanting minimal soil tillage was done. Nitrogen fertilizations using urea (46-0-0) at 50 kg N ha⁻¹ year⁻¹

¹ was applied to the trial each May in 2019 and 2020. Control of broadleaf weeds consisted of a winter application (July) of 2 4 D (1 l ha⁻¹), while grass weeds were controlled manually.

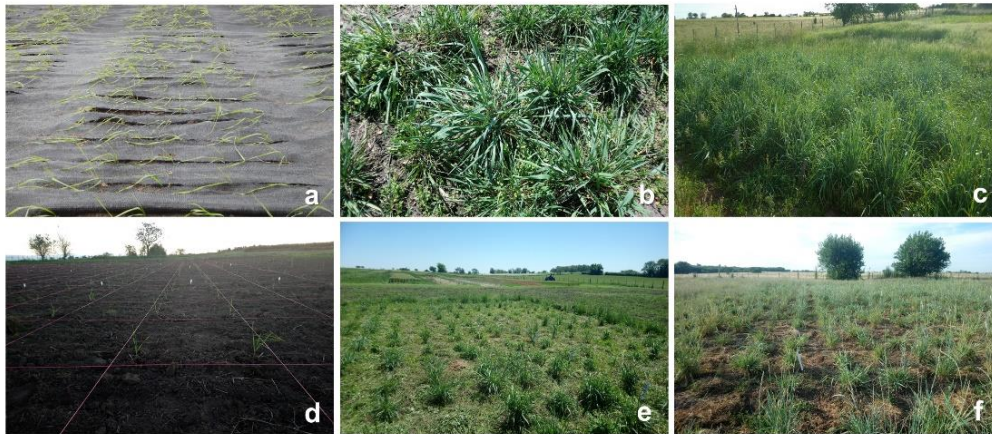


Figure 1. Pictures of Kernza in Paysandú (Uruguay) experiments at: seedling of base population (a), beginning of stem elongation of base population (b), heading time stage of base population (c), seedling of half-sib families (d), fall regrowth of half-sib families (e), and heading time stage of half-sib families for the second year (f).

4.3.3. Phenotyping

All 12 individual plants from each plot were evaluated for the following traits in both 2020 (stand age 1) and 2021 (stand age 2): plant heading, heading time, grain filling period, harvest time, summer forage yield, spike number, spikelets per spike, spikelet number, grain yield, grain yield per spike, grain yield per spikelet and harvest index. In addition, plant height, fall forage regrowth and fall forage regrowth rate were evaluated only during 2020.

The first-year heading time was calculated as the number of growing degree days (GDD) from plant emergence (i.e., April 2, 2019) to heading for each plant using a base temperature of 0 °C as described by Jungers et al. (2018). The second-year heading time (Figure 1f) was calculated as the GDD between the forage regrowth harvest date (i.e., May 29, 2020) and the heading date. In both years, plant heading

was monitored three times a week from September to December and was recorded for each plant when the first spike emerged from the flag leaf sheath (stage R1, according to Moore et al. (1991)). The grain filling period, hereinafter referred to as grain filling, was calculated as GDD between heading time and grain harvest time, also using 0 °C as the base temperature. Grain harvest time was calculated as the sum of both heading time and grain filling.

The accumulated Photo-Vernalo-Thermic Units (UPVTs) and vernalization units (VUs) between crop emergence and the first grain harvest and between the forage regrowth harvest and the second grain harvests were calculated using the formalisms used by Duchene et al. (2021) from the STICS soil-crop model (Brisson et al., 1998, 2002, 2008). The UPVTs and VUs for each year are reported in Supplementary Table S1.

Mature spikes were harvested in the summer from December to February each year. Due to the possibility of dehiscence and to estimate the length of the maturity cycle of each plant, each spike was cut 5 cm below the lowest seed when each plant was reaching maturity. The total number of spikes per plant was evaluated at the end of the season. Three spikes from each plant were randomly chosen to estimate the number of spikelets per spike. Spikelets per plant was calculated as the product of the number of spikelets per spike and the number of spikes per plant. All spikes were then manually threshed and grain yield per spike was estimated as the ratio of grain yield per plant and the number of spikes per plant and grain yield per spikelet, estimated as the ratio of the grain yield per spike and the number of spikelets per spike. Harvest index was estimated as the ratio of grain yield per plant and the summer dry matter forage yield (hereinafter referred to as summer forage yield) at the time of grain harvest. Forage yield was evaluated by hand-harvesting aboveground biomass of the plants at 2.5 cm above ground at three moments: at grain harvest (December to February) in two consecutive years (summer forage yield evaluations) and on May 29 2020, where fall regrowth was evaluated after the first summer harvest (Figure 1e). Fresh biomass of each plant was placed in a forced-air dryer at 65 °C for 48 h and then weighted to estimate dry matter yield of the forage. Fall forage regrowth rate was estimated as the ratio of forage production between the first summer harvest and the

fall cut (May 29, 2020) and the duration in days of that period for each plant. Plant height was measured before the second year's grain harvest as the distance from the soil surface to the tip of the tallest spike in cm.

4.3.4. Analysis of variance, variance components and heritability

Linear mixed models were used to study differences among half-sib families and to estimate variance components using the *lmer* function of the *lme4* package of the R statistical software (R Core Team, 2020). The following linear mixed model was used to study traits in individual years:

$$[1] y_{ijk} = \mu + F_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} + \delta_{ijk}$$

where y_{ijk} is the response variable, μ is the overall mean, F_i is the effect of the i th half-sib family, β_j is the effect of the j th block, ε_{ij} is the experimental error (i.e., experimental unit or plot error), δ_{ijk} is the sub-sampling error (i.e., plant within plot error), with $\beta_j \sim N(0, \sigma_b^2)$, $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$, and $\delta_{ijk} \sim N(0, \sigma_w^2)$, and σ_b^2 , σ_e^2 , σ_w^2 are the block, residual error and sub-sampling variances. Random effects are assumed independent. Finally, the Family component was defined as random for heritability estimates only with $F_i \sim N(0, \sigma_f^2)$.

The following linear mixed model was used to analyze the two-year data:

$$[2] y_{ijkl} = \mu + F_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} + Y_k + FY_{ik} + \gamma_{jk} + \eta_{ijk} + \delta_{ijkl}$$

where F_i , β_j , ε_{ij} , and, δ_{ijkl} are as in [1], and Y_k is the effect of the k th stand age, FY_{ik} is the interaction between half-sib family and stand age, γ_{jk} is the repeated measures error, η_{ijk} is the error, with $\gamma_{jk} \sim N(0, \sigma_\gamma^2)$, $\eta_{ijk} \sim N(0, \sigma_\eta^2)$, and σ_γ^2 , and σ_η^2 are the variance of repeated measures error and residual error. Random effects are assumed independent. Finally, the Family, stand age and Family by stand age components were defined as random for heritability estimates only with $F_i \sim N(0, \sigma_f^2)$, $Y_k \sim N(0, \sigma_y^2)$, and $FY_{ik} \sim N(0, \sigma_{fy}^2)$.

The plant heading trait follows a binomial distribution with each plant either heading or not. Therefore, the GLIMMIX procedure with a binomial link was implemented in SAS 9.4 (SAS Institute, 2004) with an analysis of deviance for this trait. Variance component estimates for this trait were obtained from a generalized linear mixed model using the *glmer* function of the *lme4* package (R Core Team, 2020).

Narrow-sense heritability (h^2) on a trait mean basis was estimated for each year separately and for both years following Holland et al. (2003):

$$[3] h^2 = \frac{\sigma_f^2}{\sigma_f^2 + \frac{\sigma_e^2}{r} + \frac{\sigma_w^2}{rn}}$$

$$[4] h^2 = \frac{\sigma_f^2}{\sigma_f^2 + \frac{\sigma_{fy}^2}{y} + \frac{\sigma_e^2}{r} + \frac{\sigma_{ry}^2}{ry} + \frac{\sigma_w^2}{ryn}}$$

where σ_f^2 is the family, σ_{fr}^2 is the family x rep, σ_{fy}^2 is the family x stand age, σ_{fyr}^2 is the family x stand age x rep and σ_w^2 is the within half-sib families (residual) variances, respectively. Number of replications, stand age and individual plants per plot are r , y and n , respectively.

4.3.5. Genetic variation, genetic gain, genetic correlation and relative selection efficiency

The genotypic coefficient of variation (GCV) and the within family coefficient of variation (WFCV) were estimated following Majidi et al. (2009) and Araghi et al. (2014) as:

$$[5] GCV = \left(\frac{\sigma_f}{\mu} \right) \cdot 100$$

$$[6] WFCV = \left(\frac{\sigma_w}{\mu} \right) \cdot 100$$

where σ_f is the standard deviation of the genotypic effect (square root of the among family variance, σ_f^2), σ_w is the standard deviation of the within family variance and μ is the phenotypic mean.

The genetic gain per cycle (ΔG) of individual plant selection was predicted using the breeder's equation following Nguyen & Sleper (1983b) as:

$$[7] \Delta G = c k h^2 \sigma_p$$

where c is the parental control coefficient (i.e., $c = 0.5$ assuming only mothers can be controlled in a half-sib scheme), k is the standardized selection differential related to the selection intensity (i.e., $k = 1.4$ assuming a selection of the top 20 % individuals), h^2 is the narrow-sense heritability, and σ_p is the phenotypic standard deviation. Following Falconer & Mackay (1996), the genetic gain per unit time ΔG_t was estimated by dividing equation [7] by the breeding cycle duration (L - in years):

$$[8] \Delta G_t = \frac{c k h^2 \sigma_p}{L}$$

Pearson correlation coefficients between traits were estimated from variance and covariance components of the analysis of the half-sib families as follows:

$$[9] \rho_{X,Y} = \frac{COV(X,Y)}{\sigma_x \sigma_y}$$

where, $COV(X, Y)$, σ_x and σ_y are estimates of the genetic covariance and genetic deviations of traits x and y , respectively.

The relative selection efficiency was estimated following Falconer & Mackay (1996) and Searle (1965) as:

$$[10] RSE = r \sqrt{\frac{h_x}{h_y}}$$

where r is the genetic correlation between the two traits, h_y is heritability in the narrow sense of the primary trait and h_x is heritability in the narrow sense of the alternative trait.

4.4. RESULTS

4.4.1. Analysis of variance, variance components and heritability

Genotype by stand age interaction was only significantly different from zero for the spikelets per spike trait (Table 1). Significant differences among half-sib families were found for all traits except for grain filling (Table 1). The effect of stand age was significant for most of the traits, the only exceptions were plant heading and summer forage yield (Table 1). For both GCV and WFCV, plant heading had the highest values, while the phenological traits had the lowest values (Table 2). WFCV values were very high for most traits and significantly higher than those shown by GCV for both years.

Table 1. Percent of the sum of squares and percent of total variance explained by family, stand age and family x stand age for agronomic traits evaluated over two years (stand age) in half-sib progeny test of Intermediate wheatgrass in Paysandú, Uruguay.

Trait	Sum of square (%)			Variance (%)	
	Family	Stand age	Family x Stand age	Family	Family x Stand age
Plant heading	54.7**	31.9	13.4	12.3	2.7
Spikes per plant	17.3**	43.5**	5.7	5.7	0.7
Spikelets per spike	12.8**	54.6**	10.0*	0.6	7.5
Spikelets per plant	19.4**	26.9**	7.7	7.2	2.2
Grain yield per spike	33.4**	27.8**	5.8	18.9	1.1
Grain yield per spikelet	35.5**	20.0**	6.8	26.5	0.8
Grain yield per plant	31.5**	9.2**	5.7	12.6	1.8
Harvest index	32.7**	11.8**	7.2	29.5	0.2
Heading time	2.4**	94.1**	0.6	0.9	0.1
Grain filling	17.0	28.1**	9.5	5.6	7.4e ⁻⁸
Grain harvest time	1.3**	95.2**	0.9	0.2	0.4
Summer forage yield	33.6**	1.2	5.3	1.1	0.2

*, ** Significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$.

Note. The variance components are expressed as percentage in relation to the total estimated variance.

4.4.2. Narrow-sense heritability, response selection efficiency and genetic gain

Plant heading, traits directly associated with grain yield such as grain yield per spike and grain yield per spikelet, forage yield (summer forage yield with the exception of 2021, forage regrowth and forage regrowth rate) or phenology (heading time, grain filling with the exception of 2021, and grain harvest time) had moderate to high h^2 values in both 2020 and 2021 (Table 2). Additionally, harvest index and traits directly associated with grain yields (grain yield per plant, grain yield per spike and grain yield per spikelet) showed the highest values of genetic gain. On the other hand, phenological traits had the lowest values of genetic gain (Table 3).

Harvest index for the first year and yield per spike for the second year were the traits that had RSE values higher than 1 for indirect selection for grain yield per plant (Table 3). However, other traits such as spikes per plant had RSE values around 0.90, suggesting that it is also possible to use them as a secondary trait (Table 3). Estimates of RSE considering on primary and secondary traits the same trait measured in the second and first year, respectively, showed that only summer forage yield and harvest index were the traits able to achieve higher progress when selecting in the first year than in the second year. Nevertheless, for most of the traits, the greatest genetic gains per year are obtained when using the first stand age for selection (Table 3).

4.4.3. Genetic correlations

High and positive genetic correlations between most grain yield components were found (Figure 2). Specifically, high and positive genetic correlations between all pairwise combinations of spikes per plant, spikelets per plant and grain yield per plant were obtained in both years. Phenological traits (heading time and grain harvest time) had high and negative correlations with most traits. Summer forage yield in both years was highly positively correlated to most grain yield components. Additionally, this trait had high and positive correlations with the second-year forage evaluations (fall regrowth and fall regrowth rate) and with plant height (Figure 2).

Table 2. Genotypic mean, standard errors, genetic coefficient of variation, within family coefficient of variation and narrow-sense heritabilities of evaluated traits in Paysandú (Uruguay) during 2020 and 2021 in half-sib families of Intermediate wheatgrass.

Trait	Mean (SE)		GCV (%)		WFCV (%)		h^2		
	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021	Both years
Plant heading (%)	71.3 (2.4)	85.0 (2.0)	73.7	82.9	105.9	98.8	0.84	0.93	0.83
Spikes per plant	13.0 (0.8)	33.5 (1.8)	21.0	14.6	88.2	91.5	0.45	0.27	0.41
Spikelets per spike	21.3 (0.3)	17.2 (0.2)	4.2	6.1	18.6	19.6	0.46	0.65	0.05
Spikelets per plant	359.1 (20.0)	665.2 (36.3)	13.0	8.7	79.1	95.6	0.27	0.10	0.20
Grain yield per spike (mg)	138.4 (7.0)	80.4 (4.9)	19.0	27.5	71.6	74.7	0.51	0.69	0.67
Grain yield per spikelet (mg)	6.9 (0.3)	4.7 (0.2)	18.0	20.9	62.3	66.0	0.61	0.61	0.71
Grain yield per plant (g)	2.2 (0.2)	3.3 (0.3)	23.1	23.0	123.6	120.4	0.31	0.35	0.41
Harvest index	2.1 (0.2)	3.4 (0.3)	32.5	21.6	104.5	140.4	0.62	0.30	0.61
Heading time (GDD)	3865 (21)	2608 (20)	2.1	3.0	9.1	12.6	0.55	0.49	0.66
Grain filling (GDD)	1777 (13)	1640 (11)	2.8	3.7	13.2	12.8	0.47	0.01	0.45
Grain harvest time (GDD)	5640 (17)	4154 (23)	0.9	2.3	5.1	10.0	0.32	0.55	0.39
Summer forage yield (g plant ⁻¹)	99.0 (4.0)	91.6 (3.9)	13.6	8.0	44.0	76.4	0.40	0.13	0.29
Fall regrowth (g plant ⁻¹)	-	30 (2.0)	-	20.8	-	66.7	-	0.54	-
Fall regrowth rate (g plant ⁻¹ day ⁻¹)	-	0.30 (0.02)	-	21.9	-	66.0	-	0.57	-
Plant height (cm)	-	89.0 (1.0)	-	4.0	-	18.5	-	0.39	-

Note. Means and standard error for plant heading were estimated with GLIMMIX procedure with a binomial link was implemented in SAS 9.4 (SAS Institute, 2004).

Table 3. Relative efficiency of indirect selection for grain yield per plant using other yield component as secondary traits and for performance in the second year using performance in the first year as secondary trait for each trait evaluated. Genetic gains per year are also shown.

Trait	RSE for grain yield per plant ^a			RSE ^b between years	ΔG_t	
	2020	2021	Both years		Year 1 ^c	Year 2 ^d
Spikes per plant	1.00	0.70	0.82	0.88	4.0	3.2
Spikelets per spike	0.64	1.0	0.22	0.10	1.3	0.8
Spikelets per plant	0.68	0.44	0.54	0.87	59.8	24.7
Grain yield per spike (g)	0.99	1.06	0.98	0.62	35.7	16.2
Grain yield per spikelet (g)	0.90	0.96	0.88	0.70	2.0	0.7
Grain yield per plant (g)	-	-	-	0.69	0.7	0.5
Harvest index	1.14	0.62	0.90	1.04	1.1	0.5
Heading time (GDD)	-0.39	-0.68	-0.56	0.70	138.9	59
Grain filling (GDD)	0.55	0.03	0.69	1.99	80.4	0.8
Grain harvest time (GDD)	0.01	-0.52	-0.20	0.20	67.5	82
Summer forage yield (g plant ⁻¹)	0.57	0.39	0.48	1.30	14.7	3.5
Fall regrowth (g plant ⁻¹)	-	0.26	-	-		
Fall regrowth rate (g plant ⁻¹ day ⁻¹)	-	0.26	-	-		
Plant height (cm)	-	0.61	-	-		

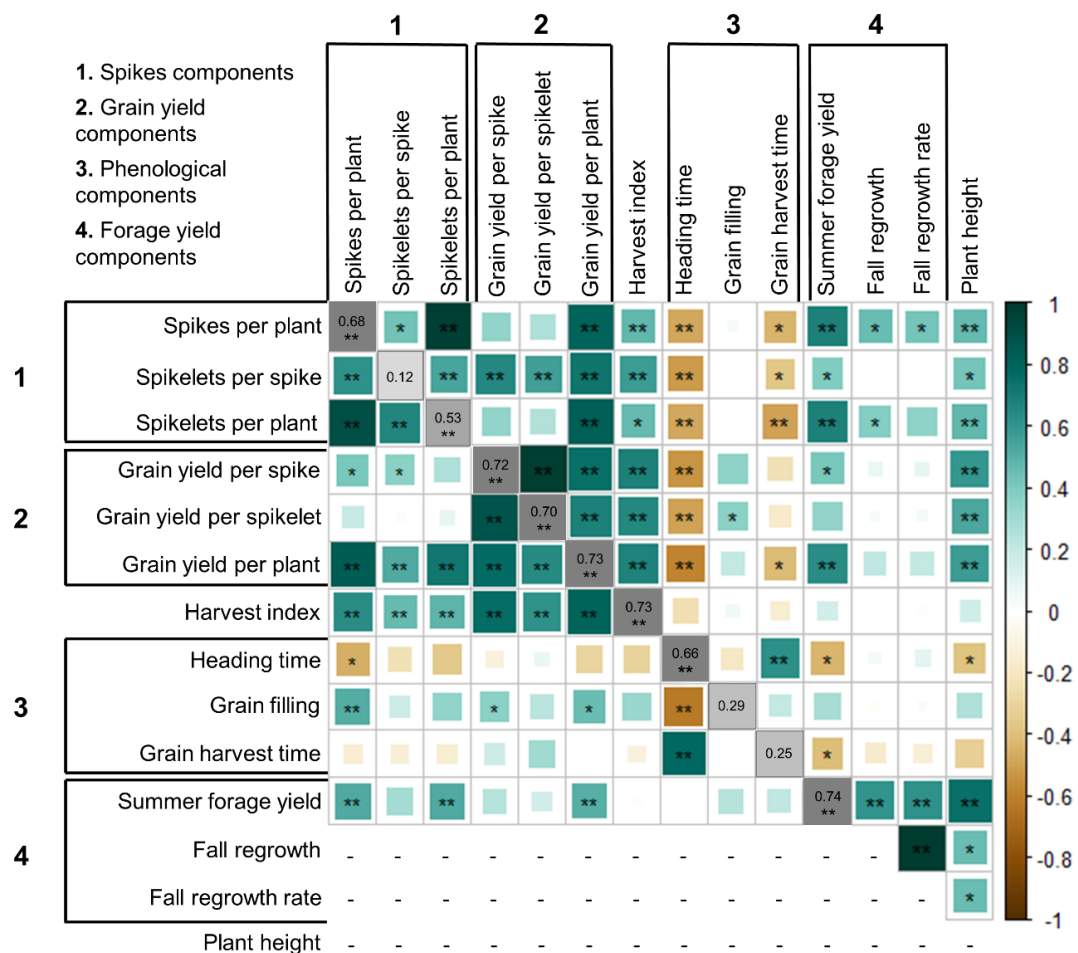
^aResponse selection efficiency of indirect selection for grain yield per plant

^bResponse selection efficiency of indirect selection using first year performance as a secondary trait with the primary purpose of improving performance in the second year.

^cAnnual gains using the first year for selection.

^dAnnual gains using the second year for selection (keeping the first year for crop establishment).

Figure 2. Genetic correlation matrix from Pearson's correlation coefficients among grain yield-related traits, forage yield-related traits and phenological traits evaluated on thirty families throughout the whole experiment. Positive correlations are presented in aquamarine, while negative correlations are colored in light brown. The matrix was created using the “corrplot” R package (Wei & Simko, 2017). Darker color intensity and larger squares represent higher correlation values. Genotypic correlations for 2020 are shown below the diagonal, genotypic correlations for 2021 are shown above the diagonal, while genotypic correlations for each trait across years are shown on the diagonal in a grey scale.



*, ** Significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$.

4.5. DISCUSSION

4.5.1. Selection opportunities in the first year and genotypic variance

Our first hypothesis was rejected: most of the agronomic traits evaluated had no genotype x stand age interaction under dual-purpose management. Most traits had a stand age effect, except plant heading and summer forage yield. Only spikelets per spike had genotype x stand age interaction, which could indicate slow progress of the selection for this trait (Kang, 1997). Summer forage yield and harvest index indirect selection in the first year could be superior to direct selection in the second year ($RSE > 1$), and other traits such as spikes per plant did not show significant differences whether selection was carried out in the first or second year (Table 3). If we further consider that progress per unit of time is usually more important than progress per generation or cycle (Falconer & Mackay, 1996), waiting to carry out selection in the second year would imply strong reductions in genetic gain per unit time for most of the traits evaluated (Table 3). However, early fall sowing in both high and low latitude regions would be essential to achieve developed plants able to perceive the necessary cold stimuli from late fall to early spring and therefore use the first year of production efficiently for selection by reducing or removing the effects of vernalization on reproductive variables (Jungers et al., 2022).

Significant genotypic variation was observed among half-sib families for most of the traits assessed, suggesting the presence of additive genetic variation for these traits (Table 1). Indeed, it was possible to identify superior families for these traits (Supplemental Table S2). All traits had high within family variation, which could be explained by the fact that Intermediate wheatgrass is a self-incompatible, open-pollinated species, hence, within-family genetic variation is usually higher than among-family variation (Saha, 2014).

