



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias
Doctorado de la UNNE "Área Recursos Naturales"

**Los sistemas genéticos en poblaciones de complejos
agámicos del género *Paspalum***

Tesis para optar al título de Doctor
Ing. Agr. María Esperanza Sartor

Director: Dr. Francisco Espinoza
Co-director: Ing. Agr. Camilo L. Quarín

Lugar de trabajo: Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET)

2011

Los sistemas genéticos en poblaciones de complejos agámicos del género
Paspalum

María Esperanza Sartor

Ingeniera Agrónoma – FCA-UNNE

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en el área Recursos Naturales, y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE), durante el período comprendido entre Noviembre de 2006 y Noviembre de 2010, bajo la dirección del Dr. Francisco Espinoza y el Ing. Agr.

Camilo L. Quarín.

Dr. Francisco Espinoza.....

Ing. Agr. Camilo L. Quarín.....

Ing. Agr. María E. Sartor.....

.....

.....

Fecha de defensa: 22 de marzo de 2011.....

Para Gregorio, Candelaria y Lucía

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a las instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis doctoral. A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) y al Instituto de Botánica del Nordeste por brindarme un ámbito adecuado para llevar a cabo este trabajo. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar mis estudios de doctorado.

Del mismo modo quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me apoyaron y colaboraron durante esta etapa tan importante en mi formación tanto académica como personal.

A mi director, el Dr. Francisco Espinoza, por haber confiado en mí desde mi etapa de estudiante de grado. Gracias por compartir conmigo tu tiempo, tus ideas y esos largos viajes de colección que sin duda fueron parte fundamental de este trabajo.

A mi Codirector, el Ing. Agr. Camilo Quarín, por ofrecerme constantemente su inmensurable conocimiento, por los consejos brindados y las largas charlas futboleras.

A Mario Hugo Urbani por haberme iniciado en este tema tan apasionante, por su permanente presencia y su amistad.

A todos los integrantes del IBONE y en especial mis compañeros de la Cátedra de Genética y del laboratorio de Genética de Pastos Nativos, Flopy, Romina, Mapy, Patricia, Diego, Andrea, Irene, Guillermo, Eric, Edmundo. Por las largas jornadas compartidas, de las que me quedan enseñanzas y recuerdos imborrables.

Flopy, gracias por entenderme como profesional y como madre y por ayudarme cada vez que lo necesité.

A las chicas del labo, Mapy, Romina, Patricia y Andrea, siempre dispuestas a escucharme y a brindarme una mano como buenas amigas.

Al Licenciado Antonio Garayalde del CERSOS, Bahía Blanca, por haberme brindado su ayuda desinteresadamente, prestándome su tiempo y su paciencia.

Finalmente quiero brindar un profundo agradecimiento a mi Familia.

A mis padres, Elsa y Jorge, por su entrega y su lucha. Porque me enseñaron que en la vida no hay que bajar los brazos ni se debe renunciar a lo máspreciado que el Hombre posee: la dignidad.

A mis hermanas Mini y Paula, mis mejores y más grandes amigas. Gracias por el apoyo y el amor incondicional.

A mi Abuela Dora, siempre presente en cada momento importante de mi vida, cuidándome y entregándome su cariño.

A Socorro, Cesar, Francisco y Marian, quienes me dan constantemente su afecto y su acompañamiento.

A mis grandes amores, Gregorio, Candelaria y Lucía. Ustedes son el motor que me impulsa todos los días de mi vida y me dan la fuerza para seguir adelante.

Publicaciones derivadas de la tesis:

1. **Sartor ME**, CL Quarin, F Espinoza (2010). Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species". *Plant Systematic and Evolution*. Aceptado.

Publicaciones relacionadas con el tema de tesis:

2. Siena L, **Sartor ME**, Espinoza F, Quarin CL, Ortiz JP (2008). Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction* **21**: 205-215.
3. **Sartor ME**, Quarin CL, Espinoza F (2009). Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Science* **49**: 1270–1276.
4. Elías G, **Sartor M** and Solís Neffa VG (2010). Patterns of cytotype variation of *Turnera sidoides* L. subsp. *pinnatifida* (Turneraceae) in mountain ranges of central Argentina. *Journal of Plant Research*. En prensa.
5. Rebozzio R, **Sartor M**, Quarin C and Espinoza F (2010). Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. *Biologia Plantarum*. Aceptado.

Reuniones científicas:

1. **Sartor ME**, RN Rebozzio, MH Urbani, CL Quarin, F Espinoza (2007). Análisis del sistema genético en una población de *Paspalum denticulatum*. Journal of Basic & Applied Genetics, XXXVI Congreso Argentino de Genética, Pergamino (Bs. As.), 23-26 de septiembre 2007. Resúmenes pág. 163.
2. **Sartor ME**, R Rebozzio, CL Quarin, F Espinoza (2008). nivel de ploidía y sistema reproductivo en tres Poblaciones de *Paspalum nicorae* Parodi. Journal of Basic & Applied Genetics, XXXVII Congreso Argentino de Genética, Tandil (Bs. As.), Septiembre 2008. Resúmenes pág. 168.
3. **Sartor ME**, CL Quarin, F Espinoza. Distribución y frecuencia de citotipos de *Paspalum buckleyanum* en las poblaciones naturales. Lilloa, XXXVIII Congreso Argentino de Genética, Tucumán, Septiembre 2009. Resúmenes pág. 86.
4. **Sartor ME**, CL Quarin, F Espinoza. Genetic variability, ploidy levels and reproductive mode in wild populations of *Paspalum denticulatum*. The 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf. Buenos Aires, Argentina. Marzo de 2010. Resúmenes pág. 198.

ÍNDICE

ÍNDICE	<i>i</i>
ABREVIATURAS	<i>iv</i>
RESUMEN	<i>vii</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
I.- INTRODUCCIÓN	<i>1</i>
I.1.- <i>La poliploidía y su rol en la evolución de las plantas</i>	<i>1</i>
I.1.2.- <i>Mecanismos de formación de los poliploides</i>	<i>3</i>
I.1.3.- <i>Clasificación de los poliploides</i>	<i>5</i>
I.1.4.- <i>Establecimiento de los poliploides</i>	<i>6</i>
I.2.- <i>La poliploidía y su relación con la apomixis</i>	<i>10</i>
I.2.1.- <i>El concepto de Apomixis</i>	<i>11</i>
I.2.2.- <i>Tipos de apomixis</i>	<i>12</i>
I.3.- <i>Los complejos agámicos</i>	<i>14</i>
I.3.1.- <i>Organización de los complejos agámicos</i>	<i>15</i>
I.3.1.1.- <i>El modelo del complejo <u>Taraxacum-Parthenium</u> (Asteraceae)</i>	<i>15</i>
I.3.1.2.- <i>El modelo del complejo <u>Capillipedium-Dichantium-</u> <u>Bothriochloa</u> (Poaceae)</i>	<i>16</i>
I.3.1.3.- <i>El modelo del complejo <u>Panicum maximum</u> (Poaceae)</i>	<i>17</i>
I.3.1.4.- <i>El modelo del complejo <u>Tripsacum</u> (Poaceae)</i>	<i>18</i>
I.3.1.5.- <i>El modelo del complejo <u>Ranunculus auricomus</u> (Ranunculaceae)</i>	<i>19</i>
I.3.1.6.- <i>El modelo del complejo <u>Paspalum</u> (Poaceae)</i>	<i>20</i>
I.3.2.- <i>Distribución de los complejos agámicos en las poblaciones naturales</i>	<i>22</i>
I.3.3.- <i>Patrones de variación genética en poblaciones naturales de complejos agámicos</i>	<i>22</i>