Plant heading as well as several grain yield-related traits had high genetic coefficients of variation measured as GCV and WFCV (Table 2). These results could be due in part to the vernalization requirements of the species and its effect on grain yield-related traits (Ivancic et al., 2021; Locatelli et al., 2022). Because the experiment

was conducted in a region with milder winters than the areas from which Intermediate wheatgrass has been able to adapt (high latitudes areas of northern Europe and North America), it is to be expected that part of the germplasm used did not fully meet its cold requirements. In fact, 29 VUs were accumulated for the first year and 38 for the second year (Supplemental Table S1), which are lower than the optimum reported by Locatelli et al. (2022) under controlled conditions (49), by Duchene et al. (2021) under field conditions in Europe (71) or the minimum VUs needed reported by Jungers et al. (2022) to produce grain in field experiments in North America (78). However, Locatelli et al. (2023), with 43 cumulative VUs achieved 47% flowering with the base germplasm of our study. The germplasm used in our study with only one selection cycle showed significant progress since 71 % flowering was obtained in the first stand age with 29 accumulated VUs and 85 % flowering in the second stand age with 38 accumulated VUs (Supplemental Table S1). Failure to fulfill the plant heading requirements does not necessarily imply inability to form a fertile stem, but could mean forming variable number of tillers, as the vernalization stimuli received by one stem are not transferred to other later-formed stems (Evans, 1964). Therefore, genetic variability observed in both plant heading and several grain yield-related traits may have been increased by the genetic variability of the germplasm in terms of vernalization requirements.

4.5.2. Narrow-sense heritability

In general terms, and even though variations between years were evident, h^2 values were moderate to high for most of the traits related to grain yield, similar to what is reported in the northern hemisphere (DeHaan et al., 2018; Altendorf et al., 2021; Crain et al., 2021). Therefore, substantial responses to selection could be obtained on the grain yield-related traits under the conditions of the experiment. Since its introduction into North America, Intermediate wheatgrass has shown excellent forage yields; however, information on the additive gene dependence of forage yield-related traits is still scarce. Mortenson et al. (2019) obtained high values (0.73) of broad sense heritability (H^2) of biomass harvested 7 days post anthesis from full-sib

families and spaced-plants in Intermediate wheatgrass. Our estimates of h^2 might indicate that phenotypic selection for summer forage yield and fall regrowth can be successful in Intermediate wheatgrass to achieve genetic gains for these traits. On the other hands, estimates of heritability of harvest index in perennial grasses are extremely rare, being somewhat more usual in annual cereals, but outdated since this trait is very stable in developed crops (Biscoe & Willington, 1984). The magnitudes of our h^2 values for harvest index were moderate to high and also are in agreement with the values reported for annual cereals (Snyder & Carlson, 1984). Heritability information for phenological traits generated so far for Intermediate wheatgrass is very limited, although it has shown moderate to high values (Mortenson et al., 2019; Altendorf et al., 2021). In this study, heading time as well as grain harvest time and grain filling also had moderate to high h^2 values although these showed strong year-to-year variability. Consequently, it seems that phenotypic selection for these traits can be successful.

4.5.3. Genetic correlations and indirect selection possibilities

Genetic correlations between grain yield per plant and its components (spikes per plant, spikelets per spike, spikelets per plant, grain yield per spike and grain yield per spikelet) were positive and highly significant in both years (Figure 2). In addition, the lower estimated h^2 values for grain yield per plant (Table 2) than for its grain yield components and that, for intermediate wheatgrass, grain yield per plant has shown a low stability and predictive ability across the years (Cattani, 2016), it would seem prudent to select by one of the grain-yield components rather than selecting directly by grain yield per plant. Therefore, our second hypothesis was not rejected: indirect selection for some of the grain yield components will result in a higher response to selection than direct selection for grain yield per plant. Spikes per plant is one of the primary components of grain yield in Intermediate wheatgrass spaced-plants (Altendorf et al., 2021), and, due to its high correlation with grain yield per plant and higher h^2 showed in this study, it could indeed be a qualified candidate to be selected to improve grain yield. As in this study and in spaced plant trials, it is common to

observe yield increases per plant from the first to the second year, mostly explained by increases of spikes per plant but decreases in components such as: spikelets per spike, yield per spike, among others (Zhang et al., 2016; Cattani & Asselin, 2018; Bajgain et al., 2019; Altendorf et al., 2021). However, in sward trials, this increase or overproduction of tillers is identified as a major weakness in maintaining grain yields over the years in Intermediate wheatgrass, as it would be increasing competition among reproductive tillers, which would contribute to grain yield decline (Hunter et al., 2020a). Therefore, grain yield per spike, given its high correlation with grain yield per plant as well as with other grain yield components (Figure 2), its moderately high h^2 (Table 2) and its high RSE for grain yield per plant estimated (Table 3), could be the main trait to select for improving Kernza grain yield under the environment conditions of this experiment. In addition, if we select for grain yield per spike, we could also be selecting for other important traits such as: thousand grain weight, spikelets per spike, florets per spikelets and their fertility (Elgersma, 1990; Philipp et al., 2018). Spike fertility has been shown to have a strong correlation with spike yield and hence Kernza grain yield (DeHaan et al., 2018; Slinkard, 1965) and has been further highlighted as one of the key traits to be improved to achieve higher grain yields in this crop (Altendorf et al., 2021). On the other hand, in geographic areas where vernalization requirements may not be fully met (as those in this study), plants that are able to have more reproductive tillers may be plants with lower vernalization requirements, since, under the same climatic conditions, more tillers were stimulated to produce a spike. Thus, intermediate wheatgrass breeding for grain yield in these areas and with germplasm with strong genetic variability in terms of vernalization requirements should not exclude spikes per plant as a trait to be selected. Therefore, we suggest two options for breeding: 1) use spikes per plant as a strong selection criterion only in the first cycles of selection and 2) always use spikes per plant as a character to be selected, but with a low weight in relation to other traits.

Due to the ecological and agro-environmental characteristics of intermediate wheatgrass, its expansion from North America to other geographic areas is currently being pursued (Locatelli et al., 2022; Locatelli et al., 2023). Therefore, knowing both the genetic control as well as the genetic architecture established between phenological

traits and yield components is major, since phenology is a key factor determining the adaptation of crop plants to production conditions (Hill et al., 2019; Richards, 1991). In this study, heading time showed a negative relationship with many components of grain yield, which became very clear in the second year (Figure 2). Plants with a longer duration of the emergence-heading time period exposed last part of their vegetative stage to higher temperatures, as observed in wheat, could have accelerated developmental stages and shortened each of them and reduced the magnitude of sink components (Nishio et al., 2013; Slafer & Rawson, 1994). Indeed, numerical yield components such as spikelets per spike, spike length, grain number per spikelet and grain number per spike have shown reductions with high pre-anthesis temperatures (Fischer & Maurer, 1976; Johnson & Kanemasu, 1983; Midmore et al., 1982; Rawson & Bagga, 1979). On the other hand, the negative association detected between heading time and plant height is controversial as ambiguous values have been reported in other winter perennial grasses, both in agreement and disagreement with what we found (Jafari et al., 2006; Majidi et al., 2009; Majidi et al., 2015). In contrast, the positive associations detected in this study between plant height and several grain yield components agree with what has been reported in the literature for intermediate wheatgrass (Zhang et al., 2016; DeHaan et al., 2018). However, a negative relationship between plant height with heading time and positive plant height and grain yield components would, in theory, be undesirable for breeding. The first relationship would make it impossible to select plants with early flowering (which would better adjust the crop cycle and grain filling would occur at milder temperatures) and with lower risk of lodging. The second relationship would make it impossible to reduce the risk of lodging of plants with higher grain yields.

4.5.4. Trade-offs

Our third hypothesis was rejected: there are no emerging trade-offs between vegetative and reproductive allocation of resources under management as a dual-crop. We detected positive and significant genetic correlations between summer forage yield and several grain yield components as spikes per plant, spikelets per plant (first year)

and spikes per plant, spikelets per spike, spikelets per plant and grain yield per plant (second year) (Figure 2). The others forage yield-related traits evaluated (fall regrowth and fall regrowth rate), which can be viewed as indicators of perenniality in intermediate wheatgrass (DeHaan et al., 2018), were highly and positively correlated with summer forage yield, and showed basically the same degree of relationship with grain yield-related traits as forage summer yield showed. On the other hand, due to the high ΔG_t and RSE with harvest index (indirect selection for grain yield per plant) estimated in this study (Table 3), while positive correlations between grain yield and forage yield are maintained, as mentioned by DeHaan et al., 2005, harvest index could be the key trait to select for to improve grain yield without neglecting aboveground biomass production, which is necessary under a dual-purpose system. Although improvement in this trait has been important for grain yield progress in many crops (Hay, 1995) including intermediate wheatgrass (Cattani & Asselin, 2018), the values achieved in the best case still do not exceed 0.20 for this crop (Frahm et al., 2018). This fact could explain, at least until now, the lack of competition for resources between aboveground biomass and reproductive organs. The non-negative correlation between these types of traits does not necessarily mean the absence of a trade-off between seed and perennial organs, since in this work we did not measure belowground biomass, which is an important fraction in competition with grain production for resources in perennial crops (Vico et al., 2016). Throughout the process of domestication of perennial plants, it has been shown that selection for high yields induces a shift in resource use strategy at the leaf and plant level from conservative to acquisitive (Milla et al., 2014; Vilela & González-Paleo, 2015). Therefore, this change of strategy leads to structural changes in both the above and belowground biomass, apparently caused from a lower investment in root storage, which could affect yield stability and longevity. (Pastor-Pastor et al., 2019). Although we are not sure what will happen in successive selection cycles, our results showed the possibility of selecting for higher plant grain yield and at the same time improving forage yield. Furthermore, that claim should also be taken carefully since our experiment was performed on spaced-plants and it has been demonstrated that both the production of tillers (fertile and non-fertile) and forage production of intermediate wheatgrass can be affected in

swards environments, which could modify the relationship between grain yield and forage yield under these production conditions (Altendorf et al., 2021; Hunter et al., 2020a; Mortenson et al., 2019).

4.6. CONCLUSION

Considerable genetic variation was detected for most of the agronomic traits evaluated, highlighting the high potential of the germplasm studied for plant breeding. Most of the agronomic traits assessed had high to moderate h^2 values, suggesting that phenotypic selection might be successful to achieve genetic progress for these traits. As soon as an early fall establishment of the crop is achieved, the implementation of the first year of production to evaluate and select traits of interest will lead to higher genetic progress. Grain yield per spike would seem to be the central trait to select for to improve grain yield, although in geographic regions where vernalization supply is limited, spikes per plant could be another important trait to consider. Under field conditions and where Intermediate wheatgrass was managed as a dual-purpose crop, no trade-offs were detected between reproductive components and aboveground biomass, suggesting the possibility of simultaneous improvement for both grain and forage yield. Performing one selection cycle per year would allow such a simple breeding method as massal to obtain significant genetic progress even in the first few cycles of breeding, which could be key to the geographical expansion of Intermediate wheatgrass.

4.7. REFERENCES

Altendorf, K. R., DeHaan, L. R., Heineck, G. C., Zhang, X., & Anderson, J. A. (2021). Floret site utilization and reproductive tiller number are primary components of grain yield in intermediate wheatgrass spaced plants. *Crop Science*, *61*(2), 1073-1088. <https://doi.org/10.1002/csc2.20385>

- Araghi, B., Barati, M., Majidi, M. M., & Mirlohi, A. (2014). Application of half-sib mating for genetic analysis of forage yield and related traits in *Bromus inermis*. *Euphytica*, *196*(1), 25-34. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1011-2>
- Armstead, I. P., Turner, L. B., Marshall, A. H., Humphreys, M. O., King, I. P., & Thorogood, D. (2008). Identifying genetic components controlling fertility in the outcrossing grass species perennial ryegrass (*Lolium perenne*) by quantitative trait loci analysis and comparative genetics. *New Phytologist*, *178*(3), 559-571. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02413.x>
- Ashworth, A. J., Katuwal, S., Moore Jr, P. A., Adams, T., Anderson, K., & Owens, P. R. (2023). Perenniality drives multifunctional forage–biomass filter strips’ ability to improve water quality. *Crop Science*, *63*(1), 336-348. <https://doi.org/10.1002/csc2.20878>
- Bajgain, P., Zhang, X., & Anderson, J. A. (2019). Genome-wide association study of yield component traits in intermediate wheatgrass and implications in genomic selection and breeding. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *9*(8), 2429-2439. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400073>
- Bajgain, P., Crain, J. L., Cattani, D. J., Larson, S. R., Altendorf, K. R., Anderson, J. A., ... & Hu, Y. (2022). Breeding Intermediate Wheatgrass for Grain Production. *Plant Breeding Reviews*, *Volume 46*, 119.
- Bean, E. W. (1972). Clonal evaluation for increased seed production in two species of forage grasses, *Festuca arundinacea* Schreb. and *Phleum pratense* L. *Euphytica*, *21*(2), 377-383. <https://doi.org/10.1007/BF00036778>
- Bhatti, A. U., Mulla, D. J., Koehler, F. E., & Gurmani, A. H. (1991). Identifying and removing spatial correlation from yield experiments. *Soil Science Society of America Journal*, *55*(6), 1523-1528. <https://doi.org/10.2136/sssaj1991.03615995005500060004x>
- Biscoe, P. V., & Willington, V. B. A. (1984). Environmental effects on dry matter production. In *Nitrogen requirement of cereals: proceedings of a conference organised by the Agricultural Development and Advisory Service, September 1982*. London: HMSO.

- Boelt, B., & Studer, B. (2010). Breeding for grass seed yield. In B. Boller et al. (Eds.), *Fodder crops and amenity grasses* (pp. 161-174). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0760-8_7
- Brisson, N., Mary, B., Ripoche, D., Jeuffroy, M. H., Ruget, F., Nicoullaud, B., Gate, P., Devienne-Barret, F., Antonioletti, R., Dürr, C., Richard, G., Beaudoin, N., Recous, S., Tayot, X., Plenet, D., Cellier, P., Machet, J. M.M., Meynard, J. M. J. M., & Delécolle, R. (1998). STICS: A generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. *Agronomie*, 18(5-6), 311-346. <https://doi.org/10.1051/agro:19980501>
- Brisson, N., Ruget, F., Gate, P., Lorgeou, J., Nicoullaud, B., Tayot, X., Plenet, D., Jeuffroy, M.-H., Bouthier, A., Ripoche, D., Mary, B., & Justes, E. (2002). STICS: A generic model for simulating crops and their water and nitrogen balances. II. Model validation for wheat and maize. *Agronomie*, 22(1), 69-92. <https://doi.org/10.1051/agro:2001005>
- Brisson, N., Launay, M., Mary, B., Beaudoin, N. & (2008). *Conceptual basis, formalisations and parameterization of the STICS crop model*. Éditions Quae, c/o INRA.
- Bugge, G. (1987). Selection for seed yield in *Lolium perenne* L. *Plant breeding*, 98(2), 149-155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1987.tb01108.x>
- Cattani, D. J., & Asselin, S. R. (2018). Has selection for grain yield altered intermediate wheatgrass? *Sustainability*, 10(3), 688. <https://doi.org/10.3390/su10030688>
- Cattani, D. J. (2016). Selection of a perennial grain for seed productivity across years: intermediate wheatgrass as a test species. *Canadian Journal of Plant Science*, 97(3), 516-524. <https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0280>
- Comstock, R.E., & R.H. Moll. 1963. Genotype x environment interactions. In W. D., Hanson & H. F. Robinson (Eds.), *Statistical genetics and plant breeding* (p. 164-166). NAS-NRC Publ. 982, Washington, DC.
- Crain, J., Haghhighattalab, A., DeHaan, L., & Poland, J. (2021). Development of whole-genome prediction models to increase the rate of genetic gain in intermediate

- wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) breeding. *The Plant Genome*, 14(2), e20089. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20089>
- Das, M. K., & Taliaferro, C. M. (2009). Genetic variability and interrelationships of seed yield and yield components in switchgrass. *Euphytica*, 167(1), 95-105. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9866-3>
- DeHaan, L. R., Van Tassel, D. L., & Cox, T. S. (2005). Perennial grain crops: A synthesis of ecology and plant breeding. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 20(1), 5-14. <https://doi.org/10.1079/RAF200496>
- DeHaan, L., Christians, M., Crain, J., & Poland, J. (2018). Development and evolution of an intermediate wheatgrass domestication program. *Sustainability*, 10(5), 1499. <https://doi.org/10.3390/su10051499>
- Dewey, D. R. (1962). The genome structure of intermediate wheatgrass. *Journal of Heredity*, 53(6), 282-290. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107196>
- Duchene, O., Dumont, B., Cattani, D. J., Fagnant, L., Schlautman, B., DeHaan, L. R., Barriball, S., Jungers, J. M., Picasso, V. D., David, C., & Celette, F. (2021). Process-based analysis of *Thinopyrum intermedium* phenological development highlights the importance of dual induction for reproductive growth and agronomic performance. *Agricultural and Forest Meteorology*, 301, 108341. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108341>
- Edwards, J. T., Carver, B. F., Horn, G. W., & Payton, M. E. (2011). Impact of dual-purpose management on wheat grain yield. *Crop Science*, 51(5), 2181-2185. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.01.0043>
- Elgersma, A. (1990). Heritability estimates of spaced-plant traits in three perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. *Euphytica*, 51(2), 163-171. <https://doi.org/10.1007/BF00022447>
- Evans, L. T. (1964). Reproduction. In C. Barnard (Ed.), *Grasses and grasslands* (pp. 126–153). Macmillan.
- Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C (Eds.). (1996). *Introduction to quantitative genetics* (4th ed.). Addison Wesley Longman: Harlow, UK.

- Favre, J. R., Castiblanco, T. M., Combs, D. K., Wattiaux, M. A., & Picasso, V. D. (2019). Forage nutritive value and predicted fiber digestibility of Kernza intermediate wheatgrass in monoculture and in mixture with red clover during the first production year. *Animal Feed Science and Technology*, 258, 114298. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114298>
- Fernandez, C. W., Ehlke, N., Sheaffer, C. C., & Jungers, J. M. (2020). Effects of nitrogen fertilization and planting density on intermediate wheatgrass yield. *Agronomy Journal*, 112(5), 4159-4170. <https://doi.org/10.1002/agj2.20351>
- Fischer, R. A., & Maurer O, R. (1976). Crop temperature modification and yield potential in a dwarf spring wheat 1. *Crop science*, 16(6), 855-859. <https://doi.org/10.2135/cropsci1976.0011183X001600060031x>
- Frahm, C. S., Tautges, N. E., Jungers, J. M., Ehlke, N. J., Wyse, D. L., & Sheaffer, C. C. (2018). Responses of intermediate wheatgrass to plant growth regulators and nitrogen fertilizer. *Agronomy Journal*, 110(3), 1028-1035. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.11.0635>
- González-Paleo, L., & Ravetta, D. A. (2011). Indirect changes associated with a selection program for increased seed-yield in wild species of *Lesquerella* (Brassicaceae): Are we developing a phenotype opposite to the expected ideotype? *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1372-1380. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.006>
- Griffiths, D. J., Lewis, J., & Bean, E. W. (1966). Problems of breeding for seed production in grasses. *Proceeding of the 10th International Grassland Congress, Helsinki, Finland*. (pp. 749-754). Valtioneuvoston kirjagiano.
- Harrison, M. T., Evans, J. R., Dove, H., & Moore, A. D. (2011). Dual-purpose cereals: can the relative influences of management and environment on crop recovery and grain yield be dissected? *Crop and Pasture Science*, 62(11), 930-946. <https://doi.org/10.1071/CP11066>
- Hay, R. K. M. (1995). Harvest index: a review of its use in plant breeding and crop physiology. *Annals of applied biology*, 126(1), 197-216. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1995.tb05015.x>

- Hill, C. B., Angessa, T. T., McFawn, L. A., Wong, D., Tibbits, J., Zhang, X. Q., ... & Li, C. (2019). Hybridisation-based target enrichment of phenology genes to dissect the genetic basis of yield and adaptation in barley. *Plant biotechnology journal*, 17(5), 932-944. <https://doi.org/10.1111/pbi.13029>
- Holland, J. B., Nyquist, W. E., Cervantes-Martínez, C. T., & Janick, J. (2003). Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. *Plant breeding reviews*, 22.
- Hopkins, A. A., Krenzer, E. G., Horn, G. W., Goad, C. L., Redmon, L. A., Redfearn, D. D., & Reuter, R. R. (2003). Spring Grazing Reduces Seed Yield of Cool-Season Perennial Grasses Grown in the Southern Great Plains. *Agronomy journal*, 95(4), 855-862. <https://doi.org/10.2134/agronj2003.8550>
- Huff, D. R. (2010). Bluegrasses. In B. Boiler, F. Veronesi & U. Posselt (Eds.), *Fodder crops and amenity grasses*. Handbook of plant breeding (pp. 345-379). New York, Springer.
- Humphreys, M., Feuerstein, U., Vandewalle, M. & Baert, J. (2010). Ryegrasses. In B. Boiler, F. Veronesi & U. Posselt (Eds.), *Fodder crops and amenity grasses*. Handbook of plant breeding (pp. 211-260). New York, Springer.
- Hunter, M. C., Sheaffer, C. C., Culman, S. W., & Jungers, J. M. (2020a). Effects of defoliation and row spacing on intermediate wheatgrass I: Grain production. *Agronomy Journal*, 112(3), 1748-1763. <https://doi.org/10.1002/agj2.20128>
- Hunter, M. C., Sheaffer, C. C., Culman, S. W., Lazarus, W. F., & Jungers, J. M. (2020b). Effects of defoliation and row spacing on intermediate wheatgrass II: Forage yield and economics. *Agronomy Journal*, 112(3), 1862-1880. <https://doi.org/10.1002/agj2.20128>
- Ivancic, K., Locatelli, A., Tracy, W. F., & Picasso, V. (2021). Kernza intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) response to a range of vernalization conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, 101(5), 770-773. <https://doi.org/10.1139/cjps-2020-0251>
- Jafari, A. A., Setavarz, H., & Alizadeh, M. A. (2006). Genetic variation for and correlations among seed yield and seed components in tall fescue. *Journal of New Seeds*, 8(4), 47-65. https://doi.org/10.1300/J153v08n04_04

- Johnson, R. C., & Kanemasu, E. T. (1983). Yield and development of winter wheat at elevated temperatures 1. *Agronomy Journal*, 75(3), 561-565. <https://doi.org/10.2134/agronj1983.00021962007500030033x>
- Jungers, J. M., Frahm, C. S., Tautges, N. E., Ehlke, N. J., Wells, M. S., Wyse, D. L., & Sheaffer, C. C. (2018). Growth, development, and biomass partitioning of the perennial grain crop *Thinopyrum intermedium*. *Annals of Applied Biology*, 172(3), 346-354. <https://doi.org/10.1111/aab.12425>
- Jungers, J. M., DeHaan, L. H., Mulla, D. J., Sheaffer, C. C., & Wyse, D. L. (2019). Reduced nitrate leaching in a perennial grain crop compared to maize in the Upper Midwest, USA. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 272, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.11.007>
- Jungers, J. M., Schiffner, S., Sheaffer, C., Ehlke, N. J., DeHaan, L., Torrion, J., ... & Franco, J. (2022). Effects of seeding date on grain and biomass yield of intermediate wheatgrass. *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.1002/agj2.21083>
- Kang, M. S. (1997). Using genotype-by-environment interaction for crop cultivar development. *Advances in Agronomy*, 62, 199-252. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60569-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60569-6)
- Kalton, R. R., Barker, R. E., & Welty, R. E. (1996). Seed production. *Cool-Season Forage Grasses*, 34, 383-411. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr34.c13>
- Knowles, R. P. (1977). Recurrent Mass Selection for Improved Seed Yields in Intermediate Wheatgrass. *Crop Science*, 17(1), 51-54. <https://doi.org/10.2135/cropsci1977.0011183X001700010015x>
- Larson, S., DeHaan, L., Poland, J., Zhang, X., Dorn, K., Kantarski, T., ... & Jensen, K. (2019). Genome mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling domestication traits of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *Theoretical and Applied Genetics*, 132(8), 2325-2351. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03357-6>
- Law, E. P., Wayman, S., Pelzer, C. J., Culman, S. W., Gómez, M. I., DiTommaso, A., & Ryan, M. R. (2022). Multi- criteria assessment of the economic and environmental sustainability characteristics of intermediate wheatgrass grown