I.3.3.1.- <i>Patrones de variación genética en plantas de reproducción sexual</i>	23
I.3.3.2.- <i>Patrones de variación genética en plantas de reproducción apomíctica</i>	24
I.3.3.2.1.- <i>Heterocigosidad y efectos de la poliploidía</i>	25
I.3.3.2.2.- <i>Diversidad genotípica dentro y entre poblaciones</i>	27
I.3.3.3.- <i>Origen de la variabilidad en plantas apomícticas</i>	29
I.3.3.3.1.- <i>La ascendencia de los complejos apomícticos como factor histórico</i>	29
I.3.3.3.2.- <i>Flujo de genes con especies sexuales relacionadas genéticamente</i>	30
I.3.3.3.3.- <i>Sexualidad facultativa</i>	31
I.3.3.3.4.- <i>Mutaciones</i>	34
I.4.- <i>Los complejos agámicos del género Paspalum: Generalidades</i>	35
I.5.- <i>Las especies en estudio</i>	37
II.- HIPÓTESIS	41
III.- OBJETIVOS	43
III.1.- <i>Objetivo general</i>	44
III.2.- <i>Objetivos particulares</i>	44
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	45
IV.1.- <i>Material Vegetal</i>	46
IV.2.- <i>Muestreo de las poblaciones</i>	48
IV.3.- <i>Determinación del nivel de ploidía</i>	49
IV.4.- <i>Análisis del modo reproductivo</i>	50
IV.5.- <i>Determinación de la variabilidad genética</i>	52
IV.5.1.- <i>Extracción de ADN</i>	53
IV.5.2.- <i>Marcadores moleculares del tipo AFLP</i>	54
IV.5.3.- <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	59
IV.6.- <i>Análisis de datos</i>	60

IV.7.- <i>Análisis de la variabilidad genética</i>	61
IV.8.- <i>Análisis de la variabilidad genotípica</i>	62
IV.9. <i>Determinación del contenido absoluto de ADN</i>	63
V.- RESULTADOS	64
V.1.- <i>Niveles de ploidía</i>	65
V.2.- <i>Sistemas reproductivos</i>	74
V.3.- <i>Variabilidad genética</i>	83
V.3.1.- <i>Análisis de AFLP</i>	81
V.3.2. <i>Variabilidad genética poblacional</i>	81
V.4.- <i>Tamaño de genoma</i>	97
VI.- DISCUSIÓN	100
VI.1.- <i>Nivel de ploidía y sistema reproductivo</i>	101
VI.2.- <i>Variabilidad genética</i>	108
VI.3.- <i>Tamaño del genoma</i>	115
VII.- CONCLUSIONES	117
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

ARNasa: ribonucleasa

BSA: albúmina sérica bovina 1- acetilada

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo, pH).

C: contenido de ADN nuclear de un complemento cromosómico haploide

°C: grados centígrados

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

cm³: centímetros cúbicos

CMM: Células madre de la megaspora

CTES: Corrientes

Cx: contenido de ADN de un genoma monoploide no replicado con un número x de cromosomas

dNTP's: desoxinucleótidos trifosfato

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

FCSS: Análisis de semillas por citometría de flujo

g: gramos

HCl: ácido clorhídrico

km: kilómetros

ISSR: réplicas simples de secuencias internas

m: metros

M: molar

mg: miligramo

mg/l: miligramos por litro

mg/ml: miligramos por mililitro

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MM: marcadores moleculares

mol.m^{-3} : mol por metro cúbico

msnm: metros sobre el nivel del mar

N: normal

n: número cromosómico gamético

2n: número cromosómico somático

NaOH: hidróxido de sodio

NaCl: cloruro de sodio

ng: nanogramos (1×10^{-9} g)

ng/ μ : nanogramos por microlitro

nm: nanómetro (1×10^{-6} m)

ON: over night

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa

pb: pares de bases

pM: picomolar

pM/ μ l: picomoles por microlitro

PM: peso molecular

p/v: peso en volumen

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SDS: sulfato de dodecil sódico

SSR: Repeticiones de secuencias pequeñas ("Short Sequence Repeat")

TAE: Tris-ácido acético-EDTA

Taq polimerasa: enzima polimerizante del ADN obtenida de *Thermus aquaticus*

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tris: N-Tris-(hidoximetil)-aminoetano

µg: microgramos (1×10^{-6} g)

µg/µL: microgramos por microlitro

µL: microlitro (1×10^{-6} l)

µM: micromolar

UV: ultravioleta

V: voltios

W: wats

x: número cromosómico básico de una especie

Resumen

Paspalum es uno de los géneros de gramíneas que cuenta con un gran número de especies distribuidas naturalmente en las regiones cálidas del continente americano. El género se caracteriza por presentar especies diploides de reproducción sexual y poliploides sexuales o apomícticas. La poliploidía abarca un gran rango de citotipos, desde 3x hasta 16x y se encuentra presente en aproximadamente el 80% de la especies, siendo la mitad de estos poliploides tetraploides en su mayoría de reproducción apomíctica. El conocimiento de la variación en los niveles de ploidía, el comportamiento reproductivo y la variabilidad genética de las poblaciones naturales, es esencial para comprender el funcionamiento de los complejos agámicos de especies del género *Paspalum*.