- as a dual- purpose grain and forage crop. *Sustainability*, 14(6), 3548.
<https://doi.org/10.3390/su14063548>
- Lima, D. C., Abreu, Â. D. F. B., Ferreira, R. A. D. C., & Ramalho, M. A. P. (2015). Breeding common bean populations for traits using selection index. *Scientia Agricola*, 72, 132-137. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0130>
- Locatelli, A., Gutierrez, L., & Picasso Risso, V. D. (2022). Vernalization requirements of Kernza intermediate wheatgrass. *Crop Science*, 62(1), 524-535.
<https://doi.org/10.1002/csc2.20667>
- Locatelli, A., Gutierrez, L., Duchene, O., Speranza, P. R., & Picasso Risso, V. D. (2023). Agronomic assessment of two populations of intermediate wheatgrass—Kernza® (*Thinopyrum intermedium*) in temperate South America. *Grassland Research*.
- Loss, S. P., & Siddique, K. H. M. (1994). Morphological and physiological traits associated with wheat yield increases in Mediterranean environments. *Advances in agronomy*, 52, 229-276.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60625-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60625-2)
- Mahelka, V., Kopecký, D., & Paštová, L. (2011). On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC evolutionary biology*, 11(1), 1-17.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-127>
- McNeal, F. H., Qualset, C. O., Baldridge, D. E., & Stewart, V. R. (1978). Selection for Yield and Yield Components in Wheat. *Crop Science*, 18(5), 795-799.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050027x>
- Majidi, M. M., Mirlohi, A., & Amini, F. (2009). Genetic variation, heritability and correlations of agro-morphological traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Euphytica*, 167(3), 323-331. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9887-6>
- Majidi, M. M., Hoseini, B., Abtahi, M., Mirlohi, A., & Araghi, B. (2015). Genetic analysis of seed related traits in Orchardgrass (*Dactylis glomerata*) under normal and drought stress conditions. *Euphytica*, 203(2), 409-420.
<https://doi.org/10.1007/s10681-014-1299-6>

- Majidi, M. M., Bahrami, S., Abtahi, M., Mirlohi, A., & Araghi, B. (2017). Genetic analysis of seed-related traits in smooth brome grass (*Bromus inermis*) under well-watered and water-stressed conditions. *Grass and Forage Science*, 72(1), 163-173. <https://doi.org/10.1111/gfs.12230>
- Midmore, D. J., Cartwright, P. M., & Fischer, R. A. (1982). Wheat in tropical environments. I. Phasic development and spike size. *Field Crops Research*, 5, 185-200. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(82\)90022-3](https://doi.org/10.1016/0378-4290(82)90022-3)
- Milla, R., Morente-López, J., Alonso-Rodrigo, J. M., Martín-Robles, N., & Stuart Chapin III, F. (2014). Shifts and disruptions in resource-use trait syndromes during the evolution of herbaceous crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1793), 20141429. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1429>
- Moore, K. J., Moser, L. E., Vogel, K. P., Waller, S. S., Johnson, B. E., & Pedersen, J. F. (1991). Describing and quantifying growth stages of perennial forage grasses. *Agronomy Journal*, 83(6), 1073-1077. <https://doi.org/10.2134/agronj1991.00021962008300060027x>
- Mortenson, J. S., Waldron, B. L., Larson, S. R., Jensen, K. B., DeHaan, L. R., Peel, M. D., ... & Creech, J. E. (2019). Quantitative trait loci (QTL) for forage traits in intermediate wheatgrass when grown as spaced-plants versus monoculture and polyculture swards. *Agronomy*, 9(10), 580. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100580>
- Nguyen, H. T., & Sleper, D. A. (1983a). Genetic variability of seed yield and reproductive characters in tall fescue. *Crop Science*, 23(4), 621-626. <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300040006x>
- Nguyen, H. T., & Sleper, D. A. (1983b). Theory and application of half-sib matings in forage grass breeding. *Theoretical and applied genetics*, 64(3), 187-196. <https://doi.org/10.1007/BF00303763>
- Nishio, Z., Ito, M., Tabiki, T., Nagasawa, K., Yamauchi, H., & Hirota, T. (2013). Influence of Higher Growing-season Temperatures on Yield Components of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Science*, 53(2), 621-628. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.05.0331>

- Olugbenle, O., Pinto, P., & Picasso, V. D. (2021). Optimal planting date of Kernza intermediate wheatgrass intercropped with red clover. *Agronomy*, *11*(11), 2227. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112227>
- Pastor-Pastor, A., Vilela, A. E., & González-Paleo, L. (2019). The root of the problem of perennials domestication: is selection for yield changing key root system traits required for ecological sustainability? *Plant and Soil*, *435*, 161-174. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3885-1>
- Philipp, N., Weichert, H., Bohra, U., Weschke, W., Schulthess, A. W., & Weber, H. (2018). Grain number and grain yield distribution along the spike remain stable despite breeding for high yield in winter wheat. *PLoS One*, *13*(10), e0205452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205452>
- Pinto, P., De Haan, L., & Picasso, V. (2021). Post-harvest management practices impact on light penetration and Kernza intermediate wheatgrass yield components. *Agronomy*, *11*(3), 442. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030442>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.Rproject.org/>
- Rawson, H. M., & Bagga, A. K. (1979). Influence of temperature between floral initiation and flag leaf emergence on grain number in wheat. *Functional Plant Biology*, *6*(3), 391-400. <https://doi.org/10.1071/PP9790391>
- Reilly, E. C., Gutknecht, J. L., Tautges, N. E., Sheaffer, C. C., & Jungers, J. M. (2022). Nitrogen transfer and yield effects of legumes intercropped with the perennial grain crop intermediate wheatgrass. *Field Crops Research*, *286*, 108627. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108627>
- Richards, J. H. (1993). *Physiology of plants recovering from defoliation*. In M.J. Baker (ed.), *Proceedings of the XVII International Grassland Congress*, 8-21 February, Palmerston North, New Zealand (pp. 85–94). New Zealand Grassland Association.
- Richards, R. A. (1991). Crop improvement for temperate Australia: future opportunities. *Field Crops Research*, *26*(2), 141-169. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(91\)90033-R](https://doi.org/10.1016/0378-4290(91)90033-R)

- Saha, M. C. (2014). Tall Fescue. In H. Cai, T. Yamada, & C. Kole (ed.), *Genetics, genomics and breeding of forage crops* (pp. 58-89). CRC Press.
- Sampoux, J. P., Baudouin, P., Bayle, B., Béguier, V., Bourdon, P., Chosson, J. F., ... & Viguié, A. (2011). Breeding perennial grasses for forage usage: An experimental assessment of trait changes in diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars released in the last four decades. *Field Crops Research*, 123(2), 117-129. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.05.007>
- SAS Institute. (2004). *Statistical analysis system online documentation*. SAS Institute, Inc.
- Searle, S. R. (1965). The value of indirect selection: I. Mass selection. *Biometrics*, 682-707. <https://doi.org/10.2307/2528550>
- Silvertown, J., & Dodd, M. (1996). Comparing plants and connecting traits. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1345), 1233-1239. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0106>
- Slafer, G. A., & Rawson, H. M. (1994). Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Functional Plant Biology*, 21(4), 393-426. <https://doi.org/10.1071/PP9940393>
- Smaje, C. (2015). The strong perennial vision: A critical review. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 39(5), 471-499. <https://doi.org/10.1080/21683565.2015.1007200>
- Snyder, F. W., & Carlson, G. E. (1984). Selecting for partitioning of photosynthetic products in crops. *Advances in Agronomy*, 37, 47-72. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60451-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60451-4)
- Slinkard, A. E. (1965). Fertility in Intermediate Wheatgrass *Agropyron* intermedium (Host) Beauv. *Crop Science*, 5(4), 363-365. <https://doi.org/10.2135/cropsci1965.0011183X000500040024x>
- Sprunger, C. D., Culman, S. W., Peralta, A. L., DuPont, S. T., Lennon, J. T., & Snapp, S. S. (2019). Perennial grain crop roots and nitrogen management shape soil

- food webs and soil carbon dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 137, 107573. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107573>
- Studer, B., Jensen, L. B., Hentrup, S., Brazauskas, G., Kölliker, R., & Lübberstedt, T. (2008). Genetic characterisation of seed yield and fertility traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 117(5), 781-791. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0819-y>
- Thiele, J., Jørgensen, R. B., & Hauser, T. P. (2009). Flowering does not decrease vegetative competitiveness of *Lolium perenne*. *Basic and Applied Ecology*, 10(4), 340-348. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2008.04.002>
- Vico, G., Manzoni, S., Nkurunziza, L., Murphy, K., & Weih, M. (2016). Trade-offs between seed output and life span—a quantitative comparison of traits between annual and perennial congeneric species. *New Phytologist*, 209(1), 104-114. <https://doi.org/10.1111/nph.13574>
- Vilela, A. E., & González-Paleo, L. (2015). Changes in resource-use strategy and phenotypic plasticity associated with selection for yield in wild species native to arid environments. *Journal of Arid Environments*, 113, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.09.005>
- Vogel, K. P., Gorz, H. J., & Askinns F. A. (1989). Breeding grasses for the future. In D. A. Sleper, K. H. Asay & J. F. Pedersen (Eds.), *Contributions from Breeding Forage and Turf Grasses* (pp. 105-122). Crop Science Special Publ. 15. Crop Science Society of America, Madison, WI.
- Wagoner, P., & Schaeffer, J. R. (1990). Perennial grain development: past efforts and potential for the future. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9(5), 381-408. <https://doi.org/10.1080/07352689009382298>
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., & Zemla, J. (2017). Package ‘corrplot’. *Statistician*, 56(316), e24. <https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>
- Zhang, X., Sallam, A., Gao, L., Kantarski, T., Poland, J., DeHaan, L. R., ... & Anderson, J. A. (2016). Establishment and optimization of genomic selection to accelerate the domestication and improvement of intermediate wheatgrass. *The Plant*

Genome, 9(1), plantgenome 2015-07.
<https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.07.0059>

Zimbric, J. W., Stoltenberg, D. E., & Picasso, V. D. (2020a). Effective weed suppression in dual-use intermediate wheatgrass systems. *Agronomy Journal*, 112(3), 2164-2175. <https://doi.org/10.1002/agj2.20194>

Zimbric, J. W., Stoltenberg, D. E., & Picasso, V. D. (2021b). Strategies to reduce plant height in dual-use intermediate wheatgrass cropping systems. *Agronomy Journal*, 113(2), 1563-1573. <https://doi.org/10.1002/agj2.20544>

4.8. ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Kernza intermediate wheatgrass breeder Lee DeHaan from The Land Institute for sharing the germplasm from which the populations used in this study were developed. This research was funded by competitive grants from Fondo María Viñas of ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay) to A.L., and full-time funds (DT, UDELAR, Uruguay) granted to A.L. We are also grateful to the Experimental Station “Dr. Mario A. Cassinoni” staff for their help in both laboratory and field activities throughout the experiment.

5. DISCUSIÓN GENERAL. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. 5.1. DISCUSIÓN GENERAL

5.1.1. Adaptación agronómica de Tinopiro a bajas latitudes

Tinopiro ha mostrado adaptación a amplias zonas del norte de Europa y América del Norte clasificadas según la clasificación de Köppen de zonas frías (grupo D, temperatura media del mes más frío ≤ 0 °C) y también para algunas zonas templadas (grupo C, temperatura media del mes más frío entre 0 y 18 °C; Peel et al., 2007). La definición de Köppen de zonas templadas incluye un grupo diverso de ambientes en algunos de los cuales se cumplen sistemáticamente los requisitos de vernalización de

las gramíneas de estación fría (Heide, 1994), incluido el trigo invernal (Ahrens, 1957), mientras que otros no acumulan días de temperaturas frías como para cumplir esos requisitos. En las regiones templadas de baja latitud de América del Sur, los principales cultivos de invierno son el trigo, la cebada y la colza, cuyos cultivares son en su mayoría primaverales. Los inviernos son suaves y las temperaturas aumentan rápidamente durante la primavera, por lo que la antesis tardía provoca el llenado del grano bajo temperaturas altas, lo que disminuye el rendimiento (Locatelli et al., 2022). La expansión geográfica de un cultivo con múltiples atributos como Tinopiro, pero con requerimientos de vernalización (Ivancic et al., 2021) a estas regiones templadas con inviernos suaves, podría verse seriamente amenazada para su uso como cultivo doble propósito.

Según los resultados del primer capítulo de esta tesis, el comportamiento reproductivo de Tinopiro aumenta hasta las 7 semanas de incubación a 5 °C y 10 h, lo que demuestra que existe una fuerte dependencia del porcentaje de floración sobre el tiempo de exposición al frío en días cortos (10 h). Además, los requisitos de frío para inducción primaria de Tinopiro son relativamente menores que en otras gramíneas. Otras gramíneas perennes requieren períodos más largos de exposición a temperaturas frías para inducir la floración. Por ejemplo, los cultivares escandinavos de *Festuca pratensis* L. que, aunque poseen una respuesta logística entre el porcentaje floración y el tiempo de incubación a 10 h de fotoperíodo y 6 °C, requirieron 16-20 semanas de incubación en frío para una floración completa (Heide, 1988). De forma similar, las poblaciones de *Festuca rubra* L. necesitaron 15-21 semanas a 6 °C y 8 h de fotoperíodo para inducirse completamente (Heide, 1990). El alpiste, *Phalaris arundinacea* L. también posee mayores requerimientos de inducción primaria, 12-14 semanas para alcanzar la plena floración a 6 °C y 8 h de fotoperíodo (Heichel et al., 1980). La variabilidad detectada dentro de cada una de las especies en cuanto a sus requerimientos de día corto, así como de frío para inducción temprana, ha sido ampliamente documentada (Heide, 1994, Cooper, 1960, Ketellapper, 1960). Para raigrás perenne (*Lolium perenne* L.), por ejemplo, bajo condiciones de inducción a 6 °C y 8 h se detectaron genotipos que florecieron completamente desde 6 semanas a 12 semanas bajo esas condiciones (Amlid et al., 2000). Los requerimientos de

vernalización de Tinopiro podrían situarse entre aquellos genotipos de raigrás perenne con menores requerimientos de inducción primaria (tabla 1), en tanto que especies como *Phalaris aquatica* L., *Dactylis glomerata* L. y *Poa supine* Schrad. presentarían menores exigencias en sus requerimientos de inducción primaria (Heide, 2001, Heide, 1987, Ketellapper, 1960).

Tabla 1. Requerimientos de vernalización en orden creciente bajo condiciones de día corto (<10 h) de algunas gramíneas templadas.

Especie	Temperatura de incubación (°C)	Semanas de incubación	Referencia
<i>Dactylis glomerata</i> L.	9-12	10	Heide, 1987
<i>Triticum aestivum</i> L.	7	3-10	Trione y Metzger, 1970; Ahrens, 1957
<i>Schedonorus arundinaceus</i> (Schreb.) Dumort., nom. cons.	6	5-6	Hare, 1992
<i>Phalaris aquatica</i> L.	4	4-8	Ketellapper, 1960
<i>Thinopyrum intermedium</i> (Host) <u>Barkworth & D.R. Dewey</u>	5	7	
<i>Lolium perenne</i> L.	6	6-12	Aamlid et al., 2000
<i>Phalaris arundinacea</i> L.	6	12-14	Heichel et al., 1980
<i>Festuca rubra</i> L.	6	15-21	Heide, 1990
<i>Festuca pratensis</i>	6	16-20	Heide, 1988

Nota. El posicionamiento de las especies según sus requerimientos de vernalización es tentativo, ya que para la mayoría de las especies se ha identificado mucha variabilidad intraespecie.

5.1.1.1. Comportamiento reproductivo

Aunque los requerimientos de inducción primaria de Tinopiro pueden catalogarse según nuestro trabajo como moderados, podemos confirmar que pueden ser una limitante importante para la producción de grano en regiones de baja latitud. Si consideramos los antecedentes en Tinopiro más importantes en este tema previos a nuestro trabajo, el porcentaje mayor de plantas florecidas (83 %) se logró con 4 °C y 10 h durante 7 semanas de inducción primaria en poblaciones adaptadas a regiones de alta latitud (Ivancic et al., 2021). Esos resultados y los nuestros nos permiten establecer que con el actual germoplasma desarrollado en altas latitudes será muy difícil lograr buenos resultados reproductivos en regiones de baja latitud con inviernos suaves como, por ejemplo, la mayoría de las zonas ubicadas en las áreas categorizadas por Rivelli et al. (2021) como central (30-35° latitud sur) y norte (30-25° latitud sur) del Cono Sur. De todas formas, a partir de los resultados de planta individual del primer trabajo se observó que, para la mayoría de los componentes de rendimiento en grano evaluados (espigas por planta, espiguillas por espiga, espiguillas por planta, peso de espigas por planta, peso por espiga, peso por espiguilla), la variabilidad fenotípica observada según tratamiento de inducción por frío fue muy importante, intensificándose esta variabilidad en los tratamientos de 3 a 5 semanas de duración. En este mismo sentido, el rendimiento reproductivo obtenido a campo en Uruguay en el segundo trabajo de la tesis, considerando las plantas que lograron florecer, se asemeja bastante al observado en el hemisferio norte, donde Tinopiro ya cuenta con varios ciclos acumulados de domesticación. Aunque en el primer trabajo no hayamos detectado muchas diferencias entre las poblaciones utilizadas en los caracteres agronómicos medidos, suponemos que gran parte de esa variabilidad se encuentra dentro de cada una de las poblaciones, lo que es esperable en este tipo de especie con fecundación cruzada obligada (Saha, 2014). Sin embargo, si nos centramos en la comparación de los resultados de los grupos control (Kansas vs. Minnesota), podemos ver claras diferencias para la mayoría de las variables medidas, específicamente, el grupo Minnesota presentaría menores requerimientos para floración que el grupo Kansas. En resumen, estos resultados

resaltan la presencia de germoplasma base valioso con capacidad para producir grano y ser mejorado en regiones templadas de inviernos más suaves.

Si consideramos que las temperaturas promedio invernales a las que fueron sometidas las plantas en Paysandú durante el primer año del segundo trabajo para los meses de junio, julio y agosto fueron 10,2, 10,3 y 11,1 °C, respectivamente, podemos suponer que los estímulos de frío ofrecidos estarían bastante por debajo de los óptimos establecidos en el primer trabajo de esta tesis. Sin embargo, para ese primer año, el segundo estudio de esta tesis reporta que el porcentaje de floración promedio para las dos poblaciones estudiadas en Paysandú fue de 47,5 % y que las 90 plantas seleccionadas por ciclo corto durante el primer año tuvieron un promedio de 23 espigas por planta. Este hecho podría estar sugiriendo un control parcial de los estímulos de día corto sobre la inducción primaria, lo cual ya ha sido observado en muchas otras gramíneas perennes (Heide, 1994). La duración media del día durante los tres meses de invierno en Paysandú oscila entre 10,1 y 11 h (información complementaria: tabla S1, anexos correspondientes al artículo 2), por lo que puede considerarse que durante todo el período de inducción primaria las plantas fueron sometidas a estímulos de día corto. Debido a que para muchas gramíneas perennes se ha observado que los estímulos requeridos de frío y duración de día para inducción primaria pueden ser intercambiables (Heide, 1994), podríamos sugerir que los estímulos de día corto pudieron haber suplido parcialmente la falta de horas de frío en Paysandú. Similares valores de floración para Tinopiro fueron obtenidos por Ivancic et al. (2021) con inducción en cámara de crecimiento por 7 semanas a 10 °C y 10 h. Por otro lado, otro factor que podría explicar el bajo porcentaje de floración en esta región es la oferta de días largos necesarios para la inducción secundaria. Para gramíneas perennes invernales, los fotoperíodos críticos para la inducción secundaria pueden variar de 9 h a más de 16 h en los ecotipos mediterráneos (Heide, 1994). El fotoperíodo en los meses inductivos (agosto, septiembre, octubre, noviembre) en Paysandú oscila entre 11 y 14 h (información complementaria: tabla S1, anexos correspondientes al artículo 2), por lo que parte del germoplasma evaluado podría tener mayores requerimientos de día largo. Además, el grado en que se hayan completado los requisitos de inducción primaria puede estar modificando las exigencias de los requisitos para inducción

secundaria; es decir, cuanto más completo sea el proceso de inducción primaria, menos ciclos de días largos pueden ser necesarios en la inducción secundaria (Heide, 1994, Evans, 1964). Este hecho podría explicar el alto número de plantas florecidas muy tardíamente dentro de la población (diciembre y enero), posiblemente en estas plantas (datos no mostrados) no se hayan cubierto los requerimientos de inducción primaria, por lo que muchos ciclos de día largo fueron necesarios para lograr la floración. Por otra parte, si bien procesos de desvernalización han sido reportados en gramíneas perennes como *Festuca pratensis* (Heide et al., 1988), dichos procesos son asociados a cambios bruscos de temperatura que suceden en experimentos de cámara de crecimiento, pero no bajo condiciones de campo (Preston y Fjellheim, 2022).

Además del continuo interés en aumentar el rendimiento en grano en la especie, existe consenso en atender el problema de su disminución a lo largo de los años para su adopción (Hunter et al., 2020a, Lanker et al., 2019). El rendimiento de grano en el segundo año de producción en Paysandú decreció drásticamente en relación con el primer año. Este hecho podría ser explicado en parte por la menor oferta de frío para los meses inductivos del segundo año con respecto al primero (información complementaria: tabla S1, anexos correspondientes al artículo 2). Los meses invernales del segundo año fueron más cálidos, lo que dio lugar a una menor acumulación de UPVT (unidades fotovernalotérmicas) a partir de una menor acumulación de VU (unidades de vernalización) para la segunda cosecha de grano. Las menores VU acumuladas en el segundo año pudieron haber conducido tanto a menores porcentajes de espigazón como a un menor número de tallos fértiles, lo que puede haber contribuido a la disminución en el rendimiento de grano. En este estudio, la acumulación de VU para el segundo año (29 VU) fue menor que para el primer año (43) y también menor al óptimo reportado por el primer trabajo de esta tesis bajo condiciones controladas (49 VU) y 10 h y por Duchene et al. (2021) bajo condiciones de campo en Europa (71 VU), o el mínimo VU necesario reportado por Jungers et al. (2022) para producir grano en experimentos de campo en América del Norte (78 VU).

5.1.1.2. Comportamiento agronómico y desafíos emergentes

La fuerte disminución de rendimiento en grano en el segundo año de producción pudo verse afectada por el enmalezamiento y el manejo de la defoliación, además de la menor oferta de estímulos vernalizantes. En el segundo año fue notorio el aumento de la presencia de malezas, de las cuales el raigrás anual fue la maleza dominante. Esta especie se encuentra naturalizada en Uruguay, por lo que era esperable la existencia de un banco de semillas considerable en el suelo (semillas producidas antes de la cosecha de grano del primer año), lo que sumado al gran intervalo entre las cosechas de forraje y grano pueden explicar este aumento de su biomasa para el segundo año. El momento de las cosechas de forraje afecta a la producción de semillas de raigrás anual, lo que tiene un fuerte impacto en su posterior invasión (Piltz et al., 2021). Además, la abundancia de esta maleza también puede verse incrementada por su corto ciclo de vida, ya que puede completar su ciclo entre dos cosechas de forraje consecutivas (Meiss et al., 2010). Asumiendo una temperatura base de 0 °C, el ciclo fenológico total (emergencia-madurez fisiológica) del raigrás anual puede alcanzarse entre 750 y 1000 GDD (Cousens, 1996). Por lo tanto, a partir de la primera cosecha de forraje de invierno (julio de 2019), todas las semillas de raigrás en el suelo acumuladas antes de la cosecha de grano de Tinopiro del primer año podrían germinar y completar su ciclo a octubre o noviembre, mucho antes de lo que fue la segunda cosecha de grano de Tinopiro para el segundo año.