Los objetivos de este estudio fueron: analizar el nivel de ploidía, el modo de reproducción, la variabilidad genética y el tamaño del genoma en varias poblaciones silvestres de *Paspalum*. Se analizaron un total de 22 poblaciones que representan a seis especies diferentes: *P. buckleyanum*, *P. denticulatum*, *P. lividum*, *P. nicorae*, *P. rufum* y *P. unispicatum*. Mediante el uso de la citometría de flujo se determinó el nivel de ploidía en 1351 individuos. Entre estas plantas se observaron citotipos 2x, 3x, 4x, 5x, 6x y 7x. Para *P. denticulatum* se detectaron por primera vez citotipos diploide sexual y triploide apomíctico. El hallazgo del citotipo diploide de reproducción sexual constituye el primer paso en los programas de mejoramiento genético de especies apomícticas. A partir de la duplicación cromosómica de este material, será posible obtener líneas tetraploides sexuales que podrán ser utilizadas como progenitor femenino en cruzamientos con citotipos tetraploides apomícticos naturales. Esto permitirá liberar la variabilidad fijada por la apomixis, generar nuevas combinaciones genotípicas y fijar la heterosis a nivel tetraploide. La verificación del sistema reproductivo a partir del análisis de semillas maduras por citometría de flujo reveló la diversidad reproductiva de estas especies, que van desde la sexualidad

completa en los diploides y los diversos niveles de la apomixis facultativa en la mayoría de los tetraploides para obligar a la apomixis en los niveles pentaploide y hexaploide. Si bien no se detectaron plantas 4x de reproducción 100% sexual, la mayoría de los genotipos tetraploides mostraron capacidad para generar progenie por vía de la apomixis y por vía sexual. Esta sexualidad residual es interesante desde el punto de vista evolutivo, ya que permitiría la creación de nuevas combinaciones genotípicas en las poblaciones naturales. Por otro lado, la sexualidad residual encontrada en algunas de las poblaciones tetraploides apomícticas puede eventualmente ser utilizada como una alternativa para seleccionar nuevos genotipos en programas de mejoramiento genético.

Adicionalmente se estudió la variabilidad genética de 16 poblaciones naturales, utilizando marcadores moleculares de AFLP para determinar la diversidad genética y genotípica de cada población. Las poblaciones diploides de reproducción sexual y alógamas por autoincompatibilidad presentaron mayores niveles de variabilidad, resultados que están estrechamente vinculados al modo de reproducción de estos individuos. Sin embargo, los citotipos poliploides apomícticos revelaron un amplio rango de variabilidad genética entre las poblaciones. Dentro de este rango se observaron desde poblaciones constituidas por un único genotipo hasta poblaciones multiclonales, donde la mayoría de los individuos analizados representaron a genotipos diferentes. Estos resultados sugieren que la diversidad de los mecanismos generadores de variación genética juega un rol importante en la diversificación de un complejo agámico.

Por último, se determinó el tamaño del genoma de cada uno de los citotipos detectados para las especies estudiadas. Para ello se determinó el contenido absoluto de ADN por citometría de flujo. Los resultados indicaron que existen niveles significativos de variación dentro y entre las especies de *Paspalum*. En comparación con otras angiospermas, las 6 especies presentaron tamaños de genomas pequeños a muy pequeños. En las especies con más de un citotipo, se

observó un incremento del contenido de ADN proporcional al aumento en el nivel de ploidía. Esta información podría ser útil para la caracterización de las especies y sus diferentes citotipos, como así también para el estudio de adaptaciones ecológicas relacionadas a variaciones genómicas.

ABSTRACT

Species of the grass genus *Paspalum* are major constituents of native pasturelands in tropical and subtropical regions of the Americas. The genus includes sexual diploids but mainly sexual and apomictic polyploid species. Polyploidy is a common feature present in about 80% of the species, varying from 3x to 16x. Among all ploidy levels, tetraploidy is the most frequent condition. Knowledge the variation in ploidy levels, reproductive behavior and genetic variability of natural populations, is an essential feature to understand the functioning of the agamic complex in *Paspalum* species.

The objectives of this study were to analyze the ploidy level, mode of reproduction, genetic variability and genome size in wild populations of *Paspalum*. A total of 22 populations representing 6 different species: *P. buckleyanum*, *P. denticulatum*, *P. lividum*, *P. nicorae*, *P. rufum* and *P. unispicatum* were analyzed. Ploidy level was determined in 1351 individuals by using flow cytometry. Among these individuals, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, and 7x genetic constitutions were observed. Diploid sexual and triploid apomictic cytotypes of *P. denticulatum* were detected for the first time. The finding of diploid cytotypes of sexual reproduction is the first step in breeding programs of apomictic species. Sexual tetraploid lines may be obtained through chromosomal duplication of this material, which can be used as female parent in crosses with natural apomictic tetraploid cytotypes. This will release the variability fixed by apomixis, generate new genotype combinations and fix heterosis at tetraploid level. Flow cytometry seed screen (FCSS) in bulked and single seeds revealed the reproductive diversity of these species, ranging from complete sexuality in diploids to varying levels of facultative apomixis in most tetraploids to obligate apomixis in pentaploid and hexaploids. A fully sexual tetraploid plant was never detected. Nevertheless, most tetraploid genotypes produced both maternal (by apomixis) and non-maternal (by sexuality) progeny. This residual sexuality is

very interesting from an evolutionary point of view, since it would allow creating new genotypic combinations in natural populations. In addition, the residual sexuality found in some apomictic tetraploid populations can be used as a source of variability for genetic improvement.

In addition, genetic variability of 16 natural populations was investigated using AFLP markers. The populations of allogamous sexual diploids plants show higher levels of variability, which is closely related to the mode of reproduction of those individuals. However, apomictic polyploid cytotypes revealed a wide range of genetic variability, from populations consisting of a single genotype to multiclonal populations, where most of the individuals analyzed represented different genotypes. These results suggest that diversity in mechanism leading to genetic variation play an important role in the diversification of an agamic complex.

Finally, the genome size of each cytotype detected in the studied species was determined using flow cytometry. The results showed significant levels of variation within and between species of *Paspalum*. In comparison with other angiosperms, the 6 species had small to very small genomes sizes. In species with more than one cytotype, we observed an increase in DNA content proportional to the increase in ploidy level. This information could be useful for the characterization of species and their different cytotypes, as well as for the study of ecological adaptations related to genomic variation.

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- La poliploidía y su rol en la evolución de las plantas

Una de las características más notables de los seres vivos es su capacidad para perpetuarse. Sin embargo, la naturaleza siempre dinámica del entorno ha impuesto a las plantas, al igual que a otros organismos, diversos obstáculos evolutivos y selectivos, que requieren que los mismos adopten modos que le permitan subsistir. En este aspecto, la poliploidía ha sido un elemento fundamental de la especiación y la evolución en las plantas y en menor medida en los animales (Levin 1983). En contraste con el proceso evolutivo gradual, mediante el cual las nuevas especies evolucionan a partir de poblaciones aisladas, nuevas especies de plantas también pueden surgir repentinamente en simpatria y el mecanismo más común para la especiación abrupta es a través de la formación de poliploides naturales.

El término "ploidía" o "nivel de ploidía" hace referencia al número de juegos de cromosomas contenidos en el núcleo de una célula. Por lo tanto, un individuo con dos juegos de cromosomas se considera diploide ($2x$); mientras que un poliploide es aquel organismo que contiene más de dos juegos de cromosomas, que pueden tener un mismo origen (llamados autoploides) o diferentes orígenes (aloploides). La poliploidía es considerada un proceso y no un evento, que ocurre con mayor frecuencia en las plantas y en menor medida en animales y hongos (Stebbins 1950, Grant 1971). En particular en las angiospermas, las estimaciones indican que entre un 47% y un 70% de las especies son poliploides (Grant 1981, Masterson 1994). También se encuentra en la mayoría de los helechos (alcanzando el 95%), algunas briófitas, algas y algunas gimnospermas (Stebbins 1950, Grant 1971). Aunque este fenómeno está muy extendido en todo el reino vegetal, existe una amplia variación en la abundancia de los poliploides entre las familias de plantas. En las gimnospermas,

por ejemplo, no se han encontrado poliploides en el género *Ginkgo* o en las Cicadáceas (Grant 1971).