En el segundo año se observó una fuerte caída en la producción de forraje en comparación con la producción acumulada para el primer verano (momento de la primera cosecha de grano), contrariamente a lo reportado en experimentos del hemisferio norte (Law et al., 2021, Fernandez et al., 2020, Hunter et al., 2020b, Pugliese, 2017, Culman et al., 2013). Creemos que los mismos factores que afectaron el rendimiento de grano (enmalezamiento y manejo de la defoliación) pudieron afectar la producción de forraje. Además del momento, la intensidad de la cosecha de forraje también puede tener un fuerte efecto sobre el establecimiento de malezas. En efecto, la defoliación severa (es decir, de alta intensidad y de alta frecuencia) disminuye la supervivencia de las gramíneas perennes en las pasturas, lo que se ve exacerbado por

el aumento de la competencia de las especies invasoras y de las especies no palatables que se benefician del pastoreo intenso (es decir, más presión de pastoreo sobre las especies deseables) (O'connor, 1991). Para raigrás perenne, *Dactylis glomerata* L. y *Phleum pratense* L., Evans (1973) demostró que cortes por debajo de 5 cm incrementaron fuertemente la proporción de raíces muertas. Intensidades de corte entre 4 a 8 cm en raigrás perenne permitieron una reposición más rápida de carbohidratos solubles, los que se destinan a mantener sistemas radiculares más activos y a promover el macollaje (Lee et al., 2008, Donaghy y Fulkerson, 1998). Por lo tanto, la altura del rastrojo tras los cortes de forraje realizados en este experimento (2,5 cm) podría ser excesivamente baja, lo que puede haber provocado tasas de rebrote inferiores y haber favorecido la proliferación y la competitividad de malezas.

A pesar del impacto que el manejo de la defoliación y la proliferación de malezas pudo haber tenido en el experimento del segundo trabajo de la tesis, la producción acumulada de forraje de Tinopiro en los 2 primeros años (19320 kg MS ha⁻¹) fue similar a la producción media de forraje de los cultivares modernos de gramíneas perennes invernales evaluados en los mismos años en la evaluación oficial de cultivares INIA-INASE, con una fertilización anual de N de unos 100 kg ha⁻¹. De hecho, la producción acumulada de Tinopiro fue superior a la de *Dactylis glomerata* L. (15755 kg MS ha⁻¹) e inferior a la de la festuca alta (22344 kg MS ha⁻¹; INIA-INASE, 2022). Estos resultados a partir de germoplasma introducido subrayan el potencial de esta especie para la producción de forraje en estas latitudes.

Las cualidades forrajeras de Tinopiro podrían ser, en primera instancia, una gran ventaja del cultivo para su adopción en la región. No obstante, la valoración de su producción granífera requerirá de mayores esfuerzos en mejoramiento, transferencia de conocimiento y exploración en posibilidades de comercialización. Si consideramos que el rendimiento en grano de Tinopiro actual se encuentra bastante por debajo del rendimiento del trigo comercial, la adopción de Tinopiro en áreas de competencia con trigo se espera sea nula, en el corto plazo. No obstante, en la región, y en Uruguay en particular, la mayoría del trigo se realiza bajo un manejo de rotación continua con cultivos, solo el 7 % del área de siembra de este cultivo es efectuada sobre pasturas (DIEA, 2013). Este sistema es incapaz de mantener los rendimientos del cultivo a largo

plazo, incluso en zonas de alto potencial y con mayores aportes de nitrógeno, ya que se afectan negativamente cualidades del suelo como la concentración de N potencialmente mineralizable y la tasa de infiltración de agua (Ernst et al., 2018). La degradación del suelo producto de estos sistemas predominantes ha ocultado los aumentos de rendimiento en cereales anuales de invierno (trigo y cebada) producto del mejoramiento genético y el manejo (Rubio et al., 2021). En zonas de bajo potencial, esto no sería diferente, ya que el menor rendimiento puede reflejar otras limitaciones en el crecimiento de los cultivos que reducen el efecto perjudicial del sistema continuo de cultivos. En este contexto, Tinopiro en el mediano plazo podría ser incluido en las fases de pasturas perennes necesarias para recuperar las cualidades de suelo perdidas durante la fase de cultivos en zonas de alta producción, con el plus de la producción de grano. En zonas de bajo potencial o restrictivas, tanto por el deterioro progresivo del sistema agrícola dominante como por razones estructurales, el rendimiento alcanzable (rendimiento al que alcanzan aquellos productores con un manejo tecnológico recomendado) de cultivos comerciales como trigo es menor y presenta alta inestabilidad anual (Ernst et al., 2016), por lo que producir este tipo de cultivos no sería algo muy ventajoso. En estas condiciones, donde, además, la brecha entre el rendimiento alcanzable y actual son mayores para cultivos como trigo, Tinopiro podría cumplir un rol más protagónico dado sus aportes agrosistémicos, ya que, en muchos casos, los mantenimientos de magros rendimientos de grano de trigo son producto de altos aportes de insumos, lo que perjudica seriamente la sostenibilidad del sistema.

5.1.1.3. Posibilidades de mejoramiento genético

Incorporar a un grano perenne como Tinopiro en los sistemas agrícolas podría significar un hito dado sus servicios ecosistémicos. Sin embargo, su actual bajo rendimiento en grano es una de las principales limitantes para su adopción, por lo que los mayores esfuerzos en mejoramiento genético están dirigidos a reducir la brecha de rendimiento con los cereales anuales. Por otro lado, debido también a las cualidades forrajeras de Tinopiro, es esencial no afectar negativamente las variables forrajeras mientras se selecciona germoplasma de mayor rendimiento en grano. Tinopiro se está

desarrollando fuertemente en regiones de alta latitud, pero aún no se había implementado en regiones de baja latitud, por lo que explorar la variabilidad genética de interés existente para estas regiones y avanzar en los métodos y criterios de selección sería clave para su expansión geográfica hacia estas regiones.

Por características propias de la especie como la presencia de requerimientos de vernalización, la posibilidad de uso doble propósito y la poliploidía, su mejoramiento genético para regiones de baja latitud presenta un verdadero desafío. Al comparar en varios caracteres agronómicos la progenie de dos poblaciones que completaron su ciclo de vida en ambientes con estímulos vernalizantes contrastantes, no se observaron diferencias a favor de aquella población seleccionada en un ambiente sin temperaturas vernalizantes. Nuestros resultados eran esperables considerando que el progreso genético en especies poliploides, donde al menos alguna porción de las variables de interés puede presentar herencia polisómica, puede ser lento y que ambas poblaciones testeadas en Paysandú difirieron entre sí por solo un ciclo de selección por menores requerimientos de vernalización. Por otro lado, los estímulos de frío para la vernalización donde se produjo la semilla de la población B (semilla producida sin pasar por el invierno de Madison, Wisconsin) fueron más restrictivos que los ofrecidos en nuestro experimento en Paysandú. En Wisconsin, las plantas que formaron a la población B sufrieron temperaturas elevadas y crecientes desde la emergencia hasta el espigado de la planta (medias mensuales de temperatura: mayo 13 °C, junio 20 °C, julio 21 °C, agosto 19 °C, septiembre 17 °C). Aunque estas plantas probablemente fueron capaces de acumular algunas horas de frío nocturnas vernalizantes sin experimentar desvernalización, ya que el contraste con las temperaturas diurnas no es tan fuerte en condiciones de campo (Preston y Fjellheim, 2022), dicha acumulación fue muy insuficiente. En contraste, en Paysandú (Uruguay), las poblaciones sufrieron un invierno con temperaturas más bajas (junio 10,2 °C, julio 10,3 °C, agosto 11,1 °C). Por lo tanto, parte del germoplasma de la población A (semilla producida luego de pasar por un invierno de Madison, Wisconsin, y, por ende, en principio, con mayores requerimientos de vernalización) podría haber cumplido con los requerimientos de vernalización en Paysandú y, así, lograr mayores porcentajes de floración y componentes de rendimiento en grano a los esperados. La variabilidad detectada en

floración y en los componentes de rendimiento de grano mostrada en respuesta a diferentes estímulos vernalizantes en estudios de cámara de crecimiento por Ivancic et al. (2021) y por nuestros resultados del primer artículo podrían respaldar esta teoría.

La varianza intrafamilia para todos los caracteres agronómicos evaluados en el tercer artículo de la tesis fue mayor que entre familias de medios hermanos, lo que confirma lo que ya se ha observado para otras especies alógamas (Saha, 2014) y lo sugerido con los resultados del primer artículo, donde no pudimos detectar casi diferencias entre poblaciones, pero suponíamos que la mayor parte de la varianza se debería encontrar dentro de ellas. No obstante, la mayoría de los caracteres presentaron variación genética entre familias de medios hermanos significativa, lo que sugiere una fuerte proporción de varianza genética aditiva en dichos caracteres y, por ende, posibilidades de mejoramiento genético mediante selección fenotípica. Bajo esquemas de mejoramiento de selección genotípica que incluyan familias de medios hermanos, utilizar un método que utilice en la selección, además de la varianza entre familias, la varianza intrafamiliar podría generar mayor progreso genético (Casler y Brummer, 2008). Por otro lado, contar con información de familias de medios hermanos también puede ser muy relevante en esquemas de selección basados en el modelo animal cada vez más utilizado en plantas, el cual explota la información de los parientes para estimar los valores de reproducción o de cría de cada individuo emparentado en el pedigrí (Lynch y Walsh, 1998).

Las estimaciones de heredabilidad en sentido estricto fueron de moderadas a altas para la mayoría de los caracteres agronómicos evaluados, aunque las variaciones entre años fueron evidentes. Por lo tanto, sería esperable obtener respuestas sustanciales en estos caracteres con la utilización de métodos de selección fenotípica. Además, la mayoría de los caracteres evaluados no presentaron interacción genotipo x año o edad del cultivo, lo que podría significar lentos progresos genéticos (Kang, 1977). Algunos caracteres como producción de forraje en el verano, índice de cosecha, espigas por planta y espiguillas por planta presentaron altos valores de RSE (eficiencia en la respuesta a la selección) al seleccionarlos como carácter secundario al primer año con el objetivo de mejorar sus magnitudes para el segundo año (carácter primario). Si consideramos que el progreso por unidad de tiempo suele ser más importante que el

progreso por generación o ciclo (Falconer y Mackay, 1996), nuestros resultados demuestran que esperar a realizar la selección en el segundo año como se hace en la mayoría de las especies perennes forrajeras implicaría fuertes reducciones en la ganancia genética por unidad de tiempo para la mayoría de las variables evaluados. De todas formas, utilizar el primer año para la evaluación y selección repetidamente durante todo el programa de mejoramiento podría enmascarar la evolución de la perennidad, un carácter clave en el desarrollo de este tipo de cultivos.

El uso del primer año del cultivo como criterio de selección tanto en regiones de bajas como altas latitudes, además, estaría supeditado a lograr plantas con mínimo desarrollo (3 hojas) para mediados del otoño, es decir, plantas capaces de percibir todos los estímulos de frío ofertados (Jungers et al., 2022). Por el contrario, si las plantas no logran percibir suficientes estímulos vernalizantes, las magnitudes de los componentes de grano se verán afectados por este factor restrictivo y, seguramente, la utilización del primer año para selección no será representativa del comportamiento en el segundo año. En efecto, varios componentes de rendimiento en grano tuvieron muy altos GCV (coeficiente de variación genotípico), WFCV (coeficiente de variación dentro de familia) y heredabilidad en sentido estricto. Esto podría ser explicado por el impacto de la variabilidad en los requerimientos de vernalización del germoplasma utilizado, el cual fue evaluado en una región que no estaría cubriendo la totalidad de estímulos vernalizantes. El impacto sobre los componentes de rendimiento se basa en que, si una planta no cubre totalmente sus requisitos de vernalización, no implica necesariamente que sea incapaz de formar un tallo fértil. Esto también podría significar la formación de menos tallos fértiles o espigas en función de los requisitos de vernalización de cada planta, ya que los estímulos de vernalización recibidos por un tallo no se transfieren a otros tallos formados posteriormente (Evans, 1964). Por lo tanto, la variabilidad genética observada tanto en porcentaje de floración como en varios componentes de rendimiento en grano pudo incrementarse por la variabilidad genética del germoplasma en términos de requerimientos de vernalización.

Tinopiro, así como la mayoría de las gramíneas perennes forrajeras y de césped utilizadas en las regiones templadas del mundo, son especies de polinización cruzada, por lo que cada individuo dentro de una población es altamente heterocigota (Vogel y

Pedersen, 1993). Numerosos estudios indican que existe una variación genética aditiva sustancial en la mayoría de las gramíneas para la mayoría de los caracteres agronómicos (Barker y Kalton, 1989, Burton, 1989, Meyer y Funk, 1989, Vogel et al., 1989). Debido a estas características, la evaluación y selección de planta individual es una práctica efectiva en este tipo de especies y, para ello, sembrar las plantas de forma espaciada es clave. Espaciamientos suficientemente amplios permiten un fácil movimiento entre las plantas para la toma de muestras y datos, además mantienen la integridad de cada genotipo, lo que elimina la competencia entre plantas vecinas y crea un ambiente uniforme para la máxima expresión fenotípica de cada planta (Casler y Van Santen, 2010). Por lo tanto, el rendimiento en grano por planta sería el carácter primario a seleccionar si nuestro objetivo es tener progreso genético en rendimiento en grano. Sin embargo, este carácter ha mostrado baja estabilidad y capacidad predictiva a lo largo de los años en Kernza (Cattani, 2016). En efecto, nosotros detectamos varios componentes de grano altamente correlacionados con este carácter y con mayores valores de heredabilidad en sentido estricto, lo que haría factible la posibilidad de seleccionar por algunos de estos componentes, utilizándolos como caracteres secundarios en selección indirecta. Por ejemplo, el número de espigas por planta y/o tallos fértiles es uno de los principales componentes del rendimiento de grano en plantas espaciadas de Kernza (Altendorf et al., 2021). Tanto Altendorf et al. (2021) como nosotros hemos calculado coeficientes de correlación mayores a 0,60 entre ambos tipos de variables. Debido a su alta correlación con el rendimiento de grano por planta y mayores valores de heredabilidad en sentido estricto mostrados en nuestro estudio, el número de espigas por planta podría ser un buen candidato a ser seleccionado para mejorar el rendimiento de grano. Al igual que lo observado en nuestros resultados y en otros ensayos de plantas espaciadas para Kernza, es común observar aumentos de rendimiento por planta del primer al segundo año, mayormente explicados por aumentos de espigas por planta, pero disminuciones en componentes como: espiguillas por espiga, rendimiento por espiga, entre otros (Altendorf et al., 2021, Bajgain et al., 2019, Cattani y Asselin, 2018, Zhang et al., 2016). Sin embargo, en los ensayos bajo condiciones de siembra comercial, este aumento o sobreproducción de macollos se identifica como una debilidad importante en el

mantenimiento de los rendimientos de grano a lo largo de los años en Kernza, ya que estaría aumentando la competencia entre los macollos reproductivos, lo que probablemente contribuya a la disminución del rendimiento de grano (Hunter et al., 2020a). Por lo tanto, el rendimiento de grano por espiga podría ser el carácter secundario principal a seleccionar para mejorar el rendimiento de grano en Kernza, ya que presenta alta correlación con el rendimiento de grano por planta (así como con otros componentes del rendimiento de grano), moderadamente alta heredabilidad en sentido estricto y alta RSE para rendimiento de grano por planta. Asimismo, si seleccionamos por rendimiento de grano por espiga, también podríamos estar seleccionando otros caracteres importantes como: peso de mil granos, espiguillas por espiga, flores por espiguillas y su fertilidad (Philipp et al., 2018, Elgersma, 1990). Se ha demostrado que la fertilidad de las espigas tiene una fuerte correlación con el rendimiento de espigas y, por ende, con el rendimiento de grano en Kernza (DeHaan et al., 2018, Slinkard, 1965). Además, la fertilidad de las espigas se ha destacado como uno de los caracteres clave a mejorar para lograr mayores rendimientos de grano en este cultivo (Altendorf et al., 2021). De todas formas, en áreas geográficas donde los requerimientos de vernalización pueden no cumplirse completamente (como las de este estudio), las plantas que son capaces de tener más macollos reproductivos pueden ser plantas con menores requerimientos de vernalización, ya que, bajo las mismas condiciones climáticas, más macollos fueron estimulados para cada uno producir una espiga. Por lo tanto, la mejora genética de Kernza para rendimiento de grano en estas zonas y con germoplasma con fuerte variabilidad genética en cuanto a requerimientos de vernalización no debería excluir las espigas por planta como carácter a seleccionar. En regiones templadas de baja latitud, además de utilizar el rendimiento de grano por espiga como carácter principal de selección, podríamos utilizar el número de espigas por planta como un criterio de selección solo en los primeros ciclos de selección o utilizar siempre el número de espigas por planta como carácter a seleccionar, pero con un peso bajo en relación con otros caracteres.

Aunque la evaluación y selección en planta aislada tiene sentido en este tipo de especies y se realiza de forma habitual en los programas de mejoramiento, este ambiente puede parecerse muy poco al de producción real o comercial, en el que

existen altas tasas de mortalidad de plántulas y plantas adultas, competencia entre plantas y reclutamiento potencial de plántulas (Casler y Van Santen, 2010). Para que los valores medidos en ambientes de plantas espaciadas sean útiles en condiciones de producción comercial, las correlaciones genéticas entre esos ambientes de evaluación deberían ser altas para determinado carácter. A menudo no es así, ya que muchos caracteres, incluido el rendimiento de semillas, responden de forma diferente en función del nivel de competencia en el ambiente al que están expuestos los cultivos (Waldron et al., 2008, Elgersma, 1990). En efecto, producción de biomasa posee baja correlación entre ambientes de planta aislada y comerciales; por el contrario, altura de planta y tiempo a floración han mostrado ser las variables con mayor correlación entre esos tipos de ambiente (Sykes et al., 2017, Lazenby y Rogers, 1964). De todas formas, la evaluación en ambientes de planta aislada un poco más competitivos, es decir, con aumentos de la población, serían los ambientes en los que se lograrían las mayores correlaciones con ambientes comerciales (Heineck et al., 2020). Sin embargo, en especies como Tinopiro, evaluar plantas aisladas con menores superficies para cada planta podría confundir al evaluador debido a la presencia de rizomas.

Los cultivos de grano perenne emergen como una herramienta ideal para proveer aquellos servicios sistémicos perdidos por la utilización de los sistemas agrícolas basados en cultivos anuales, pero ellos no priorizan a la producción de semilla o grano (Vico et al., 2016). El patrón de asignación de recursos de especies perennes puede tener éxito en ambientes estables en los que tolerar el estrés es más ventajoso que recurrir a una vida corta y un gran esfuerzo reproductivo (DeHaan et al., 2005, Wilson y Tilman, 1991). Otros asuntos que podrían por lo menos enlentecer el desarrollo de cultivos de grano perennes son la carga genética acumulada en las especies perennes (DeHaan y Van Tassel, 2014) y la posible presencia de herencia polisómica, además del hecho de que las especies anuales suelen derivar de ancestros perennes con menor rendimiento (Friedman y Rubin, 2015). Es un tema muy controversial, en el que en futuros años se comenzará a conocer si la selección artificial en este tipo de especies podrá modificar la compensación entre recursos para órganos vegetativos-reservas y granos o logrará mayor rendimiento en grano a través de aumentos de biomasa.

Nuestros resultados a partir de germoplasma con incipiente adaptación a latitudes bajas han mostrado que es posible mejorar simultáneamente la producción de forraje y grano. La mayoría de los componentes de rendimiento en grano mantuvieron una correlación genética positiva con los caracteres evaluados asociados a rendimiento de forraje durante los dos años de evaluación y bajo un manejo doble propósito. Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cautela, ya que por sí solos no necesariamente significan la ausencia de compensación entre semilla y órganos perennes, ya que en este trabajo no se midió la biomasa subterránea, que es una fracción importante en competencia con la producción de grano por los recursos en cultivos perennes (Vico et al., 2016). A lo largo del proceso de domesticación de plantas perennes, se ha demostrado que la selección para obtener altos rendimientos induce un cambio en el uso de recursos en hoja y planta, pasando de una estrategia conservadora a una adquisitiva (Vilela y González-Paleo, 2015; Milla et al., 2014). Por lo tanto, este cambio de estrategia conduce a cambios estructurales tanto en la biomasa aérea como en la subterránea, aparentemente causados por una menor inversión en el almacenamiento radicular que podría afectar a la estabilidad y longevidad del rendimiento (Pastor-Pastor et al., 2019). Aunque no estamos seguros de lo que ocurrirá en sucesivos ciclos de selección, nuestros resultados mostraron la posibilidad de seleccionar para obtener un mayor rendimiento de grano y al mismo tiempo mejorar el rendimiento de forraje, factor clave en el mejoramiento genético de una especie doble propósito como Tinopiro.

5.2. CONCLUSIONES

Los sistemas de producción basados en cultivos anuales de grano son la base de la alimentación en el mundo, pero también han estado asociados a un deterioro de los servicios ecosistémicos más allá de los límites sostenibles. El desarrollo y expansión geográfica de cultivos de grano perenne como Tinopiro podrían significar un hito en la agricultura. La posibilidad de producción de grano de Tinopiro en bajas latitudes satisfaciendo sus requerimientos de vernalización, la producción y calidad de forraje y grano, así como estrategias de mejoramiento genéticos bajo un manejo doble propósito, son aspectos prioritarios para tal fin.

- Los requerimientos de vernalización de Tinopiro son moderados, quizás comparables a los genotipos de raigrás perenne con menores requerimientos de inducción primaria. Sin embargo, esto significa una seria limitante para la producción de grano en regiones de bajas latitudes. A partir de germoplasma introducido y adaptado a regiones de alta latitud y evaluado en una región de baja latitud, se obtuvieron bajos porcentajes de floración y rendimientos de grano, lo que resalta la necesidad de hacer más esfuerzos para obtener germoplasma con requerimientos de vernalización más bajos para expandir este cultivo a regiones templadas con inviernos más suaves. Afortunadamente, debido a la alta variabilidad fenotípica y genotípica observada, sumado a los moderadamente altos valores de heredabilidad en sentido estricto de componentes de rendimiento en grano, con sucesivos ciclos de selección recurrente es esperable la obtención de germoplasma con bajos o nulos requerimientos de vernalización.

- La producción de forraje de Tinopiro y su calidad nutricional son comparables con otras especies forrajeras perennes invernales ya adaptadas a latitudes bajas, aunque la producción de grano y sus componentes a campo fueron afectados negativamente por los requerimientos de vernalización del germoplasma en estudio. Por otro lado, la fertilización nitrogenada ha demostrado ser un factor de manejo clave para lograr mejores resultados tanto en la producción de forraje como de grano. Investigación sobre el momento y el número de aplicaciones debería ser un tema a abordar en el

futuro. El desarrollo de estrategias de manejo de malezas, quizás asociadas al manejo de la defoliación, también surgen como áreas importantes a desarrollar para un manejo agronómico eficiente de este cultivo en nuevas regiones, ya que, según los manejos experimentales realizados, se observó un fuerte enmalezamiento hacia el segundo año de producción.