La poliploidía, además de incrementar el contenido de ADN, frecuentemente implica cambios morfológicos. En las plantas poliploides es común observar un incremento en el tamaño y forma de células y de ciertos tejidos u órganos respecto a la contraparte diploide, tales como estomas, hojas, flores, tallos, etc. Este fenómeno conocido como efecto de gigantismo es consecuencia de la poliploidización (Stebbins 1971). De hecho, características fenotípicas como el tamaño de los granos de polen o de los estomas fueron clásicamente utilizadas para diferenciar los citotipos diploides de los poliploides de una especie o de especies relacionadas (Stebbins 1950).

1.1.2.- Mecanismos de formación de los poliploides

Los poliploides pueden originarse por diversos mecanismos, los cuales incluyen principalmente la duplicación somática de cromosomas durante la mitosis y la no reducción en la meiosis, la cual conduce a la producción de gametos no reducidos (Heilborn 1934, Grant 1971). Existen además otros procesos tales como la fecundación poliespermática, cuando la ovocélula es fecundada por más de un gameto masculino y la endoreduplicación, cuando ocurre la replicación del ADN pero no se produce la citocinesis. Todos estos son mecanismos que pueden dar lugar a la formación de poliploides. La endoreduplicación se asimila a la duplicación somática y por lo tanto no es considerada como un mecanismo separado por algunos autores (Grant 1981). En cuanto a la polispermia, si bien ha sido observada en muchas plantas, su contribución como un mecanismo para la formación de poliploides es bastante rara, excepto en algunas orquídeas (Ramsey & Schemske 1998).

La "duplicación cromosómica" puede ocurrir en el cigoto para producir un individuo completamente poliploide, o localmente en algunos meristemas

apicales para dar quimeras poliploides. La duplicación cromosómica espontánea en células somáticas es un evento raro (Lewis 1980), siendo el único caso bien documentado la obtención del tetraploide *Primula kewensis*, originado por la duplicación somática producida en determinadas ramas de floración de un híbrido diploide. El fenómeno de la duplicación cromosómica en los cigotos se describe mejor a partir de experimentos de choque térmico. En estos experimentos embriones jóvenes son brevemente expuestos a altas temperaturas (Lewis 1980). Este proceso fue propuesto por primera vez por Winge y la aparición espontánea de razas tetraploides en *Oenothera lamarckiana* demostraron ser una consecuencia de dicho mecanismo (Lewis 1980, Grant 1981).

Una segunda vía importante en la formación de poliploides implica la "no reducción" o la "restitución meiótica nuclear" de los cromosomas durante la microsporogénesis y megasporogénesis, dando como resultado gametos no reducidos ($2n$). Estos gametos contienen el número cromosómico somático completo (Harlan & De Wet 1975, Bretagnolle & Thompson 1995). La unión de un gameto no reducido ($2n$) con un gameto reducido (n) ó la unión de dos gametos no reducidos, generarán por lo tanto embriones poliploides. La producción de gametos no reducidos ha demostrado ser bastante común en especies del género *Solanum* (Lewis 1980). Un ejemplo clásico de poliploide generado por la fusión de gametos no reducidos es *Raphanobrassica* (Elliot 1958, Grant 1981). La otra ruta posible para la formación de poliploides es aquella que involucra la fusión de un gameto no reducido ($2n$) con un gameto reducido (n) para originar un cigoto triploide ($3n$). Estos poliploides $2n+n$ son conocidos como híbridos B_{III} . En una próxima generación, estos individuos B_{III} pueden producir gametos no reducidos ($3n$) que eventualmente pueden ser fecundados por gametos reducidos (n) para producir nuevos individuos tetraploides. Este proceso de poliploidización de dos pasos, conocido como "puente triploide", es una de las rutas más comunes de formación de

poliploides a partir de gametos no reducidos en las poblaciones naturales (Grant 1981). Siguiendo este proceso, razas tetraploides fueron obtenidas en numerosas especies (Hollingshead 1930, Dermen 1931, Thompson 1931, Jhonsson 1940, Jones & Bamford 1942, Skalinska 1946, Zohary & Nur 1959, Dujardin & Hanna 1988, Quarin *et al.* 1989).

Del mismo modo, pero en poblaciones poliploides ya establecidas, puede ocurrir la unión de gametos reducidos y no reducidos generando nuevas razas con mayores niveles de ploidía (Ramsey & Schemske 1998). En una población autotetraploide de *Beta bulgaris* por ejemplo, se obtuvo un 2% de individuos hexaploides, aparentemente a partir de la unión de gametos reducidos (n) y no reducidos ($2n$) (Hornsey 1973). Los poliploides impares podrían generarse también por este mecanismo. De hecho, se ha sugerido que las razas hexaploides de *Andropogon gerardii* podrían producir gametos no reducidos, a partir de los cuales se generaron nuevos individuos B_{III} ($9x$), los que actualmente se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Norrman *et al.* 1997).

1.1.3.- Clasificación de los poliploides

Los poliploides se clasifican en autoploides o autopoliploides y aloploides o alopoliploides (Kihara & Ono 1926). Un autopoliploide es un organismo que contiene más de dos conjuntos completos de cromosomas homólogos (es decir, tiene tres o más series de cromosomas del mismo origen). Los autopoliploides se originan principalmente por la fecundación de gametos no reducidos. Los alopoliploides en cambio, son aquellos organismos que contienen más de dos conjuntos o series de cromosomas no homólogos, es decir, series de cromosomas con diferentes orígenes. Los alopoliploides se originan mediante hibridación entre diferentes especies (Grant 1971). Los autopoliploides usualmente presentan asociaciones cromosómicas multivalentes en la meiosis y patrones de herencia polisómica, mientras que los alopoliploides muestran

principalmente asociaciones bivalentes y herencia disómica (Stebbins 1971). Los alopoliploides segmentarios son aquellos que tienen juegos de cromosomas levemente diferentes, es decir, formas intermedias entre auto y alo-poliploides (Stebbins 1950). Ejemplos de alopoliploides segmentarios fueron descritos por Stebbins (1950) y Grant (1971).

Se considera que la aloploidía es más común que la autopoloidía, pero incluso una mirada superficial a cualquier flora silvestre (por ejemplo, Hickman 1993) o a una lista de recuentos de números cromosómicos en plantas (por ejemplo, Federov 1969), revela múltiples citotipos dentro de muchas especies. Por lo tanto, es probable que los autopoloides sean mucho más comunes en la naturaleza (Soltis & Soltis 2000). Algunos ejemplos de alopoliploides incluyen *Tragopogon* (Ownbey 1950), *Asplenium* (Werth *et al.* 1985) y *Paspalum dilatatum* (Burson 1989). Numerosos ejemplos de autopoliploides también fueron reportados, tales como *Andropogon gerardii* (Keeler *et al.* 1987, Keeler & Davis 1999), *Dactylis glomerata* (Zohary & Nur 1959, Bretagnolle & Thompson 1996) y la mayoría de las especies tetraploides del género *Paspalum* (Forbes & Burton 1961, Norrmann *et al.* 1989, Quarin *et al.* 1998, Quarin 1992, Pupilli *et al.* 1997, Stein *et al.* 2004). Por otra parte, muchas especies de cultivos de importancia económica (por ejemplo, del género *Brassica*, *Coffea*, *Oryza*, *Saccharum*, *Solanum*, *Triticum*, *Zea*, *etc.*) son poliploides, por lo que comprender la evolución de los poliploides podría ser útil en el contexto agrícola (Mok & Peloquin 1975, Qu & Vorsa 1999).

1.1.4.- Establecimiento de los poliploides

Una característica importante de la poliploidización es que genomas completos se duplican permitiendo una mayor diversidad genética en niveles superiores de ploidía con respecto a sus antecesores diploides. Anteriormente se consideraba que la duplicación cromosómica, en especial en los

autopoliploides, producía predominantemente efectos perjudiciales sobre la supervivencia de los organismos y por lo tanto, debía ser compensada por otros procesos (Stebbins 1971). Sin embargo, en una extensa revisión, Levin (1983) argumentó que, si bien este proceso tiene consecuencias citológicas, bioquímicas, fisiológicas, de desarrollo, entre otras, pueden producirse cambios adaptativos que ocasionan diferencias ecológicas entre citotipos. Por lo tanto, la duplicación cromosómica en sí misma no es necesariamente perjudicial. Según estudios realizados por Roose & Gottlieb (1976), los poliploides tienen la capacidad de generar una mayor amortiguación fisiológica que sus progenitores diploides debido a la multiplicidad de enzimas. El aumento de la actividad enzimática, la producción de nuevas enzimas y metabolitos, y una mayor regulación metabólica pueden permitir que los poliploides colonicen nuevos hábitats que no están ocupados por sus antecesores diploides.

En una revisión, Thompson & Lumaret (1992) identificaron tres aspectos principales en la evolución de los poliploides. Estos son: 1) el origen de poliploides, 2) el establecimiento y la coexistencia de poliploides en poblaciones diploides, y 3) la propagación de poliploides en los hábitats no ocupados por sus precursores diploides.

Un paso problemático y crítico en la evolución de un poliploide es inicialmente el establecimiento y posteriormente la persistencia (Fowler & Levin 1984). Un citotipo predominante en una población tiene la capacidad de alcanzar altas frecuencias de apareamientos y de esta manera excluir a otros citotipos poliploides de la misma población debido al apareamiento ineficaz de los citotipos raros. Esto se conoce como el principio de *exclusión del citotipo minoritario* (Husband 2000). Un nuevo poliploide (y por lo tanto raro) en una población diploide, tendría una desventaja de fertilidad, ya que la mayoría de las polinizaciones de los poliploides serán realizadas preferentemente con polen de los citotipos diploides generando descendientes estériles o inviables (Fowler & Levin 1984).

Varios modelos fueron desarrollados para determinar cómo los poliploides pueden establecerse en las poblaciones diploides (Fowler & Levin 1984, Felber 1991, Rodríguez 1996a). Fowler & Levin (1984) compararon dos modelos basados en la competencia entre citotipos. Ambos modelos plantean tres resultados posibles: 1) el equilibrio estable o la coexistencia de los dos citotipos, 2) la sustitución de un citotipo por el otro, independientemente del tamaño inicial de la población y las frecuencias de los citotipos, y 3) la sustitución de un citotipo por el otro, en donde el resultado (cualquiera sea el citotipo no incluido) depende del tamaño inicial de la población y las frecuencias de los citotipos. Fowler & Levin (1984) sugieren que la separación de nichos, causada por un cambio en el nivel de ploidía, permite la coexistencia de diploides y tetraploides. Los poliploides, en general, pueden presentar una mayor tolerancia al estrés y por lo tanto pueden ocupar hábitats separados de sus ancestros diploides (Levin 1983). El tamaño de una población juega un papel importante en la evolución a nivel poliploide, ya que en poblaciones pequeñas los sucesos aleatorios podrían permitir que el citotipo minoritario obtenga una ventaja en la frecuencia como para reemplazar al citotipo parental diploide (Fowler & Levin 1984). Los eventos estocásticos, sin embargo, podrían trabajar en contra de los citotipos raros contribuyendo a la extinción de los mismos.

A diferencia de Fowler & Levin (1984), Felber (1991) desarrolló un modelo que incluye la producción de gametos no reducidos ($2n$) por parte del citotipo diploide, siendo los responsables de originar algunos tetraploides en diferentes generaciones. Felber (1991) encontró que los tetraploides se pueden mantener en baja frecuencia en una población diploide si la producción de gametos $2n$ de los diploides está por debajo de cierto valor umbral (menor al 17,16%). Una vez que la producción de gametos $2n$ supera este umbral, los tetraploides serían capaces de sustituir a los diploides. Sin embargo, mediante la modificación de la fertilidad y viabilidad de los citotipos, este umbral requerido para la propagación de los poliploides raros puede variar. Si la viabilidad o la fertilidad

de los poliploides son el doble con respecto a la de los diploides, el valor umbral requerido se reduce al 10% en el modelo de Felber. Si la viabilidad y la fertilidad de los poliploides duplican a los valores de los diploides, el umbral puede disminuir aún más alcanzando el 6% (Felber 1991). El efecto contrario se observa cuando Felber (1991) señala que una serie de factores, tales como los cambios genéticos, ambientales y los sucesos estocásticos en poblaciones pequeñas, pueden influir en la frecuencia de producción de gametos no reducidos.