- Considerando los valores de heredabilidad en sentido estricto obtenidos para la mayoría de los caracteres agronómicos evaluados, la selección fenotípica debería conferir en cada uno de ellos un importante progreso genético. Este progreso se verá incrementado si en vez de utilizar el primer año del cultivo para la implantación, se utiliza para la evaluación y selección, proceso posible dadas las altas correlaciones y ausencias de interacción edad del cultivo x familia observadas. De todas formas, intercalar ciclos de selección más largos que incluyan evaluaciones en el segundo y/o tercer año sería clave para no perder de vista la evolución de la perennidad en el proceso. Además, utilizar el primer año para evaluación y selección dependerá de qué tan temprano se logre un establecimiento en el otoño del cultivo, ya que será vital un mínimo desarrollo de las plantas para la mayor percepción posible de los limitados estímulos de frío ofertados en regiones de bajas latitudes.

- El rendimiento de grano por espiga parecería ser el carácter central a seleccionar para mejorar el rendimiento de grano, aunque, en regiones geográficas donde el suministro de vernalización es limitado (como las de este estudio), el número de espigas por planta podría ser otra variable importante a considerar.

- Aunque no podemos asegurar qué ocurrirá en futuros ciclos de selección, bajo condiciones de campo y donde Tinopiro se manejó como un cultivo doble propósito, no se detectaron compensaciones entre los componentes reproductivos y la biomasa aérea, lo que sugiere la posibilidad de mejorar simultáneamente el rendimiento de grano y forraje.

- Los resultados centrales de esta tesis son alentadores acerca de la posibilidad real de desarrollar en el mediano plazo germoplasma de Tinopiro con adaptación agronómica básica a regiones de baja latitud. El comportamiento agronómico de Tinopiro como cultivo forrajero fue más que aceptable, pero su rol como cultivo granífero requerirá de varios ciclos de selección. El desarrollo de nuevo germoplasma

es clave para la expansión geográfica de un cultivo con los beneficios agroambientales con los que cuenta Tinopiro. Esta tesis generó información básica acerca de las potencialidades agronómicas que podría tener para la región, uno de los cultivos de grano perenne más promisorios en el mundo. Además, se detectaron desafíos emergentes tanto para su rendimiento reproductivo como para su manejo agronómico. Asimismo, se establecieron posibles estrategias para el progreso genético de la especie en bajas latitudes, donde criterios de elección y reducciones de los intervalos generacionales fueron propuestos. Realizar un ciclo de selección por año podría permitir el uso de métodos menos eficaces, pero más simples y económicos, los que podría generar con menor esfuerzo el progreso genético de Tinopiro en regiones de baja latitud.

5.3. PERSPECTIVAS

La implementación de cultivos de grano perenne puede ser visto como una de las propuestas de solución más contundentes a los problemas que enfrenta actualmente la agricultura moderna. Su desarrollo, quizás motivado por los efectos en aumento del cambio climático, ha tomado gran impulso en los últimos años. De todas formas, existe controversia en la comunidad científica acerca de su adopción en el corto y mediano plazo, debido a incertidumbres en la obtención de un ideotipo de cultivo que conjugue alto rendimiento de grano, producción de forraje y longevidad; aunque existe consenso en que mucho camino se deberá recorrer para comenzar a contestar esas interrogantes.

Específicamente hablando de Tinopiro/Kernza, la respuesta a la selección por rendimiento en grano no ha cesado durante nueve ciclos de selección recurrente en el programa del Land Institute (EE. UU.) y ha promediado aumentos de 34 kg de grano ciclo⁻¹ sin mostrar perjuicios en longevidad. Basados en estos antecedentes, los resultados de esta tesis acentúan la factibilidad de desarrollo de Tinopiro en regiones de baja latitud y dan indicios sobre algunas de las áreas temáticas prioritarias a avanzar para conseguirlo.

En primer lugar, se deberá seguir avanzando en el mejoramiento genético de la especie en el ámbito local. Actualmente se cuenta con un núcleo de semilla con tres

ciclos de selección recurrente bajo las condiciones de Uruguay. Esta población ha mostrado importantes respuestas en porcentajes de floración: ha pasado de 47,5 % en el ciclo 0 a 88 % en el ciclo 2. En este sentido, además de la factibilidad de utilizar el primer año del cultivo para la evaluación de caracteres, la utilización de selección genómica en esta especie también es una estrategia propuesta para acortar los intervalos generacionales en esquemas de selección. Parte de la población de plantas del ciclo 1 y del ciclo 2 ha sido genotipada con GBS (*genotyping by sequencing*), lo que ha compuesto la población de entrenamiento y selección, respectivamente, dentro de un esquema de selección genómica. Esperamos que los avances en esta área nos aporten datos fehacientes acerca de las fortalezas de la utilización de esta metodología en germoplasma local para el mejoramiento de Tinopiro. Por otro lado, en ciclos de selección más avanzados, sería importante determinar si, por su mayor eficiencia, el método de propagación controlada de plantas madre seleccionadas podría superar al método de selección recurrente de polinización libre actualmente utilizado.

Aunque la evaluación y selección en planta aislada tiene sentido en este tipo de especies y se realiza de forma habitual en los programas de mejoramiento, el ambiente generado a partir de una muy baja competencia muchas veces no correlaciona con ambientes comerciales de producción. Al parecer, seleccionar en planta aislada, pero generar ambientes un poco más competitivos, al aumentar la población, podría ser la forma de aumentar la similitud con ambientes con producción comercial. Para especies rizomatosas como Tinopiro, esto podría ser un problema, ya que se podrían generar confusión por nuevas plantas formadas vegetativamente. Por lo tanto, la eficiencia de selección en ambientes más competitivos utilizando solo el primer año de producción con el objetivo de disminuir la probabilidad de confusión por renuevos vegetativos sería un tema importante a explorar.

El bajo rendimiento actual de grano es una fuerte limitante para la adopción de Tinopiro, aunque se estima que, luego de 20 a 30 ciclos sus rendimientos, sean competitivos con los cereales de grano pequeños. Mientras tanto, además de poner esfuerzo en su mejoramiento, la especie podría tener adopción en zonas con algunas restricciones para la agricultura, es decir, zonas donde no compita con la agricultura moderna. Al igual que lo que sucede con el trigo, el cual es sembrado en zonas donde

el maíz no podría sembrarse, para un cultivo perenne como Tinopiro, aun con bajo rendimiento, podría ser una opción en zonas donde los cultivos anuales de alto rendimiento estén restringidos de su potencial productivo. Uruguay presenta 2,5 millones de hectáreas con aptitud agrícola, de las cuales 0,91 millones presentan algunas limitaciones para su uso intensivo. Tanto en estas últimas como en áreas con aptitud pastoril de muy buena a apta con algunas limitaciones, Tinopiro podría ser una especie candidata a utilizarse. En el corto plazo podría contar con aplicabilidad directa en zonas restrictivas, ya que es conocida su resistencia frente a sequías, anegamiento, alcalinidad y salinidad elevada. En este sentido, liberar una variedad con algún ciclo más de selección podría ser importante, ya que se estaría fomentando su conocimiento y aprendiendo de su manejo sobre la práctica. Más que su rendimiento en grano, de incipiente interés, sus fortalezas forrajeras podrían ser clave para la adopción actual de Tinopiro en Uruguay. Actualmente se ha sembrado el ciclo 3 de selección masal recurrente llevado a cabo en Paysandú (Uruguay).

Debido a las características doble propósito que presenta el cultivo, sumado a sus beneficios ecosistémicos, los intereses por su utilización en nuestros sistemas agropecuarios podrían ser diversos. Forraje directo, heno y hasta silo podrían ser considerados. El uso del grano en el ámbito nacional es el punto que enfrenta el mayor desafío y por ello deberá llevar mayor atención en el futuro. En el contexto internacional, el grano está teniendo diversos fines, desde elaboración de malta para fabricación de cervezas hasta elaboración de galletas, panificados y fideos. El grano es altamente nutritivo, aunque presenta bajos niveles de gluten, lo que perjudica la extensibilidad de la masa en panificación. Sin embargo, mezclas con harina convencional solucionan este problema, y permiten obtener panificados de excelente calidad y sabor. Ya se han hecho contactos con varias empresas cerveceras, así como con cooperativas harineras, las que han mostrado su interés para realizar pruebas con este grano. Generar conocimiento de las cualidades y posibles usos del grano es un asunto fundamental a abordar para su adopción.

A diferencia de lo que sucede en regiones de alta latitud, en regiones de baja latitud, Tinopiro como cultivo doble propósito podría ofrecer múltiples cosechas de forraje, ya que mantiene un activo crecimiento invernal. Sin embargo, hasta la fecha

se desconocen los caracteres morfofisiológicos básicos de la especie (es decir, vida media foliar, tasa de aparición de hojas o filocrono) para realizar un adecuado manejo de la defoliación (intensidad y frecuencia) y, por lo tanto, asegurar no solo una adecuada producción de granos y forraje, sino también una elevada persistencia del cultivo en el tiempo. Por otro lado, el peso y número de macollos por planta son componentes importantes de la producción de forraje y poseen una participación directa en el número y peso de espigas por superficie. La frecuencia e intensidad de defoliación modifican estos componentes. En Uruguay, con crecimiento vegetativo de la especie durante todo el año, el manejo durante la etapa vegetativa del cultivo puede ser un factor fundamental que podría modificar la cantidad y peso de macollos fértiles, con un alto potencial de impacto en la longevidad y producción de granos. Ahondar en esta área podría tener un fuerte impacto sobre la tecnología de manejo doble propósito adecuada para Tinopiro en estas regiones templadas.

Los beneficios ecosistémicos de Tinopiro se explican mayoritariamente por su denso y vigoroso sistema radicular, el cual, en regiones de baja latitud, estaría activo gran parte del año. Durante los procesos de domesticación y mejoramiento genético de especies para grano, la asignación de los recursos fotosintéticos puede verse modificada e incrementar hacia órganos reproductivos en detrimento de órganos vegetativos como las raíces, lo que reduce generalmente la longevidad de la planta. Estimar el desarrollo de la biomasa subterránea a lo largo del proceso de mejoramiento o bien investigar en el desarrollo de un criterio de selección que esté asociado a este carácter sería fundamental para no perder de vista aquello verdaderamente esencial: los beneficios de la perennidad en un cultivo de grano.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aamlid TS, Heide OM, Boelt B. 2000. Primary and secondary induction requirements for flowering of contrasting European varieties of *Lolium perenne*. *Annals of Botany*, 86: 1087-1095. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1275>
- Aamlid TS. 2005. A comparison between primary induction requirements in vegetatively propagated ramets and seedlings of *Festuca pratensis* and *Festuca rubra*. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 55(4): 299-303. <https://doi.org/10.1080/09064710500297625>
- Aastveit AH, Aastveit K. 1990. Theory and application of open-pollination and polycross in forage grass breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 79(5): 618-624. <https://doi.org/10.1007/BF00226874>
- Ahrens JF. 1957. Vernalization and photoperiodism of winter wheat. Doctoral dissertation. Iowa State University. 188 p.
- Ahrens JF, Loomis WE. 1963. Floral induction and development in winter wheat. *Crop Science*: 3, 463-466.
- Almeida MC, Vieira P, Smeets P. 2013. Water cycle safety plan frame-work. *Final Heliyon* 6(3): 377-382.
- Allan JD. 2004. Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35: 257-284.
- Altendorf KR, DeHaan LR, Heineck GC, Zhang X, Anderson JA. 2021. Floret site utilization and reproductive tiller number are primary components of grain yield in intermediate wheatgrass spaced plants. *Crop Science*, 61(2): 1073-1088. <https://doi.org/10.1002/csc2.20385>
- Amaducci S, Facciotto G, Bergante S, Perego A, Serra P, Ferrarini A, Chimento C. 2016. Biomass production and energy balance of herbaceous and woody crops on marginal soils in the Po valley. *Global Change Biology Bioenergy*, 9: 31-45. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12341>

- Amaru S, Chhetri NB. 2013. Climate adaptation: Institutional response to environmental constraints, and the need for increased flexibility, participation, and integration of approaches. *Applied Geography*, 39: 128-139.
- Andrés F, Coupland G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9): 627-639.
<https://doi.org/10.1038/nrg3291>
- Armstead IP, Turner LB, Marshall AH, Humphreys MO, King IP, Thorogood D. 2008. Identifying genetic components controlling fertility in the outcrossing grass species perennial ryegrass (*Lolium perenne*) by quantitative trait loci analysis and comparative genetics. *New Phytologist*, 178(3): 559-571.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02413.x>
- Ashworth AJ, Katuwal S, Moore Jr PA, Adams T, Anderson K, Owens PR. 2023. Perenniality drives multifunctional forage–biomass filter strips’ ability to improve water quality. *Crop Science*, 63(1): 336-348.
<https://doi.org/10.1002/csc2.20878>
- Awika JM. 2011. Major cereal grains production and use around the world. En: Awika JM, Piironen V, Bean S. (Eds.). *Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion*. (American Chemical Society). 1-13.
- Bajgain P, Zhang X, Anderson JA. 2019. Genome-wide association study of yield component traits in intermediate wheatgrass and implications in genomic selection and breeding. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(8): 2429-2439.
<https://doi.org/10.1534/g3.119.400073>
- Bajgain P, Zhang X, Jungers J, DeHaan L, Heim B, Sheaffer C, Wyse D, Anderson J. 2020. ‘MN-Clearwater’, the first food-grade intermediate wheatgrass (*Kernza* perennial grain) cultivar. *Journal of Plant Registrations*, 14(3): 288-297.
- Bajgain P, Crain JL, Cattani DJ, Larson SR, Altendorf KR, Anderson JA, Crews TE, Hu Y, Poland JA, Turner MK, Westerbergh A, DeHaan LR. 2022. Breeding Intermediate Wheatgrass for Grain Production. *Plant Breeding Reviews*, 46: 119-217. <https://doi.org/10.1002/9781119874157.ch3>

- Barker RE, Kalton RR. 1989. Cool-season forage grass breeding: Progress, potentials, and benefits. *Contributions from breeding forage and turf grasses*, 15: 5-20. <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub15.c2>
- Barkley NA, Wang ML. 2008. Application of TILLING and EcoTILLING as reverse genetic approaches to elucidate the function of genes in plants and animals. *Current genomics*, 9(4): 212-226. <https://doi.org/10.2174/138920208784533656>
- Barreto P, Dogliotti S, Perdomo C. 2017. Surface water quality of intensive farming areas within the Santa Lucia River basin of Uruguay. *Air, Soil and Water Research*, 10, 1178622117715446.
- Barriball S. 2020. Growth, development, and forage quality of Intermediate wheatgrass when grown for Kernza® perennial grain production: [En línea]. Master thesis. Iowa: Iowa State University. 32 p. 10 agosto 2023. Disponible en: <https://lib.dr.iastate.edu/creativecomponents/628>
- Bationo A, Kihara J, Vanlauwe B, Waswa B, Kimetu J. 2007. Soil organic carbon dynamics, functions and management in West African agro-ecosystems. *Agricultural Systems*, 94(1): 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2005.08.011>
- Bean EW. 1972. Clonal evaluation for increased seed production in two species of forage grasses, *Festuca arundinacea* Schreb. and *Phleum pratense* L. *Euphytica*, 21(2): 377-383. <https://doi.org/10.1007/BF00036778>
- Beatty ER, Powell JD. 1976. Response of switchgrass (*Panicum virgatum*) to clipping frequency. *Journal of Range Management*, 29:132-135. <https://doi:10.2307/3897409>
- Becker R, Wagoner P, Hanners GD, Saunders RM. 1991. Compositional, nutritional and functional-evaluation of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum-Intermedium*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 15(1): 63-77. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1991.tb00154.x>
- Bekewe PE, Castillo MS, Rivera R. 2019. Harvest management effects on canopy height and light interception of ‘Performer’ switchgrass and its relationship with

- weed infestation. *Crop Science*, 59(3): 1309-1316.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2018.10.0612>
- Bell LW, Byrne F, Ewing MA, Wade LJ. 2008. A preliminary whole-farm economic analysis of perennial wheat in an Australian dryland farming system. *Agricultural Systems* 96: 166-174. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2007.07.007>
- Bell LW, Wade LJ, Ewing MA. 2010. Perennial wheat: a review of environmental and agronomic prospects for development in Australia. *Crop and Pasture Science*, 61(9): 679-690. <https://doi.org/10.1071/CP10064>
- Bell LW, Moore AD, Kirkegaard JA. 2014. Evolution in crop–livestock integration systems that improve farm productivity and environmental performance in Australia. *European Journal of Agronomy*, 57: 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.04.007>
- Belton JM. 1990. The effect of defoliation interval in winter on pasture productivity in winter and spring: a regional comparison. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30(3): 357-360. <https://doi.org/10.1071/EA9900357>
- Bhandari HS, Saha MC, Mascia PN, Fasoula VA, Bouton JH. 2010. Variation among half-sib families and heritability for biomass yield and other traits in lowland switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Crop Science*, 50(6): 2355-2363. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.02.0109>
- Bharathi R, Muljadi T, Tyl C, Annor GA. 2022. Progress on breeding and food processing efforts to improve chemical composition and functionality of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) for the food industry. *Cereal Chemistry*, 99(2): 235-252. <https://doi.org/10.1002/cche.10482>
- Bhatti AU, Mulla DJ, Koehler FE, Gurmani AH. 1991. Identifying and removing spatial correlation from yield experiments. *Soil Science Society of America Journal*, 55(6): 1523-1528. <https://doi.org/10.2136/sssaj1991.03615995005500060004x>
- Boden SA, Cavanagh C, Cullis BR, Ramm K, Greenwood J, Finnegan EJ, Trevaskis B, Swain SM. 2015. Ppd-1 is a key regulator of inflorescence architecture and paired spikelet development in wheat. *Nature plants*, 1(2): 1-6. <https://doi.org/10.1038/nplants.2014.16>

- Boelt B, Studer B. 2010. Breeding for Grass Seed Yield. En: Boller, Posselt UK, Veronesi F. (Eds.). Fodder Crops and Amenity Grasses. (pp. 161-174). Handbook of Plant Breeding, vol 5. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0760-8_7
- Broom D. 2019. This tiny new grain could save the planet. World Economic Forum. [En línea] 2 Julio 2023. Disponible en: <https://www.weforum.org/agenda/2019/04/kernza-new-wheat-grain-to-save-the-planet/>.
- Brown KR. 1980. Seed production in New Zealand ryegrasses: I. Effect of grazing. New Zealand Journal of Experimental Agriculture, 8:27–32. <https://doi.org/10.1080/03015521.1980.10426228>
- Bugge G. 1987. Selection for seed yield in *Lolium perenne* L. Plant breeding, 98(2): 149-155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1987.tb01108.x>
- Burton GW. 1989. Progress and benefits to humanity from breeding warm-season forage grasses. En: NDA Sleper, Asay KH, Pedersen JF. (Eds.). Contributions from Breeding Forage and Turf Grasses. Crop Science Special Pub. 15. Crop Society of America. Madison, WI. 21-29.
- Calder DM. 1963. Environmental control of lowering in *Dactylis glomerata* L, Nature, 197: 882-883.
- Carena MJ. 2008. Handbook of plant breeding. Spinger-Verlag. 379 p.
- Carnahan HL, Hill HD. 1961. Cytology and genetics of forage grasses. The Botanical Review, 27(1): 1-162. <https://doi.org/10.1007/BF02860809>
- Casler MD, Brummer EC. 2008. Theoretical expected genetic gains for among-and-within-family selection methods in perennial forage crops. Crop Science, 48(3): 890-902. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0499>
- Casler MD, Van Santen E. 2010. Breeding objectives in forages. Fodder crops and amenity grasses, 115-136. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0760-8_5
- Cassman KG. 1999. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (11): 5952-5959.

- Cattani DJ. 2016. Selection of a perennial grain for seed productivity across years: intermediate wheatgrass as a test species. *Canadian Journal of Plant Science*, 97(3): 516-524. <https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0280>
- Cattani DJ, Asselin SR. 2018. Has selection for grain yield altered intermediate wheatgrass? *Sustainability*, 10(3): 688. <https://doi.org/10.3390/su10030688>
- Chalar G, Arocena R, Pacheco JP, Fabián D. 2011. Trophic assessment of streams in Uruguay: a trophic State Index for Benthic Invertebrates (TSI-BI). *Ecological Indicators*, 11(2): 362-369.
- Chalar G, Garcia-Pesenti P, Silva-Pablo M, Perdomo C, Olivero V, Arocena R. 2017. Weighting the impacts to stream water quality in small basins devoted to forage crops, dairy and beef cow production. *Limnologica*, 65: 76-84.
- Chapman EA, Thomsen HC, Tulloch S, Correia PM, Luo G, Najafi J, DeHaan LR, Crews TE, Olsson L, Lundquist PO, Westerbergh A, Pedas, PR, Knudsen S, Palmgren M. 2022. Perennials as future grain crops: opportunities and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.898769>
- Chang TT. 1976. The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rices. *Euphytica*, 25: 425-441. <https://doi.org/10.1007/BF00041576>
- Chastain TG, Young WC. III. 1998. Vegetative plant development and seed production in cool-season perennial grasses. *Seed Science Research*, 8, 295-301. <https://doi.org/10.1017/S0960258500004190>
- Chastain TG, Garbacik CJ, Young III, WC. 2014. Spring-applied nitrogen and trinexapac-ethyl effects on seed yield in perennial ryegrass and tall fescue. *Agronomy Journal*, 106(2): 628-633. <https://doi.org/10.2134/agronj2013.0343>
- Chimento C, Amaducci S, 2015. Characterization of fine root system and potential contribution to soil organic carbon of six perennial bioenergy crops. *Biomass Bioenergy* 83: 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.09.008>
- Clément C, Sleiderink J, Svane SF, Smith AG, Diamantopoulos E, Desbrøll DB, Thorup-Kristensen K. 2022. Comparing the deep root growth and water uptake

- of intermediate wheatgrass (Kernza®) to alfalfa. *Plant and Soil*, 472(1-2): 369-390. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05248-6>
- Comstock RE, Moll RH. 1963. Genotype x environment interactions. En: Hanson WD, Robinson HF. (Eds.). *Statistical genetics and plant breeding*. NAS-NRC Publ. 982, Washington, DC. 164-166.
- Conaghan P, Casler MD. 2011. A theoretical and practical analysis of the optimum breeding system for perennial ryegrass. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 50: 47-63.
- Cooper JP. 1960. Short-day and low-temperature induction in *Lolium*. *Annals of Botany*, 24(2): 232-246. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083698>
- Cousens RD. 1996. Comparative growth of wheat, barley and annual ryegrass (*Lolium rigidum*) in monoculture and mixture. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47: 449-464. <https://doi.org/10.1071/AR9960449>
- Cox TS, Glover JD, Van Tassel DL, Cox CM, DeHaan LR. 2006. Prospects for developing perennial grain crops. *Bioscience*, 56(8): 649-659.
- Cox TS, Van Tassel DL, Cox CM, DeHaan LR. 2010. Progress in breeding perennial grains. *Crop and Pasture Science*, 61(7): 513-521.
- Cox S, Nabukalu P, Paterson AH, Kong W, Nakasagga S. 2018. Development of perennial grain sorghum. *Sustainability*, 10(1): 172. <https://doi.org/10.3390/su10010172>
- Crain J, Haghigattalab A, DeHaan L, Poland J. 2021. Development of whole-genome prediction models to increase the rate of genetic gain in intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) breeding. *The Plant Genome*, 14:e20089. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20089>
- Crews TE, Brookes PC. 2014. Changes in soil phosphorus forms through time in perennial versus annual agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 184: 168-181.
- Crews TE, Cattani DJ. 2018. Strategies, advances, and challenges in breeding perennial grain crops. *Sustainability*, 10(7): 2192. <https://doi.org/10.3390/su10072192>