Rodríguez (1996a) argumentó que los modelos anteriores son demasiado restrictivos y probablemente no ocurran en la realidad. En particular, este autor demostró que las condiciones para la colonización con éxito de un citotipo raro en una población diploide son menos restringidas que las descritas por Fowler & Levin (1984). Rodríguez (1996a) mejoró en un modelo anterior a la prueba de los efectos de viabilidad de los híbridos, la iteroparidad (donde un organismo es capaz de reproducirse más de una vez en un ciclo de vida) y la estocasticidad demográfica (cuando las poblaciones alcanzan tamaños muy pequeños). En el modelo anterior (Rodríguez 1996a), los híbridos se suponen estériles e inviables, sin embargo, el modelo más reciente (Rodríguez 1996b), supone que los híbridos son infértiles pero viables, y se constata que la presencia de estos híbridos no cambia las condiciones necesarias para el establecimiento de los poliploides. La iteroparidad puede aumentar la frecuencia de la creación de poliploides más que la semelparidad (cuando un organismo se reproduce sólo una vez) (Rodríguez 1996b). Esto apoya la conclusión de que la poliploidía es más común en las plantas perennes que en las anuales (Stebbins 1950). Por último, si la estocasticidad demográfica obstaculiza o no la creación de poliploides, realmente depende de las condiciones del modelo (Rodríguez 1996b). El modelo también plantea que la reducción de los apareamientos entre citotipos como consecuencia de un cruzamiento selectivo (ya sea por diferencias en el momento de floración o por las visitas no aleatorias de los

polinizadores) puede favorecer que los citotipos raros contribuyan en la producción de semillas de la próxima generación y se establezcan en la población a pesar de la desventaja del citotipo minoritario. La autopolinización, la apomixis y la propagación vegetativa también pueden promover el establecimiento y la frecuencia de los poliploides. Sin embargo, estos elementos no son considerados en los modelos de Fowler & Levin (1984), Felber (1991) y Rodríguez (1996a, 1996b), por lo cual es difícil establecer si los mismos serían aplicables en aquellas especies donde la poliploidía y la apomixis se encuentran estrechamente relacionadas. Por el contrario, la depresión endogámica podría ser una dificultad potencial para los poliploides con altas tasas de autopolinización. Sin embargo, ha sido demostrado en algunas especies que dicha depresión puede ser menos severa en los tetraploides en comparación con los diploides (Husband & Schemske 1997).

Por lo tanto, la separación de nichos, los cruzamientos, la variación estocástica y las diferencias entre las aptitudes de cada citotipo, juegan un papel fundamental en la evolución y el establecimiento de los poliploides. Muchos de estos factores no tienen que ser mutuamente excluyentes y varios de ellos probablemente, actúan de forma alterna en un momento dado.

1.2.- La poliploidía y su relación con la apomixis

Stebbins (1971) señaló que las chances de persistencia de un poliploide con una fertilidad reducida en la naturaleza, aumentan cuando los mismos poseen ciclos de vida más largos y sistemas de reproducción vegetativa. En este aspecto, la apomixis (reproducción asexual a través de semillas) juega un rol importante, ya que permite restablecer la fertilidad y por lo tanto, la producción de simientes.

La apomixis está estrechamente relacionada con la poliploidía ya que, en general, la mayoría de las plantas con apomixis gametofítica que se conocen

son poliploides (Asker & Jerling 1992, Savidan 2000). Stebbins (1941) sugirió que la gran mayoría de las especies apomícticas son probablemente alopoliploides y Nogler (1984a), en una revisión del tema, vinculó a la apomixis gametofítica con la alopoliploidía, la hibridación y la heterocigosidad. Por otra parte, Darlington (1939) consideró que la apomixis era el camino por el cual las plantas de origen híbrido podían escapar a la esterilidad a la que estarían condenadas debido a las irregularidades que tienen en la meiosis.

Más recientemente, otros autores estudiaron la asociación entre la poliploidía y la apomixis y proponen que la autoploidía jugaría un rol muy importante en la evolución de muchos complejos agámicos (De Wet & Harlan 1970, Quarin & Norrmann 1987, Norrmann *et al.* 1989, Quarin 1992, Leblanc *et al.* 1995, Grimanelli *et al.* 1998, Siena *et al.* 2008).

1.2.1.- El concepto de Apomixis

Nogler (1984a) definió a la "apomixis" como una forma de reproducción asexual a través de semillas. La contraparte normal de este mecanismo de reproducción es la anfimixis, es decir, la reproducción sexual. El término apomixis es sinónimo de agamosperma (Nogler 1984a) y permite diferenciar a este tipo de reproducción de todas las demás formas de multiplicación asexual, para todo lo cual se usó originalmente el término apomixis (Winkler 1908).

La apomixis fue descrita por primera vez en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* por Smith (1841). Las observaciones realizadas en *Alchornea* inspiraron a los botánicos a trabajar en el tema, y en 1857, Braun no solo confirmó las observaciones de Smith (1841) sobre *Alchornea*, sino que también incorporó a *Chara crinita* como un ejemplo de las especies de plantas que no requieren fecundación para producir semillas. Rosenberg (1908) fue quien, a través de estudios citológicos en *Hieracium*, observó que la aposporia ocurre en angiospermas.

La reproducción por apomixis se observó en al menos 400 especies de plantas que abarcan 35 familias diferentes, siendo muy común en *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* y *Rutaceae* (Hanna & Bashaw 1987). Se considera que la apomixis ha evolucionado como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de desarrollo del ovario (Koltunow 1993, Grossniklaus 2001). Por lo tanto, este modo reproductivo es específico del gametofito femenino, aunque existen raras excepciones (Pichot *et al.* 2001). La apomixis elude la ruta sexual evitando la reducción meiótica y la fecundación de la ovocélula. Por partenogénesis la ovocélula desarrolla un embrión que tiene el mismo genotipo que la planta que lo originó, es decir que la apomixis es una forma natural de clonación.

La apomixis presenta diferentes formas y parece haber surgido varias veces en forma independiente durante la evolución (Grimanelli *et al.* 2001).

1.2.2.- Tipos de apomixis

Se propusieron diferentes clasificaciones para los distintos mecanismos de desarrollo del proceso de reproducción apomíctica (Battaglia 1963, Nogler 1984a, Naumova 1990, Asker & Jerling 1992, Crane 2001). Sin embargo, aquí se utilizará la clasificación que propuso Nogler (1984a). Nogler clasificó a la apomixis en función del origen y desarrollo del embrión en dos grupos: embrionía adventicia y apomixis gametofítica.

En la *embrionía adventicia*, los embriones somáticos se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo, sin que se desarrolle un saco embrionario. En la actualidad aún se desconocen los mecanismos moleculares y fisiológicos por los cuales estas células se convierten en iniciales para el desarrollo posterior de embriones (Koltunow 1993). Las células nucelares iniciales son similares a la ovocélula en cuanto al potencial de desarrollo, pero no están contenidas de una estructura de megagametófito, sino

que están adyacentes a un saco embrionario meiótico (de tipo sexual) y rodeadas por otras células del óvulo. La embrionía adventicia es típica en los cítricos, los cuales representan un sistema modelo para estudiar el proceso (Koltunow 1993).