- Cui L, Ren Y, Murray TD, Yan W, Guo Q, Niu Y, Sun Y, Li H. 2018. Development of perennial wheat through hybridization between wheat and wheatgrasses: a review. *Engineering*, 4(4): 507-513. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.003>
- Culman SW, Snapp SS, Ollenburger M, Basso B, DeHaan LR. 2013. Soil and water quality rapidly responds to the perennial grain *Kernza* wheatgrass. *Agronomy Journal*, 105: 735-744. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0273>
- Culman S, Pinto P, Pugliese J, Crews T, DeHaan L, Jungers J, Larsen J, Ryan M, Schipanski M, Sulc M, Wayman S, Wiedenhoft M, Stoltenber D, Picasso V. Forage harvest management impacts “*Kernza*” intermediate wheatgrass productivity across North America. *Agronomy Journal*. (En impresión). <https://doi.org/10.1002/agj2.21402>
- Daniel TC, Sharpley AN, Leminyon JL. 1998. Agricultural Phosphorus and eutrophication: a symposium overview. *Journal of Environment Quality*, 27: 251-257. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020002x>
- DeHaan L. 2022. *Kernza* breeding progress at TLI. En: *Kernza^R Meeting* (Abril 2022, Salina, Kansas). The Land Institute *Kernza* breeding updates.
- DeHaan L, Larson S, López-Marqués RL, Wenkel S, Gao C, Palmgren M. 2020. Roadmap for accelerated domestication of an emerging perennial grain crop. *Trends in Plant Science*, 25(6): 525-537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.004>
- DeHaan L, Christians M, Crain J, Poland J. 2018. Development and evolution of an intermediate wheatgrass domestication program. *Sustainability*, 10(5): 1499. <https://doi.org/10.3390/su10051499>
- DeHaan RL, Schuiteman MA, Vos RJ. 2017. Residual soil nitrate content and profitability of five cropping systems in northwest Iowa. *PloS one*, 12(3): e0171994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171994>
- DeHaan L.R, Van Tassel DL. 2014. Useful insights from evolutionary biology for developing perennial grain crops. *American Journal of Botany*, 101(10): 1801-1819. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400084>

- DeHaan LR, Van Tassel DL, Cox TS. 2005. Perennial grain crops: A synthesis of ecology and plant breeding. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 20(1): 5-14. <https://doi.org/10.1079/RAF200496>
- Díaz A, Zikhali M, Turner AS, Isaac P, Laurie DA. 2012. Copy number variation affecting the Photoperiod-B1 and Vernalization-A1 genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PloS one*, 7(3): e33234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033234>
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2013. Estadísticas anuales del sector agrícola en Uruguay. [En línea]. Consultado 2 julio 2023. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy>
- Deng J, Zhou Z, Zhu B, Zheng X, Li C, Wang X, Jian Z. 2011. Modeling nitrogen loading in a small watershed in southwest China using a DNDC model with hydrological enhancements. *Biogeosciences* 8: 2999-3009
- De Oliveira G, Brunsell NA, Sutherlin CE, Crews TE, DeHaan LR. 2018. Energy, water and carbon exchange over a perennial *Kernza* wheatgrass crop. *Agricultural and Forest Meteorology*, 249: 120-137.
- Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. 2009. Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion in Plant Biology*. 12(2): 178-84. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.010>
- Donaghy DJ, Fulkerson WJ. 2002. The impact of defoliation frequency and nitrogen fertilizer application in spring on summer survival of perennial ryegrass under grazing in subtropical Australia. *Grass and Forage Science*, 57(4): 351-359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2002.00335.x>
- Donaghy DJ, Fulkerson WJ. 1998. Priority for allocation of water-soluble carbohydrate reserves during regrowth of *Lolium perenne*. *Grass and Forage Science*, 53(3): 211-218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.1998.00129.x>
- Dove H, Kirkegaard J. 2014. Using dual-purpose crops in sheepgrazing systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94: 1276-1283. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6527>
- Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D, Valarik M, Sanchez A, Yan L. 2006. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and

- VRN2. *Plant molecular biology*, 60: 469-480. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-4814-2>
- Duchene O, Bathellier C, Dumont B, David C, Celette F. 2023. Weed community shifts during the aging of perennial intermediate wheatgrass crops harvested for grain in arable fields. *European Journal of Agronomy*, 143: 126721. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126721>
- Duchene O, Dumont B, Cattani DJ, Fagnant L, Schlautman B, DeHaan LR, Barriball S, Jungers JM, Picasso VD, David C, Celette F. 2021. Process-based analysis of *Thinopyrum intermedium* phenological development highlights the importance of dual induction for reproductive growth and agronomic performance. *Agricultural and Forest Meteorology*, 301: 108341. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108341>
- Easton HS, Lee CK, Fitzgerald RD. 1994. Tall fescue in Australia and New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 37(3): 405-417. <https://doi.org/10.1080/00288233.1994.9513078>
- Edwards JT, Carver BF, Horn GW, Payton ME. 2011. Impact of dual-purpose management on wheat grain yield. *Crop Science*, 51(5): 2181-2185. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.01.0043>
- Elgersma A. 1990. Spaced-plant traits related to seed yield in plots of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica*, 51(2): 151-161. <https://doi.org/10.1007/BF00022446>
- Erisman JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W. 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, 1(10): 636-639.
- Ernst O, Siri Prieto G. 2009. Impact of perennial pasture and tillage systems on carbon input and soil quality indicators. *Soil & Tillage Research*, 105: 260-268. <https://doi.org/10.1016/j.still.2009.08.001>
- Ernst OR, Dogliotti S, Cadenazzi M, Kemanian AR. 2018. Shifting crop-pasture rotations to no-till annual cropping reduces soil quality and wheat yield. *Field Crops Research*, 217: 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.11.014>
- Ernst OR, Kemanian AR, Mazzilli SR, Cadenazzi M, Dogliotti S. 2016. Depressed attainable wheat yields under continuous annual no-till agriculture suggest

- declining soil productivity. *Field Crops Research*, 186: 107-116.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.11.005>
- Eswaran H, Beinroth F, Reich P. 1999. Global land resources and population-supporting capacity. *American Journal of Alternative Agriculture*, 14(3): 129-136. <https://doi.org/10.1017/S0889189300008250>
- Evans LT. 1964. Reproduction. En: C. Barnard (Eds.). *Grasses and grasslands*. London: Macmillan. 126-153.
- Evans PS. 1973. The effect of repeated defoliation to three different levels on root growth of five pasture species. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(1): 31-34. <https://doi.org/10.1080/00288233.1973.10421155>
- Falconer DS, Mackay TF. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4.^a edición. Longman, New York. 464.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2018. *The 10 Elements of Agroecology Guiding the Transition to Sustainable Food and Agricultural Systems*; FAO: Rome, Italy, 2018.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. Emisiones procedentes de los sistemas alimentarios: el uso de energía a lo largo de las cadenas de suministro. En: *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. FAO. [En línea]. Consultado 2 Julio 2023. Disponible en: www.fao.org/publications.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Statistical Data). 2023. [En línea]. Consultado 2 julio 2023. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Favre JR, Castiblanco TM, Combs DK, Wattiaux MA, Picasso VD. 2019. Forage nutritive value and predicted fiber digestibility of Kernza intermediate wheatgrass in monoculture and in mixture with red clover during the first production year. *Animal Feed Science and Technology*, 258: 114298. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114298>
- Favre JR. 2019. Effect of harvest timing on forage yield and nutritive value of annual and perennial grain and forage crops: oat and Kernza intermediate wheatgrass. Master dissertation. University of Wisconsin-Madison. 64 p.

- Fernandez CW, Ehlke, N, Sheaffer CC, Jungers JM. 2020. Effects of nitrogen fertilization and planting density on intermediate wheatgrass yield. *Agronomy Journal*, 112(5): 4159-4170. <https://doi.org/10.1002/agj2.20351>
- Foerster JM, Beissinger T, de Leon N, Kaeppler S. 2015. Large effect QTL explain natural phenotypic variation for the developmental timing of vegetative phase change in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 128: 529-538. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2451-3>
- Friedman J. 2020. The evolution of annual and perennial plant life histories: ecological correlates and genetic mechanisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51: 461-481. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024638>
- Friedman J, Rubin MJ. 2015. All in good time: understanding annual and perennial strategies in plants. *American Journal of Botany*, 102: 497-499. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500062>
- Fu D, Szűcs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, Von Zitzewitz J, Hayes PM, Dubcovsky J. 2005. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular genetics and genomics*, 273: 54-65. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1095-4>
- Gantzer CJ, Anderson SH, Thompson AL, Brown JR. 1990. Estimating soil erosion after 100 years of cropping on Sanborn Field. *Journal of Soil and Water Conservation* 45: 641-644.
- García-Favre J, López IF, Cranston LM, Donaghy DJ, Kemp PD, Ordóñez IP. 2022. Functional contribution of two perennial grasses to enhance pasture production and drought resistance under a leaf regrowth stage defoliation criterion. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 209(1): 144-160. <https://doi.org/10.1111/jac.12602>
- Ghanizadeh H, Harrington KC. 2019. Weed management in New Zealand pastures. *Agronomy*, 9(8): 448. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080448>
- Glover JD, Cox CM, Reganold JP. 2007. Future farming: a return to roots? *Scientific American*, 297: 66-73. <https://www.jstor.org/stable/26069418>

- Glover JD, Culman SW, DuPont ST, Broussard W, Young L, Mangan ME, Mai JG, Crews TE, DeHaan LR, Buckley DH, Ferris H, Turner RE, Reynolds HL, Wyse DL. 2010. Harvested perennial grasslands provide ecological benchmarks for agricultural sustainability. *Agriculture Ecosystems and Environments*, 137: 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.11.001>
- Glass ADM. 2003. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22: 453-470. <https://doi.org/10.1080/07352680390243512>
- Godwin DC, Singh U. 1998. Nitrogen balance and crop response to nitrogen in upland and lowland cropping systems. En: Tsuji GY, Hoogenboom G, Thornton PK. (Eds.). *Understanding Options for Agricultural Production. Systems Approaches for Sustainable Agricultural Development*, vol 7. Springer, Dordrecht. (p. 55-77). https://doi.org/10.1007/978-94-017-3624-4_4
- González-Paleo L, Ravetta DA. 2011. Indirect changes associated with a selection program for increased seed-yield in wild species of *Lesquerella* (Brassicaceae): Are we developing a phenotype opposite to the expected ideotype? *Industrial Crops and Products*, 34(2): 1372-1380. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.006>
- Good AG, Shrawat AK, Muench DG. 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science*, 9: 597-605.
- Griffiths D.J, Lewis J, Bean EW. 1966. Problems of breeding for seed production in grasses. Proc. 10th Int. Grassland Congress, Helsinki, Finland. *Valtionneuvoston kirjagiano*. 749-754.
- Haas M, Schreiber M, Mascher M. 2019. Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *Journal of integrative plant biology*, 61(3): 204-225. <https://doi.org/10.1111/jipb.12737>
- Harker KN, Baron VS, Chanasyk DS, Naeth MA, Stevenson FC. 2000. Grazing intensity effects on weed populations in annual and perennial pasture systems. *Weed Science*, 48(2): 231-238. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2000\)048\[0231:GIEOWP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2000)048[0231:GIEOWP]2.0.CO;2)

- Harrison MT, Evans JR, Dove H, Moore AD. 2011. Dual-purpose cereals: can the relative influences of management and environment on crop recovery and grain yield be dissected? *Crop and Pasture Science*, 62(11): 930-946. <https://doi.org/10.1071/CP11066>
- Hajighasemi S, Keshavarz-Afshar R, Chaichi MR. 2016. Nitrogen Fertilizer and Seeding Rate Influence on Grain and Forage Yield of Dual-Purpose Barley. *Agronomy Journal*, 108(4): 1486-1494. <https://doi.org/10.2134/agronj2015.0447>
- Hallauer AR. 1981. Selection and breeding methods. En: Frey KF. (Eds.). *Plant breeding*. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press. 3-35.
- Hänsel H. 1953. Vernalisation of winter rye by negative temperatures and the influence of vernalisation upon the lamina length of the first and second leaf in winter rye, spring barley, and winter barley. *Annals of Botany*, 17(3): 417-432. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083360>
- Hare MD. 1992. Seed production in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.): a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Seed Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand (Doctoral dissertation, Massey University). 186 p. <http://hdl.handle.net/10179/4011>
- Havstad T. 1996. Juvenility and flowering in *Festuca pratensis* Huds. 1. Effects of plant age, cultivar and duration of primary induction treatments. *Norwegian Journal of Agricultural Science*, 10: 159-177.
- Hayek J. 2020. Effect of steam treatment on chemical changes over storage of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) refined, partially refined, and whole flour: [En línea]. Master dissertation. Minnesota, USA. University of Minnesota. 264 p. 10 agosto 2023. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11299/214999>
- Hayes RC, Newell MT, DeHaan LR, Murphy KM, Crane S, Norton MR, Wade LJ, Newberry M, Fahim M, Jones SS, Cox TS, Larkin PJ. 2012. Perennial cereal crops: An initial evaluation of wheat derivatives. *Field Crops Research*, 133: 68-89. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.03.014>

- Hebblethwaite PD, Ivins JD. 1977. Nitrogen studies in *Lolium perenne* grown for seed
I. Level of application. *Grass and Forage Science*, 32(4): 195-204.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1977.tb01434.x>
- Heichel GH, Hovin AW, Henjum KI. 1980. Seedling Age and Cold Treatment Effects
on Induction of Panicle Production in Reed Canarygrass. *Crop Science*, 20(6):
683-687. <https://doi.org/10.2135/cropsci1980.0011183X002000060002x>
- Heide OM. 2001. Flowering responses of contrasting ecotypes of *Poa annua* and their
putative ancestors *Poa infirma* and *Poa supina*. *Annals of Botany*, 87: 795-804.
<https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1406>
- Heide OM. 1994. Control of flowering and reproduction in temper-ate grasses. *New
Phytologist*, 128: 347-362. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04019.x>
- Heide OM. 1990. Primary and secondary induction requirements for flowering of
Festuca rubra. *Physiologia Plantarum*, 79: 51-56. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05865.x>
- Heide OM. 1988. Flowering requirements of Scandinavian *Festuca
pratensis*. *Physiologia Plantarum*, 74(3): 487-492.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb02007.x>
- Heide OM. 1987. Photoperiodic control of flowering in *Dactylis glomerata*. a true-
short-long-day plant. *Physiologia Plantarum*, 70: 523-529.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb02853.x>
- Heineck GC, Ehlke NJ, Altendorf KR, Denison RF, Jungers JM, Lamb EG, Watkins
E. 2020. Relationships and influence of yield components on spaced-plant and
sward seed yield in perennial ryegrass. *Grass and Forage Science*, 75(4): 424-
437. <https://doi.org/10.1111/gfs.12499>
- Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B. 2008. Low-temperature and
daylength cues are integrated to regulate FLOWERING LOCUS T in
barley. *Plant physiology*, 147(1): 355-366.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.116418>
- Hitchcock AS. 1951. *Manual of the grasses of the United States*, 2.^a edición. Revised
by A. Chase. United States Department of Agriculture Miscellaneous
Publication, 200: 1-1051.

- Holmes DP. 1973. Inflorescence development of semidwarf and standard height wheat cultivars in different photoperiod and nitrogen treatments. *Canadian Journal of Botany*, 51(5): 941-956. <https://doi.org/10.1139/b73-118>
- Hopkins AA, Krenzer EG, Horn GW, Goad CL, Redmon LA, Redfearn DD, Reuter R R. 2003. Spring Grazing Reduces Seed Yield of Cool-Season Perennial Grasses Grown in the Southern Great Plains. *Agronomy Journal*, 95(4): 855-862. <https://doi.org/10.2134/agronj2003.8550>
- Hoveland CS, Durham RG, Bouton JH. 1996. Weed encroachment in established alfalfa as affected by cutting frequency. *Journal of production agriculture*, 9(3): 399-402. <https://doi.org/10.2134/jpa1996.0399>
- Hu F, Zhang S, Huang G, Zhang Y, Lv X, Wan K, Liang J, Dao J, Wu S, Zhang L, Yang X, Lian X, Huang L, Shao L, Zhang J, Qin S, Tao DY, Crews T, Sacks E, Lv J, Wade L. 2022. Perennial rice improves farmer livelihood and ecosystem security. *Research Square*, 22:77. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1302277/v1>
- Huff DR. 2010. Bluegrasses. En: Boiler B, Veronesi F, Posselt U. (Eds.). *Fodder crops and amenity grasses. Handbook of plant breeding*, New York: Springer. (pp. 345-379).
- Huijser P, Schmid M. 2011. The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138(19), 4117-4129. <https://doi.org/10.1242/dev.063511>
- Humphreys M, Feuerstein U, Vandewalle M, Baert J. 2010. Ryegrasses. En: Boiler B, Veronesi F, Posselt U. (Eds.). *Fodder crops and amenity grasses. Handbook of plant breeding*. New York: Springer. (211-260).
- Hunter MC, Sheaffer CC, Culman SW, Jungers JM. 2020a. Effects of defoliation and row spacing on intermediate wheatgrass I: Grain production. *Agronomy Journal*, 112(3): 1748-1763. <https://doi.org/10.1002/agj2.20128>
- Hunter MC, Sheaffer CC, Culman SW, Lazarus WF, Jungers JM. 2020b. Effects of defoliation and row spacing on intermediate wheatgrass II: Forage yield and economics. *Agronomy Journal*, 112(3): 1862-1880. <https://doi.org/10.1002/agj2.20128>
- INIA-INASE (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Instituto Nacional de Semillas). 2022. Resultados experimentales de la evaluación nacional de

cultivares de especies forrajeras (Período 2021). [En línea]. Unidad de comunicación y transferencia de tecnología. Consultado 2 julio 2023. Disponible en:

http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/Evaluacion_EF/Ano2021/PubForrajasPeriodo2021.pdf

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2019. IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and green-house gas fluxes in terrestrial ecosystems. [En línea]. Consultado 2 julio 2023. Disponible: <https://www.ipcc.ch/report/SRCCL/>

Ivancic K, Locatelli A, Tracy WF, Picasso V. 2021. Kernza intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) response to a range of vernalization conditions. Canadian Journal of Plant Science, 101(5): 770-773. <https://doi.org/10.1139/cjps-2020-0251>

Jensen KB, Yan X, Larson SR, Wang RR, Robins JG. 2016a. Agronomic and genetic diversity in intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). Plant Breeding, 135(6): 751-758. <https://doi.org/10.1111/pbr.12420>

Jensen KB, Anderson WF. 2014. Yield gains in major U.S. field crops. En: Smith S. (Eds.). Rangeland and Warm-Season Forage Grasses. Crop Society of America. 219-266.

Jensen KB, Robins JG, Rigby C, Waldron BL. 2016b. Comparative trends in forage nutritional quality across the growing season in 13 grasses. Canadian Journal of Plant Science, 97(1): 72-82. <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0328>

Jungers JM, Schiffner S, Sheaffer C, Ehlke NJ, DeHaan L, Torrion J, Noland RL, Franco JG. 2022. Effects of seeding date on grain and biomass yield of intermediate wheatgrass. Agronomy Journal, 114(4): 2342-2351. <https://doi.org/10.1002/agj2.21083>

Jungers JM, DeHaan LH, Mulla DJ, Sheaffer CC, Wyse DL. 2019. Reduced nitrate leaching in a perennial grain crop compared to maize in the Upper Midwest, USA. Agriculture, Ecosystems & Environment, 272: 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.11.007>

- Jungers JM, DeHaan LR, Betts KJ, Sheaffer CC, Wyse DL. 2017. Intermediate wheatgrass grain and forage yield responses to nitrogen fertilization. *Agronomy Journal*, 109: 462-472. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.07.0438>
- Kalton RR, Barker RE, Welty RE. 1996. Seed production. *Cool-Season Forage Grasses*, 34: 383-411. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr34.c13>
- Kang MS. 1997. Using genotype-by-environment interaction for crop cultivar development. *Advances in agronomy*, 62: 199-252. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60569-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60569-6)
- Kantarski T, Larson S, Zhang X, DeHaan L, Borevitz J, Anderson J, Poland J. 2017. Development of the first consensus genetic map of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) using genotyping-by-sequencing. *Theoretical and applied genetics*, 130(1): 137-150. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2799-7>
- Karimi V, Karami E, Keshavarz M. 2018. Climate change and agriculture: impacts and adaptive responses in Iran. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1): 1-15
- Ketellapper HJ. 1960. Growth and Development in Phalaris. I. Vernalization Response in Geographic Strains of *P. Tuberosa* L. *Ecology*, 41(2): 298-305. <https://doi.org/10.2307/1930219>
- Kearsey MJ, y Pooni HS. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. Chapman and Hall, Stanley Thornes (Publishers) Ltd. London. 396 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-4441-2>
- King AE, Blesh J. 2018. Crop rotations for increased soil carbon: Perenniality as a guiding principle. *Ecological applications*, 28(1): 249-261. <https://doi.org/10.1002/eap.1648>
- King RS, Baker ME, Whigham DF, Weller DE, Jordan TE, Kazyak PF, Hurd MK. 2005. Spatial considerations for linking watershed land cover to ecological indicators in streams. *Ecological applications*, 15(1): 137-153.
- Klatt JG, Mallarino AP, Downing JA, Kopaska JA, Wittry DJ. 2003. Soil phosphorus, management practices, and their relationship to phosphorus delivery in the Iowa Clear Lake agricultural watershed. *Journal of Environmental Quality*, 32(6): 2140-2149.

- Koller D, Highkin HR. 1960. Environmental control of reproductive development in *Hordeum bulbosum*, a perennial pasture grass. *American Journal of Botany*, 47(10), 843-847. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1960.tb07174.x>
- Laganiere J, Angers DA, Pare D. 2010. Carbon accumulation in agricultural soils after afforestation: a meta-analysis. *Global change biology*, 16(1): 439-453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01930.x>
- Lammer D, Cai X, Arterburn M, Chatelain J, Murray T, Jones S. 2004. A single chromosome addition from *Thinopyrum elongatum* confers a polycarpic, perennial habit to annual wheat. *Journal of experimental botany*, 55(403): 1715-1720. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh209>
- Langer RHM. 1980. The dynamics of wheat yield. *New Zealand Wheat Review*, 40: 1977-1979.
- Langer RHM, Liew FKY. 1973. Effects of varying nitrogen supply at different stages of the reproductive phase on spikelet and grain production and on grain nitrogen in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 24(5): 647-656.
- Lanker M, Bell M, Picasso VD. 2019. Farmer perspectives and experiences introducing the novel perennial grain Kernza intermediate wheatgrass in the US Midwest. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 35(6): 653-662. <https://doi.org/10.1017/S1742170519000310>
- Law EP, Wayman S, Pelzer CJ, Culman SW, Gómez MI, DiTommaso A, Ryan MR. 2022. Multi-criteria assessment of the economic and environmental sustainability characteristics of intermediate wheatgrass grown as a dual-purpose grain and forage crop. *Sustainability*, 14(6): 3548. <https://doi.org/10.3390/su14063548>
- Law EP, Pelzer CJ, Wayman S, DiTommaso A, Ryan MR. 2021. Strip-tillage renovation of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) for maintaining grain yield in mature stands. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 36(4): 321-327. <https://doi.org/10.1017/S1742170520000368>
- Lazenby A, Rogers HH. 1964. Selection criteria in grass breeding. II. Effect, on *Lolium perenne*, of differences in population density, variety and available moisture.

- The Journal of Agricultural Science, 62(02): 285–298.
<https://doi.org/10.1017/S0021859600060937>
- Ledo A, Smith P, Zerihun A, Whitaker J, Vicente-Vicente JL, Qin Z, McNamara NP, Zinn YL, Llorente M, Liebig M, Kuhnert M, Dondini M, Don A, Diaz-Pines E, Datta A, Bakka H, Aguilera E, Hillier J. 2020. Changes in soil organic carbon under perennial crops. *Global change biology*, 26(7): 4158-4168.
<https://doi.org/10.1111/gcb.15120>
- Lee JM, Donaghy DJ, Roche JR. 2008. Effect of defoliation severity on regrowth and nutritive value of perennial ryegrass dominant swards. *Agronomy Journal*, 100(2): 308-314. <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0099>
- Lee RB, DeVore I. 1968. Problems in the study of hunters and gatherers. En: Lee RB, DeVore I. (Eds.). *Man the hunter*. Chicago: Aldine. 3-12.
- Li G, Yu M, Fang T, Cao S, Carver BF, Yan L. 2013. Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by T a VRN-A 1 at the protein level. *The Plant Journal*, 76(5): 742-753. <https://doi.org/10.1111/tpj.12326>
- Li H, Liu J, Li G, Shen J, Bergström L, Zhang F. 2015. Past, present, and future use of phosphorus in Chinese agriculture and its influence on phosphorus losses. *Ambio*, 44, 274-285.
- Locatelli A, Bhatta M, Gutiérrez L, Mastandrea N, Viega L, Castro AJ. 2022. Genetic control of barley phenology in South American environments. *Euphytica*, 218(5): 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10681-022-02993-2>
- Loukoianov A, Yan L, Blechl A, Sanchez A, Dubcovsky J. 2005. Regulation of VRN-1 vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat. *Plant Physiology*, 138(4): 2364-2373. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064287>
- Lu S, Bai X, Li W, Wang N. 2019. Impacts of climate change on water resources and grain production. *Technological Forecasting and Social Change*, 143: 76-84.
<https://doi.org/10.1016/j.techfore.2019.01.015>
- Lv B, Nitcher R, Han X, Wang S, Ni F, Li K, Pearce S, Wu J, Dubcovsky J, Fu D. 2014. Characterization of FLOWERING LOCUS T1 (FT1) gene in *Brachypodium* and wheat. *PLoS One*, 9(4): e94171.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094171>

- Lynch M, Walsh B. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. En: Lynch M, Walsh B. (Eds.). Parent-offspring regression. (Vol. 1, Sunderland, MA: Sinauer). 535-557.
- Mahelka V, Kopecký D, Paštová L. 2011. On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). BMC Evolutionary Biology, 11(1): 1-17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-127>
- Mahlayeye M, Darvishzadeh R, Nelson A. 2022. Cropping Patterns of Annual Crops: A Remote Sensing Review. Remote Sensing, 14(10): 2404. <https://doi.org/10.3390/rs14102404>
- Majidi MM, Bahrami S, Abtahi M, Mirlohi A, Araghi B. 2017. Genetic analysis of seed-related traits in smooth brome grass (*Bromus inermis*) under well-watered and water-stressed conditions. Grass and Forage Science, 72(1): 163-173. <https://doi.org/10.1111/gfs.12230>
- Majidi MM, Hoseini B, Abtahi M, Mirlohi A, Araghi B. 2015. Genetic analysis of seed related traits in Orchardgrass (*Dactylis glomerata*) under normal and drought stress conditions. Euphytica, 203(2): 409-420. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1299-6>
- Majidi MM, Mirlohi A, Amini F. 2009. Genetic variation, heritability and correlations of agro-morphological traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Euphytica, 167(3): 323-331. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9887-6>
- Mallarino AP, Stewart BM, Baker JL, Downing JD, Sawyer JE. 2002. Phosphorus indexing for cropland: Overview and basic concepts of the Iowa phosphorus index. Journal of Soil and Water Conservation, 57(6): 440-447.
- Manuamorn OP, Biesbroek R, Cebotari V. 2020. What makes internationally-financed climate change adaptation projects focus on local communities? A configurational analysis of 30 Adaptation Fund projects. Global Environmental Change, 61: 102035. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2020.102035>
- Marti A, Qiu X, Schoenfuss TC, Seetharaman K. 2015. Characteristics of perennial wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) and refined wheat flour blends: Impact

- on rheological properties. *Cereal Chemistry*, 92(5): 434-440.
<https://doi.org/10.1094/CCHEM-01-15-0017-R>
- Martínez-Dalmau J, Berbel J, Ordóñez-Fernández R. 2021. Nitrogen fertilization. A review of the risks associated with the inefficiency of its use and policy responses. *Sustainability*, 13(10): 5625. <https://doi.org/10.3390/su13105625>
- Martiniello P. 1998. Influence of agronomic factors on the relationship between forage production and seed yield in perennial forage grasses and legumes in a Mediterranean environment. *Agronomie*, 18(8-9): 591-601.
- Mathiowetz A. 2018. Evaluation of the Chemical and Functional Stability of Intermediate Wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) over Storage and in Response to Steam Treatment: [En línea]. Doctoral dissertation. Minnesota, USA. University of Minnesota. 197 p. 8 agosto 2023. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11299/202079>
- Meijer WJM. 1984. Inflorescence production in plants and in seed crops of *Poa pratensis* L. and *Festuca rubra* L. as affected by juvenility of tillers and tiller density. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 32(2): 119-136.
<https://doi.org/10.18174/njas.v32i2.16911>
- Meiss H, Médiène S, Waldhardt R, Caneili J, Munier-Jolain N. 2010. Contrasting weed species composition in perennial alfalfas and six annual crops: Implications for integrated weed management. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 657-666. <https://doi.org/10.1051/agro/2009043>
- Melkonyan A, Asadoorian MO. 2014. Climate impact on agro-economy in semiarid region of Armenia. *Environment, Development and Sustainability* 16(2): 393-414.
- Meyer WA, Funk CR. 1989. Progress and benefits to humanity from breeding warm-season forage grasses. En DA Sleper, KH Assay, J.F. Pedersen (Eds.). *Contributions from breeding forages and turfgrasses*. Crop Society of America. 31-48
- Meyer RS, Purugganan MD. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics*, 14(12): 840-852.
<https://doi.org/10.1038/nrg3605>

- Milec Z, Strejčková B, Šafář J. 2023. Contemplation on wheat vernalization. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1093792. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1093792>
- Montgomery DR. 2007. Soil erosion and agricultural sustainability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(33): 13268-13272.
- Moore KJ. 2003. Compendium of common forages. En: Barnes RF, Nelson CJ, Collins M, Moore KJ. (Eds.). *Forages: an introduction to grassland agriculture*, 6th ed. Iowa State University Press, Iowa. 237-238.
- Moore KJ, Vogel KP, Klopfenstein TJ, Masters RA, Anderson BE. 1995. Evaluation of four intermediate wheatgrass populations under grazing. *Agronomy Journal*, 87:744. <https://doi.org/10.2134/agronj1995.00021962008700040022x>
- Nearing MA, Xie Y, Liu B, Ye Y. 2017. Natural and anthropogenic rates of soil erosion. *International Soil and Water Conservation Research*, 5(2): 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2017.04.001>
- Nguyen HT, Sleper DA. 1983a. Theory and application of half-sib matings in forage grass breeding. *Theoretical and applied genetics*, 64(3): 187-196. <https://doi.org/10.1007/BF00303763>
- Nguyen HT, Sleper DA. 1983b. Genetic variability of seed yield and reproductive characters in tall fescue. *Crop Science*, 23(4): 621-626. <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300040006x>
- Novoa R, Loomis RS. 1981. Nitrogen and plant production. *Plant and Soil* 58: 177-204. <https://doi.org/10.1007/BF02180053>
- Nyong A, Adesina F, Elasha BO. 2007. The value of indigenous knowledge in climate change mitigation and adaptation strategies in the African Sahel. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 12(5): 787-797. <https://doi.org/10.1007/s11027-007-9099-0>
- O'Connor T. 1991. Local extinction in perennial grasslands: A life-history approach. *The American Naturalist*, 137(6): 753-773. <https://doi.org/10.1086/285192>
- Ogle D. 2018. Intermediate Wheatgrass: *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey. Boise, ID. <http://phytozome.jgi.doe.gov/>
- Oliver SN, Finnegan EJ, Dennis ES, Peacock WJ, Trevaskis B. 2009. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation

- at the VERNALIZATION1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20): 8386-8391. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903566106>
- Olsen KM, Wendel JF. 2013. A bountiful harvest: genomic insights into crop domestication phenotypes. *Annual review of plant biology*, 64: 47-70. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120048>
- Olugbenle O, Pinto P, Picasso VD. 2021. Optimal planting date of Kernza intermediate wheatgrass intercropped with red clover. *Agronomy*, 11(11): 2227. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112227>
- Ortiz R, Sayre KD, Govaerts B, Gupta R, Subbarao GV, Ban T, Hodson D, Dixon JM, Ortiz-Monasterio JV, Reynolds M. 2008. Climate change: can wheat beat the heat? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 126(1-2): 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.01.019>
- Osman AM, Goodman PJ, Cooper JP. 1977. The effects of nitrogen, phosphorus and potassium on rates of growth and photosynthesis of wheat. *Photosynthetica*, 11: 66-75.
- Osterholz WR, Renz MJ, Jokela WE, Grabber JH. 2019. Interseeded alfalfa reduces soil and nutrient runoff losses during and after corn silage production. *Journal of Soil and Water Conservation*, 74(1): 85-90. <https://doi.org/10.2489/jswc.74.1.85>
- Paolo B, Lara R, Martina C, Emma T, Giacomo T, Beatrice F, Adolfo R. 2022. Nitrogen fertilization levels and timing affect the plasticity of yield components in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 289: 108734. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108734>
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. 2007. Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11: 1633-1644. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>
- Piltz JW, Morris SG, Weston LA. 2021. Winter forage crop harvest time impacts regeneration of the annual weeds barley grass, annual ryegrass and wild radish. *Agronomy*, 11(9): 1700. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091700>
- Picasso VD. 2023. Grazing management of “Kernza” Intermediate wheatgrass as a dual purpose crop. [En línea]. Consultado: 2 julio 2023. Disponible en: <https://projects.sare.org/project-reports/lnc16-383/>

- Picasso VD, Berti M, Cassida K, Collier S, Fang D, Finan A, Krome M, Hannaway D, Lamp W, Stevens AW, Williams C. 2022. Diverse perennial circular forage systems are needed to foster resilience, ecosystem services, and socioeconomic benefits in agricultural landscapes. *Grassland Research*, 1(2): 123-130. <https://doi.org/10.1002/qlr2.12020>
- Pimentel D. 2006. Soil erosion: A food and environmental threat. *Environment, Development and Sustainability*, 8(1): 119e137, 8. <https://doi.org/10.1007/s10668-005-1262-8>
- Pinto P, Cartoni-Casamitjana S, Cureton C, Stevens AW, Stoltenberg DE, Zimbric J, Picasso VD. 2022. Intercropping legumes and intermediate wheatgrass increases forage yield, nutritive value, and profitability without reducing grain yields. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 977841. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.977841>
- Pinto P, Culman S, Crews T, DeHaan L, Jungers J, Larsen J, Maul J, Pugliese J, Ryan M R, Schipanski ME, Sulc RM, Wayman S, Wiedenhoef MH, Picasso VD. 2021a. Dual- use Kernza intermediate wheatgrass seasonal forage yield and nutritional value across North America. [En línea]. En: ASA, CSSA, SSSA International Annual Meeting (2021, Salt Lake City, UT). Proceedings. 8 agosto 2023. Disponible en: <https://scisoc.confex.com/scisoc/2021am/meetingapp.cgi/Paper/135198>
- Pinto P, De Haan L, Picasso V. 2021b. Post-harvest management practices impact on light penetration and kernza intermediate wheatgrass yield components. *Agronomy*, 11(3): 442. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030442>
- Pizarro DM, Akinn MS, Picasso VD, Wattiaux MA. 2022. Methane and carbon dioxide production of dairy heifers fed Kernza Intermediate wheatgrass straw mixed with alfalfa haylage and corn silage. [En línea]. En: ADSA Annual Meeting (2022, Kansas City, MO). Proceedings. 8 agosto 2023. Disponible en: <https://www.adsa.org/Meetings/2022-Annual-Meeting/Abstracts>
- Preston JC, Fjellheim S. 2022. Flowering time runs hot and cold. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac111>

- Pugliese JY, Culman SW, Sprunger SD. 2019. Harvesting forage of the perennial grain crop Kernza (*Thinopyrum intermedium*) increase root biomass and soil nitrogen. Plant Soil. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03974-6>
- Pugliese JY. 2017. Above-and belowground response to managing kernza (*Thinopyrum intermedium*) as a dual-use crop for forage and grain. Master's thesis, The Ohio State University. 110 p.
- Rahardjo CP, Gajadeera CS, Simsek S, Annor G, Schoenfuss TC, Marti A, Ismail BP. 2018. Chemical characterization, functionality, and baking quality of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). Journal of Cereal Science, 83: 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.09.002>
- Rahardjo CP. 2017. Chemical Characterization, Functionality, and Baking Quality of Intermediate Wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). A thesis submitted to the faculty of university of minnesota in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science. Minnesota, USA. University of Minnesota. 124 p.
- Ravindranath NH, Sathaye JA. 2003. Climate change and developing countries. En: Climate Change and Developing Countries. Springer, Dordrecht. P. 247-265.
- Ray IM, Harms JP. 1994. Heritabilities of morphological and agronomic traits in western wheatgrass. Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives, 47(1): 60-63. <https://doi.org/10.2307/4002842>
- Reilly J. 1995. Climate change and global agriculture: Recent findings and issues. American Journal of Agricultural Economics, 77: 727-733.
- Reilly EC, Gutknecht JL, Tautges NE, Sheaffer CC, Jungers JM. 2022. Nitrogen transfer and yield effects of legumes intercropped with the perennial grain crop intermediate wheatgrass. Field Crops Research, 286: 108627. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108627>
- Richards JH. 1993. Physiology of plants recovering from defoliation. En: Baker MJ (Eds.). XVII International Grassland Congress (1993, Palmerston North, New Zealand). Proceedings. 85-94.
- Rickert B, van den Berg H, Bekure K, Girma S, de Roda Husman AM. 2019. Including aspects of climate change into water safety plan-ning: literature review of global

- experience and case studies from Ethiopian urban supplies. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(5):744-755.
- Ritchie H, Roser M. 2020. Environmental Impacts of Food Production. Our world in data. Consultado 2 julio 2023. Disponible en: <https://ourworldindata.org/environmental-impacts-of-food>
- Rivelli GM, Fernández Long ME, Abeledo LG, Calderini DF, Miralles DJ, Rondanini DP. 2021. Assessment of heat stress and cloudiness probabilities in post-flowering of spring wheat and canola in the Southern Cone of South America. *Theoretical and Applied Climatology*, 145(3-4): 1485-1502. <https://doi.org/10.1007/s00704-021-03694-x>
- Rubio V, Diaz-Rossello R, Quincke JA, van Es HM. 2021. Quantifying soil organic carbon's critical role in cereal productivity losses under annualized crop rotations. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 321: 107607. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107607>
- Sacks EJ, Roxas JP, Cruz MTS. 2003. Developing perennial upland rice II: Field performance of S1 families from an intermated *Oryza sativa*/*O. longistaminata* population. *Crop Science*, 43(1): 129-134. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1290>
- Saha MC. 2014. Tall Fescue. En: Cai H, Yamada T, Kole C. (Eds.). *Genetics, genomics and breeding of forage crops*. (CRC Press). 58-89.
- Sakiroglu M, Dong C, Hall MB, Jungers J, Picasso V. 2020. How does nitrogen and forage harvest affect belowground biomass and nonstructural carbohydrates in dual-use Kernza intermediate wheatgrass? *Crop Science*, 60(5): 2562-2573. <https://doi.org/10.1002/csc2.20239>
- Sampoux JP, Baudouin P, Bayle B, Béguier V, Bourdon P, Chosson JF, Deneufbourg F, Galburn C, Ghesquere M, Noël D, Pietraszek W, Tharel B, Viguié A 2011. Breeding perennial grasses for forage usage: An experimental assessment of trait changes in diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars released in the last four decades. *Field Crops Research*, 123(2): 117-129. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.05.007>

- Sanford GR, Jackson RD, Booth EG, Hedtcke JL, Picasso V. 2021. Perenniality and diversity drive output stability and resilience in a 26-year cropping systems experiment. *Field Crops Research*, 263: 108071. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108071>
- Sanford GR. 2014. Perennial grasslands are essential for long term SOC storage in the Mollisols of the North Central USA. En: Hartemink A, McSweeney K. (Eds.). *Soil carbon*. (Springer Cham). 281-288. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04084-4_29
- Sapkota TB, Vetter SH, Jat ML, Sirohi S, Shirsath PB, Singh R, Jat HS, Smith P, Hillier J, Stirling CM. 2019. Cost-effective opportunities for climate change mitigation in Indian agriculture. *Science of the Total Environment*, 655: 1342-1354. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.225>
- Sasani S, Hemming MN, Oliver SN, Greenup A, Tavakkol-Afshari R, Mahfoozi S, Poustini K, Sharifi HR, Dennis ES, Peacock WJ, Trevaskis B. 2009. The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 2169-2178. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp098>
- Searle SR. 1965. The value of indirect selection: I. Mass selection. *Biometrics*, 682-707. <https://doi.org/10.2307/2528550>
- Schlautman B, Barriball S, Ciotir C, Herron S, Miller AJ. 2018. Perennial grain legume domestication phase I: criteria for candidate species selection. *Sustainability*, 10(3): 730. <https://doi.org/10.3390/su10030730>
- Sheldon CC, Finnegan EJ, Rouse DT, Tadege M, Bagnall DJ, Helliwell CA, ... Dennis ES. 2000. The control of flowering by vernalization. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(5), 418-422. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00106-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00106-0)
- Silvertown J, Dodd M. 1996. Comparing plants and connecting traits. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1345): 1233-1239. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0106>
- Sinclair TR, Horie T. 1989. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. *Crop Science*, 29(1): 90-98. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900010023x>

- Slafer GA, Rawson HM. 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Functional Plant Biology*, 21(4): 393-426. <https://doi.org/10.1071/PP9940393>
- Sleiderink J. 2020. The role of the deep roots of perennial cereal *Kernza* in a drying climate. Doctoral dissertation, Wageningen University. 42 p.
- Smaje C. 2015. The strong perennial vision: A critical review. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 39(5): 471-499. <https://doi.org/10.1080/21683565.2015.1007200>
- Smith KA, McTaggart IP, Tsuruta H. 1997. Emissions of N₂O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use and Management*, 13: 296-304. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.1997.tb00601.x>
- Snape JW, Butterworth K, Whitechurch E, Worland AJ. 2001. Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. En: *Wheat in a Global Environment (Proceedings of the 6th International Wheat Conference, 2000, Budapest, Hungary)*. Springer Netherlands. 67-74. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3674-9_7
- Somura H Takeda I Arnold JG, Mori Y, Jeong J, Kannan N, Hoffman D. 2012. Impact of suspended sediment and nutrient loading from land uses against water quality in the Hii River basin, Japan. *Journal of Hydrology*, 450: 25-35.
- Srivastav AL, Dhyan R, Ranjan M, Madhav S, Sillanpää M. 2021. Climate-resilient strategies for sustainable management of water resources and agriculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(31): 41576-41595. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14332-4>
- Studer B, Jensen LB, Hentrup S, Brazauskas G, Kölliker R, Lübberstedt T. 2008. Genetic characterisation of seed yield and fertility traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 117(5): 781-791. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0819-y>
- Sutherlin CE, Brunsell NA, de Oliveira G, Crews TE, DeHaan L, Vico G. 2019. Contrasting physiological and environmental controls of evapotranspiration over

- Kernza perennial crop, annual crops, and C4 and mixed C3/C4 grasslands. *Sustainability*, 11(6), 1640. <https://doi.org/10.3390/su11061640>
- Sykes VR, Allen FL, DeSantis AC, Saxton AM, Bhandari HS, West DR, Hughes EW, Bobbitt ME, Benelli VG. 2017. Efficiency of spaced-plant selection in improving sward biomass and ethanol yield in switchgrass. *Crop Science*, 57(1): 253-263. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.07.0596>
- Tao D, Sripichitt P. 2000. Preliminary report on transfer traits of vegetative propagation from wild rice species to *Oryza sativa* via distant hybridization and embryo rescue. *Kasetsart Journal, Natural Sciences*, 34(1): 1-11.
- Tautges NE, Jungers JM, DeHaan LR, Wyse DL, Sheaffer CC. 2018. Maintaining grain yields of the perennial cereal intermediate wheatgrass in monoculture v. bi-culture with alfalfa in the Upper Midwestern USA. *The Journal of Agricultural Science*, 156(6): 758-773. <https://doi.org/10.1017/S0021859618000680>
- Thiele J, Jørgensen RB, Hauser TP. 2009. Flowering does not decrease vegetative competitiveness of *Lolium perenne*. *Basic and Applied Ecology*, 10(4): 340-348. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2008.04.002>
- Tilman D, Hill J, Lehman C. 2006. Carbon-negative biofuels from low-input high diversity grassland biomass. *Science*, 314: 1598-1600. <https://doi.org/10.1126/science.1133306>
- Tilman D, Cassman K, Matson P, Naylor R, Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>
- Tilman D, Reich PB, Knops J, Wedin D, Mielke T, Lehman C. 2001. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, 294: 843-845. <https://doi.org/10.1126/science.10603>
- Tork DG, Anderson NO, Wyse DL, Betts KJ. 2019. Domestication of perennial flax using an ideotype approach for oilseed, cut flower, and garden performance. *Agronomy*, 9(11): 707. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110707>

- Trethowan RM, Hodson D, Braun HJ, Pfeifer WH, van Ginkel M. 2005. Impacts of international wheat breeding research in the developing world, 1988-2002. En: Lantican MA, Dubin HJ, Morris ML. (Eds.). Wheat breeding environments. Mexico: Cimmyt. 4-11.
- Trevaskis B, Hemming MN, Dennis ES, Peacock WJ. 2007. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends in Plant Science*, 12(8): 352-357. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.010>
- Trevaskis B, Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES. 2006. HvVRN2 responds to daylength, whereas HvVRN1 is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiology*, 140(4): 1397-1405. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073486>
- Trione EJ, Metzger RJ. 1970. Wheat and barley vernalization in a precise temperature gradient. *Crop Science*, 10(4): 390-392. <https://doi.org/10.2135/cropsci1970.0011183X001000040023x>
- Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA. 2005. The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science*, 310(5750): 1031-1034. <https://doi.org/10.1126/science.1117619>
- Tyl C, Ismail BP. 2019. Compositional evaluation of perennial wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) breeding populations. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3): 660-669. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13925>
- UN (United Nations). 2019. 9.7 billion on Earth by 2050. [En línea]. 2 julio 2020. Disponible en: <https://www.un.org/en/academic-impact/97-billion-earth-2050-growth-rateslowing-says-new-un-population-report>.
- Van Dijk M, Morley T, Rau ML, Saghai YA. 2021. Meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010-2050. *Nature Food*, 2: 494-501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>
- Van Tassel DL, Albrecht KA, Bever JD, Boe AA, Brandvain Y, Crews TE, Gansberger M, Gerstberger P, Ganzalez-Paleo L, Hulke BS, Kane NC, Johnson PJ, Pestova EG, Picasso Risso VD, Prasifka JR, Ravetta DA, Schlautman B, Sheaffer CC, Smith KP, Speranza PR, Turner MK, Vilela VE, Gehren P von,