En la *apomixis gametofítica*, se produce el desarrollo de un megagametófito o saco embrionario no reducido. Este gametófito femenino puede desarrollarse a partir de la célula arquesporrial, la cual por una falla o por una meiosis incompleta no sufre reducción (diplosporia), o bien el desarrollo del gametófito puede producirse directamente a partir de células somáticas del óvulo (aposporia). A continuación se detallan ambos tipos de apomixis gametofítica:

a) Diplosporia: los sacos embrionarios pueden generarse a partir de la célula madre de la megáspora (CMM) o célula arquesporrial directamente por mitosis (tipo *Antennaria*), o luego de una falla o interrupción en la meiosis (tipo *Taraxacum*). Salvo excepciones, los sacos embrionarios diplospóricos mantienen la estructura característica de los sacos meióticos con siete células y ocho núcleos (Savidan 2000). En las plantas diplospóricas el proceso sexual se ve completamente comprometido ya que es la misma CMM la que sufre alteraciones en su desarrollo.

b) Aposporia: los sacos embrionarios no reducidos son generados por mitosis a partir de células somáticas del óvulo, generalmente provenientes de la nucela. Los sacos embrionarios apospóricos tienen una estructura y constitución distinta y muy variable dentro de un mismo taxón o entre taxones diferentes. En función de la morfología se clasifican en: tipo *Hieracium* (Rosenberg 1908, 1930), tipo *Panicum* (Warmke 1954), tipo *Paspalum* (Quarin & Burson 1991), entre otros. El saco embrionario apospórico en *Paspalum* puede presentar múltiples variantes estructurales pero el tipo más común se caracteriza por un aparato oosférico (oósfera + 2 sinérgidas) y una célula central bi-nucleada. La principal característica es la ausencia de antípodas. A diferencia de la diplosporia, en los

óvulos de las plantas que presentan aposporia pueden coexistir en el mismo óvulo sacos embrionarios meióticos y sacos embrionarios apospóricos.

En los sacos embrionarios apospóricos y diplospóricos, el embrión se desarrolla directamente por partenogénesis a partir de la ovocélula no reducida ($2n$) omitiendo la fecundación. Es decir, la ausencia de reducción está acompañada por el proceso de partenogénesis. Sin embargo, el típico proceso de doble fecundación de las angiospermas no necesariamente se anula por completo. En muchos casos es indispensable que se produzca la fecundación solamente de los núcleos polares para asegurar el desarrollo del endospermo (seudogamia). Aunque en algunos casos el endospermo puede desarrollarse en forma autónoma (*Erigeron* o *Taraxacum*), en muchas especies (la mayoría de las gramíneas tropicales como *Panicum*, *Pennisetum*, *Tripsacum* o *Paspalum*) son seudógamas.

1.3.- Los complejos agámicos

Muchas especies con razas diploides y poliploides constituyen complejos poliploides, los cuales pueden ser definidos como un sistema de hibridación y poliploidía cuyos productos forman una unidad evolutiva. En general, el énfasis de estudio se concentra en los procesos que ocurren en su origen y evolución más que en la clasificación y categorización de individuos o grupos poliploides (Stebbins 1970). Si además existe agamospermia, los procesos combinados de hibridación natural y este tipo de reproducción llevan a la formación de una serie de microespecies que portan diferentes combinaciones de caracteres aportados por las especies parentales, cuya estructura resultante es un complejo agámico poliploide (Grant 1981).

Un complejo agámico puede definirse como una unidad en la cual los ecotipos sexuales y sus contrapartes apomícticas se encuentran en diferentes niveles de ploidía, siendo mayoritariamente diploides sexuales y tetraploides

apomícticos (Savidan 2000). El primer complejo poliploide agámico estudiado fue identificado en el género *Crespis* (Babcock & Stebbins 1938). Un complejo agámico de especies hasta de géneros puede originarse a través de la expansión gradual de una especie apomíctica como también a través de hibridación, es decir, con la incorporación de genes de una especie dentro de la estructura genética de otra génica de otra y es en este contexto que Turesson (1929) acuñó el término agamospecie para poblaciones apomícticas de origen común (Nogler 1984a).

I.3.1.- Organización de los complejos agámicos

Entre las especies diploides sexuales y las agamospecies más exitosas de un complejo agámico existe una multitud de variantes, que incluyen biotipos menores hasta microespecies localizadas (Grant 1981). Para muchas de estas especies se describieron diferentes modelos de organización de los complejos agámicos y de los ciclos de ploidía.

I.3.1.1.- El modelo del complejo *Taraxacum-Parthenium* (Asteraceae)

Taraxacum es uno de los géneros de plantas más abundantes en las zonas templadas del hemisferio norte, encontrándose además presente en los cinco continentes (Richards 1970). Con un número básico de $x = 8$, el género revela una gran variación en el número de cromosomas, encontrando desde $2n = 2x = 16$ hasta $2n = 12x = 96$ (Kirschner & Štěpánek 1996). Las formas diploides son sexuales y dependiendo de la especie, presentan sistemas de autoincompatibilidad o son auto-compatibles. Las formas poliploides son apomícticas y con desarrollo autónomo de endospermo, tanto facultativas como obligadas.

En *Parthenium*, las razas diploides ($2n = 2x = 36$) son sexuales y las razas poliploides con $2n = 54, 72, 90$ o 108 son apomícticas yseudógamas. La existencia de una gran variedad de razas (desde haploides hasta hexaploides) fue bien documentada por Powers (1945). Estudios realizados por Powers & Rollins (1945) demostraron que dentro del género, la apomixis facultativa es el modo de reproducción predominante. Los diferentes citotipos poliploides son generados a partir de la fecundación de gametos femeninos no reducidos por gametos masculinos reducidos produciendo híbridos $B_{III}(2n + n)$. En este caso, existe un ciclo entre tetraploides, hexaploides y triploides, con la posibilidad de incorporar formas diploides en el ciclo a partir de la producción de híbridos B_{III} con 54 cromosomas.

3.1.2.- El modelo del complejo Capillipedium-Dichanthium-Bothriochloa (Poaceae)

Los géneros *Capillipedium*, *Dichanthium* y *Bothriochloa* se encuentran ampliamente distribuidos en Europa, Asia, Australia y América. De Wet (1968) describió que en el género *Dichanthium* la evolución se produjo en base a ciclos de ploidía, involucrando razas diploides, tetraploides y hexaploides. En un enfoque más amplio, De Wet & Harlan (1970) describieron la relación entre las especies de estos tres géneros, los cuales constituyen un verdadero complejo agámico. Los niveles de ploidía más comúnmente encontrados son $2x, 4x, 6x$ y algunas formas $5x$. Los diploides son sexuales y los poliploides apomícticos. Sin embargo, en América algunas razas poliploides son sexuales. Para este complejo no fueron mencionadas formas triploides. De Wet (1968) propuso para este complejo, un modelo evolutivo que involucra a sucesivos ciclos de ploidía a través de ciclos diploide - tetraploide - dihaploide. Dicho modelo se sustenta en que pueden generarse nuevos genotipos tetraploides por eventos de hibridación entre gametos femeninos no reducidos ($2n$) de los diploides

fecundados con gametos reducidos (n) de tetraploides. El ciclo se cierra cuando eventualmente una planta $4x$ apomítica produce un descendiente diploide a través de una dihaploidización por partenogénesis haploide. El intercambio genético entre *Capillipedium* y *Dichanthium* ocurre únicamente cuando existen especies de *Bothriochloa* actuando como puente genético (De Wet & Harlan 1970).