- Wever C. 2017. Accelerating silphium domestication: an opportunity to develop new crop ideotypes and breeding strategies informed by multiple disciplines. *Crop Science*, 57(3), 1274-1284. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.10.0834>
- Vico G, Manzoni S, Nkurunziza L, Murphy K, Weih M. 2016. Trade-offs between seed output and life span—a quantitative comparison of traits between annual and perennial congeneric species. *New Phytologist*, 209(1): 104-114. <https://doi.org/10.1111/nph.13574>
- Vilela A, González-Paleo L, Turner K, Peterson K, Ravetta D, Crews TE, Van Tassel D. 2018. Progress and bottlenecks in the early domestication of the perennial oilseed *Silphium integrifolium*, a sunflower substitute. *Sustainability*, 10(3): 638. <https://doi.org/10.3390/su10030638>
- Vilela, AE, González-Paleo L. 2015. Changes in resource-use strategy and phenotypic plasticity associated with selection for yield in wild species native to arid environments. *Journal of Arid Environments*, 113: 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.09.005>
- Virgona JM, Gummer FAJ, Angus JF. 2006. Effects of grazing on wheat growth, yield, development, water use, and nitrogen use. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57: 1307-1319. <https://doi:10.1071/AR06085>
- Vogel KP, Brejda JJ, Walters DT, Buxton DR. 2002. Switchgrass biomass production in the Midwest USA: Harvest and nitrogen management. *Agronomy Journal*, 94(3): 413-420. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.0413>
- Vogel KP, Jensen KJ. 2001. Adaptation of perennial triticeae to the eastern Central Great Plains. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 54(6): 674-679. <https://doi.org/10.2307/4003670>
- Vogel KP, Pedersen JF. 1993. Breeding systems for cross-pollinated perennial grasses. En: Janick J. (Eds.). New York: Wiley & Sons. 251-274. <https://doi:10.1002/9780470650035.ch7>
- Vogel KP, Gorz HJ, Askinns FA. 1989. Breeding grasses for the future. En: Slepner DA, Asay KH, Pedersen JF (Eds.). *Contributions from Breeding Forage and Turf*

- Grasses. (Crop Science Special Publ. 15. Crop Science Society of America, Madison, WI). 105-422.
- Wagoner P, Schaeffer JR. 1990. Perennial grain development: past efforts and potential for the future. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9(5): 381-408. <https://doi.org/10.1080/07352689009382298>
- Wagoner P, Schauer A. 1990. Intermediate wheatgrass as a perennial grain crop. En: Janick, J, Simon JE. (Eds.). *Advances in New Crops*. (Timber Press, Portland, OR). (143-145).
- Waldron BL, Robins JG, Peel MD, Jensen KB. 2008. Predicted efficiency of spaced-plant selection to indirectly improve tall fescue sward yield and quality. *Crop Science*, 48(2): 443-449. <https://doi.org/10.2135/crops ci2007.06.0354>
- Wang ZH, Li SX. 2019. Nitrate N loss by leaching and surface runoff in agricultural land: A global issue (a review). *Advances in agronomy*, 156: 159-217. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.01.007>
- Wang GJ, Nyren P, Xue QW, Aberle E, Eriksmoen E, Tjelde T, Liebig M, Nichols K, Nyren A. 2014. Establishment and yield of perennial grass monocultures and binary mixtures for bioenergy in North Dakota. *Agronomy Journal*, 106: 1605-1613. <https://doi.org/10.2134/agronj14.0068>
- Wang RR C, Larson SR, Jensen KB, Bushman BS, DeHaan LR, Wang S, Yan X. 2015. Genome evolution of intermediate wheatgrass as revealed by EST-SSR markers developed from its three progenitor diploid species. *Genome*, 58(2): 63-70. <https://doi.org/10.1139/gen-2014-0186>
- Ward CY, Pedersen JF, Kee D. 1984. Effect of defoliation and nitrogen on seed production of 'AU Triumph' tall fescue. En: *Forage and Grassland Conference* (1984, Houston, TX). Proceedings. Georgetown, TX. 162-169.
- Watson DJ. 1947. Comparative physiological studies on the growth of field crops. II: The effect of varying nutrient supply on net assimilation rate and leaf area. *Annals Botany*, 12: 281-3.
- Watson CE, Watson VH. 1982. Nitrogen and date of defoliation effects on seed yield and seed quality of tall fescue. *Agronomy Journal* 74: 891-893. <https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400050029x>

- Westerbergh A, Lerceteau-Köhler E, Sameri M, Bedada G, Lundquist PO. 2018. Towards the development of perennial barley for cold temperate climates- evaluation of wild barley relatives as genetic resources. *Sustainability*, 10(6): 1969. <https://doi.org/10.3390/su10061969>
- Williams CM, Boyce KG. 1977. The effect of closing date, stocking rate and nitrogen application on seed and wool production from tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) pastures. En: Wojahn E. Thons H. (Eds.). *International Grassland Congress (13th, 1977, Leipzig, German Democratic Republic)*. Proceedings. Akademie-Verlag Publ., Berlin. 506-512.
- Wilson SD, Tilman D. 1991. Interactive effects of fertilization and disturbance on community structure and resource availability in an old-field plant community. *Oecologia*, 61-71.
- Weik L, Kaul HP, Kübler E, Aufhammer W. 2002. Grain yields of perennial grain crops in pure and mixed stands. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188(5): 342-349. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037X.2002.00580.x>
- Wollenberg AC, Amasino RM. 2012. Natural variation in the temperature range permissive for vernalization in accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 35(12): 2181-2191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02548.x>
- Wollenberg E, Tapio-Bistrom ML, Grieg-Gran M, Nihart A. (Eds.). 2011. *Climate change mitigation and agriculture*. Oxon: Earthscan. ISBN 9781849713924
- Wricke G, Weber WE. 1986. *Quantitative genetics and selection in plant breeding*. Walter de Gruyter and Co., Berlin, Germany.
- Würschum T, Boeven PH, Langer SM, Longin CFH, Leiser WL. 2015. Multiply to conquer: copy number variations at Ppd-B1 and Vrn-A1 facilitate global adaptation in wheat. *BMC genetics*, 16, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0258-0>
- Xiao J, Xu S, Li C, Xu Y, Xing L, Niu Y, Huan Q, Tang Y, Zhao C, Wagner D, Gao C, Chong K. 2014. O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits TaVRN1 mRNA accumulation during vernalization in winter

- wheat. *Nature communications*, 5(1): 4572.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5572>
- Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. 2006. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51): 19581-19586. <https://doi.org/10.1073/pnas.060714210>
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J. 2004. The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*, 303(5664): 1640-1644. <https://doi.org/10.1126/science.1094305>
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10): 6263-6268. <https://doi.org/10.1073/pnas.093739910>
- Yang JY, Drury CF, Jong RD, Huffman EC, Yang XM, Reid K. 2013. Sensitivity analysis for nitrogen inputs, nitrogen outputs, and changes in biofuel crop acreages for predicting residual soil nitrogen and nitrate leaching in Canadian agricultural soils. *Ecological Modelling*. 267: 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.07.016>
- Young III, WC, Youngberg HW, Chilcote DO. 1996. Spring nitrogen rate and timing influence on seed yield components of perennial ryegrass. *Agronomy Journal*, 88(6): 947-951. <https://doi.org/10.2134/agronj1996.00021962003600060017x>
- Zhang S, Huang G, Zhang Y, Lv X, Wan K, Liang J, Feng Y, Dao J, Wu S, Zhang L, Yang X, Lian X, Huang L, Shao L, Zhang J, Qin S, Tao D, Crews TE, Sacks EJ, Wade LJ, Hu F. 2023. Sustained productivity and agronomic potential of perennial rice. *Nature Sustainability*, 6(1): 28-38. <https://doi.org/10.1038/s41893-022-00997-3>
- Zhang SL, Wang WS, Zhang J, Ting Z, Huang WQ, Xu P. 2014. The progression of perennial rice breeding and genetics research in China. En: Batello C, Wade L,

- Cox S, Pogna N, Bozzini A, Choptiany J. (Eds.). Perennial crops for food security. Proceedings of the FAO Expert Workshop, 2014, Rome. 27–38.
- Zhang X, Sallam A, Gao L, Kantarski T, Poland J, DeHaan LR, Wyse D, Anderson JA. 2016. Establishment and Optimization of Genomic Selection to Accelerate the Domestication and Improvement of Intermediate Wheatgrass. *Plant Genome* 9: 1-18. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.07.0059>
- Zimbric JW, Stoltenberg DE, Picasso VD. 2020. Effective weed suppression in dual-use intermediate wheatgrass systems. *Agronomy Journal*, 112(3): 2164-2175. <https://doi.org/10.1002/agj2.20194>
- Zmieńko A, Samelak A, Kozłowski P, Figlerowicz M. 2014. Copy number polymorphism in plant genomes. *Theoretical and applied genetics*, 127: 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2177-7>

7. ANEXOS

7.1. ANEXOS CORRESPONDIENTES AL ARTÍCULO 1

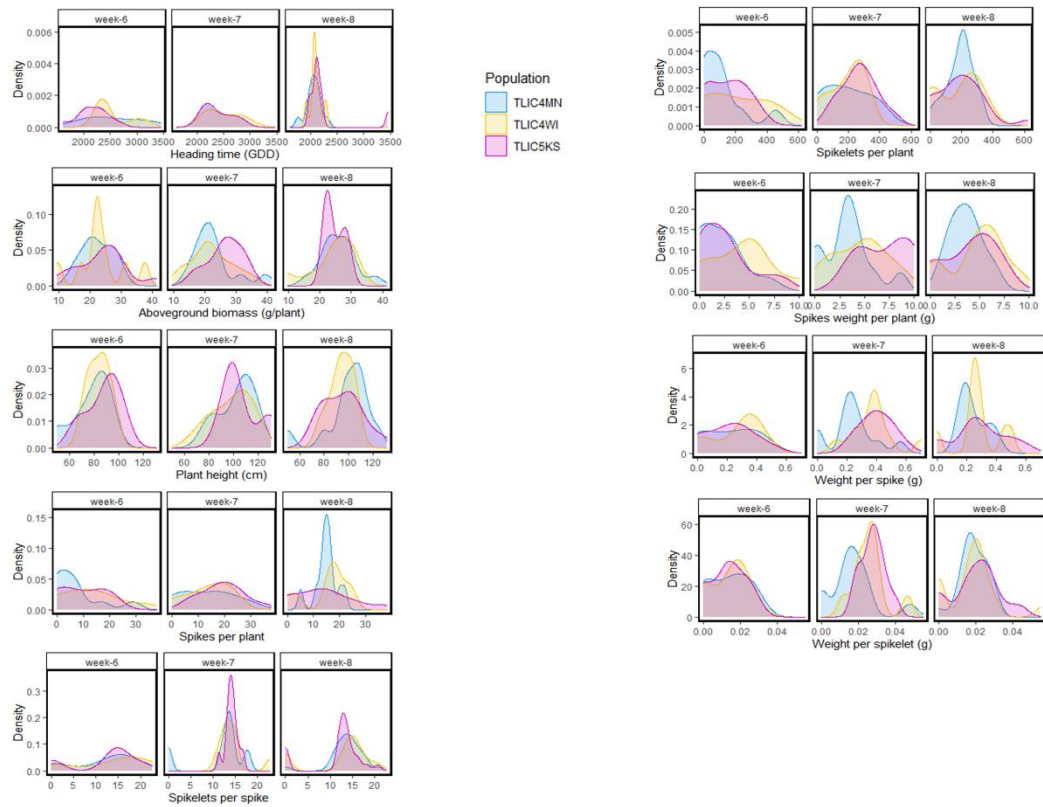
VERNALIZATION REQUIREMENTS OF KERNZA INTERMEDIATE WHEATGRASS

Locatelli, A., Gutierrez, L., & Picasso Risso, V. D. (2022). *Crop Science*, 62(1), 524-535. <https://doi.org/10.1002/csc2.20667>

Supplemental material

Supplemental Table S1. Cumulative mean temperature (°C) and standard deviation (SD) for each of the incubation periods at the two growth chambers used in this experiment.

Growth chamber		Weeks of incubation						
		3	4	5	6	7	8	9
1- Moore Hall	Mean	5.1	4.8	4.6	4.5	4.3	4.2	4.1
	SD	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9
2- Walnut GH	Mean	6.2	5.7	5.2	5.0	4.9	4.9	5.0
	SD	2.3	2.4	2.4	2.2	2.1	2.0	1.9



Supplemental Figure S1. Kernel density plots showing the distribution of all quantitative traits evaluated for TLIC4MN, TLIC4WI and TLIC5KS by 6, 7, and 8 weeks of incubation.

7.2. ANEXOS CORRESPONDIENTES AL ARTÍCULO 2

AGRONOMIC ASSESSMENT OF TWO POPULATIONS OF INTERMEDIATE WHEATGRASS - KERNZA® (THINOPYRUM INTERMEDIUM) IN TEMPERATE SOUTH AMERICA

Locatelli, A., Gutierrez, L., Duchene, O., Speranza, P. R., & Picasso Risso, V. D. (2023). *Grassland Research*. <https://doi.org/10.1002/glr2.12032>

Supporting Information: Table S1. Monthly mean precipitation and temperature in Paysandú, Uruguay, for January 2018 – July 2020, with long-term means (historical mean) for 2002 – 2020. Average daylength for each month is also shown.

Weather variable	year	Jan	Feb	Mar	Apr	May	June	July	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec
Mean temperature, °C	2018	25.0	24.7	22.1	22.9	16.6	10.2	10.3	11.1	17.1	17.2	21.3	22.2
	2019	23.4	23.1	20.1	18.1	15.3	14.7	11.2	11.7	14.8	17.4	22.3	22.6
	2020	24.0	23.5	24.2	18.0	14.5	12.4	10.1					
Historical mean		24.9	23.7	21.7	18.5	14.8	12.1	11.6	13.1	15.0	17.9	21.0	23.3
Precipitation, mm	2018	157	11	55	188	191	11	107	105	95	40	105	237
	2019	497	105	69	71	100	202	28	104	37	206	99	190
	2020	131	61	52	152	46	101	13					
Historical mean		154	192	136	167	121	62	64	105	99	134	126	143
Daylength, hr ^a		14.0	13.2	12.3	11.3	10.5	10.1	10.3	11.0	11.9	12.9	13.8	14.2

^aThe average daylength for each month was calculated from the apparent sunset time minus the apparent sunrise time, using the NOAA solar calculator (<https://gml.noaa.gov/grad/solcalc/index.html>)

N0	N160	N160	N80	N80	N80
N0	N160	N160	N80	N0	N160
N0	N160	N80	N160	N0	N0
N80	N80	N160	N0	N80	N160
N160	N0	N80	N80	N160	N0
N80	N0	N160	N80	N0	N0

Population A
 Population B

Supporting Information: Figure S1. Field plot arrangement table. The replicates of the factorial treatment design with the two populations (A and B) and the three N rates (0, 80 and 160 kg ha⁻¹ year⁻¹) used are shown. The experimental design can also be seen, which was a completely randomized design.

7.3. ANEXOS CORRESPONDIENTES AL ARTÍCULO 3

Supplemental material

Supplemental Table S1. Monthly mean precipitation and temperature in Paysandú, Uruguay, for January 2018 – March 2021, with long-term means (historical mean) for 2002 – 2021. Average daylength and accumulated VUs and UPVTs for each month are also shown.

Weather variable	Mean temperature, °C					Daylength, hr ^a	VUs		UPVTs				Precipitation, mm					
	year	2018	2019	2020	2021		Historical mean	Stand age 1	Stand age 2	Stand age 1		Stand age 2		2018	2019	2020	2021	Historical mean
								2019	2020	2019	2020	2020	2021					
Jan	25.0	23.4	24.0	24.8	24.9	14.0			866,9		1115,3		157	497	131	117	152	
Feb	24.7	23.1	23.5	23.1	23.7	13.2			952,2				11	105	61	38	184	
Mar	22.1	20.1	24.2	21.3	21.7	12.3							55	69	52	121	135	
Apr	22.9	18.1	18.0		18.5	11.3	0		0,0				188	71	152		170	
May	16.6	15.3	14.5		14.7	10.5	0	0	0,0		0,0		191	100	46		118	
June	10.2	14.7	12.4		12.0	10.1	3,4	8,1	0,1		0,8		11	202	101		63	
July	10.3	11.2	10.1		11.6	10.3	15,7	26,4	4,6		7,3		107	28	13		65	
Aug	11.1	11.7	14.5		13.1	11.0	27,7	33,5	24,0		35,8		105	104	44		102	
Sept	17.1	14.8	14.2		15.0	11.9	28,0	37,0	71,0		95,3		95	37	80		98	
Oct	17.2	17.4	17.9		17.9	12.9	28,7	37,8	153,3		208,2		40	206	25		129	
Nov	21.3	22.3	21.8		21.0	13.8	0	0	303,3		421,9		105	99	73		124	
Dec	22.2	22.6	23.0		23.3	14.2	0	0	577,1		790,1		237	190	55		143	

Supplemental Table S2. Means across years of traits evaluated in Paysandú (Uruguay) during 2020 and 2021 for each intermediate wheatgrass half-sib family. Quantitative traits that had significant differences by analysis of variance and post hoc analysis are shown. Means within column followed by a common letter are not significantly different by the Tukey test at the 5% level of significance.

Spikes per plant			Spikelets per spike			Grain yield per spike (g)			Grain yield per spikelet (g)			Grain yield per plant (g)		
Family	Mean		Family	Mean		Family	Mean		Family	Mean		Family	Mean	
F4	34,79	a	F216	22	a	F586	0,16	a	F772	0,0090	a	F20	4.809	a
F20	34,2	a	Pc	20,6	ab	F772	0,16	ab	F586	0,0086	ab	F257	4.590	ab
F257	33,73	a	F753	20,6	ab	F216	0,16	abc	B7-4	0,0078	abc	F216	4.536	ab
F216	30,64	ab	F7	20,2	ab	F20	0,15	abc	F20	0,0074	abcd	F772	4.241	abc
F7	30,16	ab	F472	20,2	ab	B7-4	0,14	abcd	F542	0,0074	abcde	F7	3.820	abcd
F764	29,32	ab	F20	20,1	ab	F227	0,13	abcde	F216	0,0071	abcdef	F764	3.525	abcd
F753	29,07	ab	F227	19,9	ab	F764	0,13	abcde	F257	0,0069	abcdef	F227	3.448	abcd
Pc	27,23	ab	F842	19,9	ab	F304	0,13	abcde	F304	0,0068	abcdef	Pc	3.403	abcd
F634	26,15	ab	F257	19,6	ab	F542	0,13	abcde	F764	0,0067	abcdef	F586	3.301	abcd
F1	25,05	ab	F98	19,4	ab	F257	0,13	abcde	F227	0,0065	abcdef	F753	3.143	abcd
F227	24,8	ab	F4	19,3	ab	F7	0,12	abcde	F789	0,0064	abcdef	F4	3.018	abcd
F772	24,72	ab	F466	19,2	ab	F472	0,12	abcde	F634	0,0060	abcdef	F789	2.847	abcd
F789	24,72	ab	F764	19,2	ab	F842	0,12	abcde	F7	0,0060	abcdef	F472	2.791	abcd
F605	24,45	ab	F586	19,1	ab	F634	0,11	abcde	F472	0,0058	abcdef	B7-4	2.791	abcd
F472	23,79	ab	F304	19,1	ab	Pc	0,11	abcde	B7-2	0,0057	abcdef	F542	2.787	abcd
F842	22,34	ab	F634	19	ab	F789	0,11	abcde	F842	0,0057	abcdef	F605	2.748	abcd
F586	21,73	ab	F542	18,9	ab	B7-2	0,10	abcde	F605	0,0056	abcdef	F634	2.724	abcd
B7-3	21,61	ab	F772	18,9	ab	F466	0,10	abcde	F308	0,0055	abcdef	F304	2.611	abcd
F466	20,83	ab	B7-4	18,8	ab	F857	0,10	abcde	Pc	0,0054	abcdef	F842	2.603	abcd

F98	20,79	ab	Pb	18,7	ab	Pb	0,09	abcde	F857	0,0054	abcdef	F466	2.169	abcd
B7-4	20,57	ab	F789	18,7	ab	F753	0,09	abcde	F466	0,0050	bcdef	F857	2.110	abcd
F857	19,43	ab	F337	18,7	ab	F4	0,08	bcde	Pb	0,0048	bcdef	B7-3	1.889	abcd
F542	18,61	ab	F1	18,4	ab	F605	0,08	cde	Pa	0,0045	cdef	B7-2	1.857	abcd
F304	18,39	ab	B7-2	18,2	b	Pa	0,08	cde	F753	0,0044	cdef	F98	1.726	abcd
B7-2	18,27	ab	F308	18,1	b	F98	0,08	cde	F98	0,0043	cdef	F1	1.589	abcd
Pb	15,69	ab	F605	17,9	b	F308	0,07	de	F4	0,0043	cdef	F308	1.580	abcd
F337	15,39	ab	F857	17,8	b	F1	0,06	e	F328	0,0039	def	Pb	1.556	abcd
F308	12,87	ab	B7-3	17,8	b	F337	0,06	e	B7-3	0,0037	def	F337	1.311	bcd
Pa	11,72	ab	F328	17,8	b	F328	0,06	e	F337	0,0035	ef	Pa	0,938	cd
F328	8,95	b	Pa	17,2	b	B7-3	0,06	e	F1	0,0035	f	F328	0,611	d

cont. Supplemental Table S2

Harvest index			Heading time (GDD)			Grain harvest time (GDD)			Summer forage yield (g plant ⁻¹)		
Family	Mean		Family	Mean		Family	Mean		Family	Mean	
F634	5.5	a	F20	3065	a	F20	4672	a	F4	124,1	a
F227	4.4	ab	F304	3084	ab	F842	4750	ab	Pc	122,6	ab
F216	4.2	abc	F586	3107	ab	F753	4777	ab	F753	119	abc
F20	4.1	abc	F472	3124	ab	B7-3	4785	ab	F20	118,9	abc
F586	3.8	abc	F753	3133	ab	F472	4806	ab	F257	118,3	abc
F764	3.6	abc	F764	3135	ab	F586	4831	ab	F7	117	abc
F257	3.6	abc	F842	3138	ab	F764	4833	ab	F542	115,9	abc
F789	3.5	abc	F605	3145	ab	F308	4840	ab	F772	113	abc
F542	3.4	abc	B7-3	3156	abc	F605	4850	ab	F98	110,3	abc
F772	3.3	abc	Pc	3199	abc	F789	4858	ab	B7-4	108,6	abc

F7	3.2	abc	F227	3224	abcd	F257	4871	ab	F605	102	abc
F472	3.2	abc	F257	3224	abcd	F304	4871	ab	F857	102	abc
F304	3.2	abc	F308	3227	abcd	F98	4887	ab	F1	98,1	abc
F842	2.7	abc	B7-4	3229	abcd	B7-2	4887	ab	F764	97,5	abc
B7-4	2.5	abc	F4	3241	abcd	F227	4891	ab	F216	95,4	abc
B7-2	2.5	abc	F772	3247	abcd	Pc	4909	ab	Pa	93	abc
F466	2.4	abc	F789	3251	abcd	F4	4910	ab	F586	92,3	abc
Pc	2.4	abc	F7	3252	abcd	F337	4915	ab	B7-3	90,8	abc
F4	2.3	abc	F98	3262	abcd	F7	4935	ab	Pb	90	abc
F753	2.1	abc	F337	3268	abcd	F857	4937	ab	F304	87,5	abc
F337	2.1	abc	B7-2	3274	abcd	F466	4945	ab	F466	86,5	abc
F308	2.0	bc	F466	3282	abcd	F1	4953	ab	F842	86	abc
F605	1.9	bc	F216	3302	abcd	F542	4958	ab	F472	80,3	abc
Pb	1.7	bc	F857	3309	abcd	B7-4	4964	ab	F227	74,8	abc
B7-3	1.7	bc	Pb	3331	abcd	Pa	4965	ab	B7-2	74,3	abc
F857	1.7	bc	F1	3336	abcd	F216	4969	ab	F328	73,4	abc
F98	1.5	bc	F634	3346	abcd	Pb	5002	b	F789	73,1	abc
F1	1.4	bc	Pa	3353	bcd	F772	5042	b	F634	69,5	abc
Pa	1.0	bc	F328	3442	cd	F634	5049	b	F308	53,7	bc
F328	0,8	c	F542	3509	d	F328	5049	b	F337	51,7	c