1.3.1.3.- El modelo del complejo *Panicum maximum* (Poaceae)

Este complejo agámico comprende tres especies: *Panicum maximum*, *P. trichocladum* y *P. infestum* (Combes 1975). *Panicum maximum* es originaria del este de África y ha colonizado la región oeste del continente africano y las áreas tropicales de América. Para esta especie fueron identificadas razas diploides y de reproducción sexual (Combes & Pernès 1970). Estas razas son raras y sólo fueron detectadas en tres áreas bien delimitadas en Tanzania (Combes & Pernès 1970, Nakajima *et al.* 1979). Las otras razas más conocidas y observadas con mayor frecuencia son tetraploides y apomíticas, encontrándose ocasionalmente algunas pentaploides y hexaploides. De manera experimental, se han obtenido individuos triploides a partir de plantas hexaploides que tienen la capacidad de producir dihaploides ($n + 0$) y a partir de cruzamientos entre plantas diploides sexuales (parental femenino) y tetraploides apomíticos (parental masculino). También se obtuvieron dihaploides sexuales o estériles (potencialmente apomíticos) a partir de las razas tetraploides. En base a estos hallazgos, Savidan & Pernès (1982) propusieron un esquema evolutivo para el complejo *Panicum maximum* similar al propuesto para *Dichanthium* (De Wet & Harlan 1970). El modelo se basa en ciclos de ploidía los cuales involucran razas diploides-tetraploides-dihaploides. El cambio desde el nivel diploide al tetraploide ocurre a través de la hibridación $2n + n$ con polen proveniente de los tetraploides. En este sistema, la sexualidad es mantenida en el nivel diploide

y el flujo génico entre diploides y tetraploides permite el intercambio genético entre citotipos, generando nuevas combinaciones genotípicas y garantizando la diversidad genética en el nivel tetraploide.

1.3.1.4.- El modelo del complejo *Tripsacum* (*Poaceae*)

El género *Tripsacum* se encuentra restringido a América, y su centro de diversidad se localiza en México y Guatemala, con 11 de las 16 especies descritas ubicadas en esa región. Estas 11 especies presentan diferentes niveles de ploidía, desde diploides ($2n = 2x = 36$) hasta hexaploides ($2n = 6x = 108$), predominando las razas tetraploides ($2n = 4x = 72$). Todos los poliploides observados en este género son apomícticos (Leblanc *et al.* 1995), mientras que las razas diploides son sexuales. En comparación con otros complejos, la frecuencia de triploides es elevada. Estos triploides apomícticos naturales, producen polen fértil y presentan una buena producción de semillas. Las plantas apomícticas pueden generar además progenie con un mayor nivel de ploidía mediante la fecundación de gametos no reducidos ($2n + n$). A través de este mecanismo fueron conseguidas un gran número de plantas hexaploides de manera experimental y también a partir de semillas cosechadas en poblaciones naturales.

En algunas poblaciones se observó la presencia de triploides, tetraploides y hexaploides en ausencia de diploides, lo que sugiere que algunos triploides pudieron haberse originado a partir de plantas hexaploides por un proceso de haploidización. Sin embargo, en aquellas poblaciones donde además existen diploides, los nuevos tetraploides podrían también generarse por cruzamientos entre plantas triploides apomícticas que actúan con gametos no reducidos ($2n$) y plantas diploides que aportan gametos reducidos (n). Si bien no fueron detectadas plantas tetraploides sexuales en *Tripsacum*, los tetraploides analizados presentan sexualidad residual, siendo ésta una fuente que favorece la

creación de diversidad genética a nivel tetraploide mediante la generación de nuevos genotipos a partir de los sacos embrionarios de origen meiótico de las plantas apomícticas facultativas. El modelo planteado para este complejo involucra ciclos triploides-tetraploides-hexaploides-dihaploides, en el que la unión con los diploides es posible (Berthaud 2001).

1.3.1.5.- El modelo del complejo Ranunculus auricomus (Ranunculaceae)

Este complejo se halla ampliamente distribuido a lo largo de toda Europa y abarca desde las regiones árticas hasta las zonas mediterráneas. La amplia diversidad morfológica de este grupo se ve reflejada en el número de microespecies. Fueron descritas unas 800 microespecies que se incluyen en cuatro grupos morfológicos (Hörandl & Gutermann 1998). La mayoría de las especies son tetraploides apomícticas y pseudógamas y si bien la aposporia en general está conectada con el desarrollo partenogenético de la ovocélula, estos procesos pueden estar desacoplados, generando progenie de origen no materno (Nogler 1984b, 1995). Sólo se conocen cuatro especies de reproducción sexual: *R. carpaticola* (con poblaciones diploides sexuales y hexaploides apomícticas), *R. cassubicifolius* (con citotipos diploides y tetraploides sexuales), *R. marsicus* (con citotipos tetraploides tanto sexuales como apomícticos) y *R. notabilis* (con formas diploides sexuales). En este complejo, la condición sexual no se encuentra confinada solo al nivel diploide. Sin embargo, la distribución geográfica de las formas sexuales se encuentra acotada al sur de la distribución general del complejo (Bierzzychudek 1985, Van Dijk 2003, Hörandl 2006). Numerosos estudios sugieren que dentro del complejo, la apomixis está estrechamente relacionada con la hibridación y que éste sería el origen de las agamospecies de este género (Hörandl & Greilhuber 2002, Paun *et al.* 2006a, Paun *et al.* 2006b, Rousi 1956).

1.3.1.6.- El modelo del complejo *Paspalum* (Poaceae)

El centro de diversidad del género *Paspalum* está ubicado en Sudamérica e incluye a especies diploides ($2n = 2X = 20$) sexuales y poliploides sexuales y apomícticas. Se identificaron varias especies que conforman complejos poliploides agámicos, en los que algunos de ellos trascienden los límites de la especie y están constituidos por varias especies estrechamente relacionadas.

En *Paspalum*, la mayoría de las especies perennes son poliploides apomícticas, pseudógamas y autofértiles, las que son principalmente tetraploides que tienen una contraparte co-específica que es diploide, sexual y autoincompatible (Quarin 1992). Tanto la autofertilidad como la autoesterilidad fueron reportadas en las especies diploides del género. En cambio, la mayoría de los poliploides sexuales son autofértiles (Quarin 1992).

Para *Paspalum*, se describió un modelo de poliploidización y flujo génico que se aplica a varias especies del género. Los componentes del sistema son diploides sexuales, junto con triploides y tetraploides apomícticos (Hanna & Burton 1986, Norrmann *et al.* 1989, Quarin 1992, Norrmann *et al.* 1994). Los diploides son sexuales y algunos de ellos también poseen potencial para apomixis, porque además de formar sacos embrionarios meióticos, ocasionalmente pueden producir sacos apospóricos junto al meiótico (Quarin 1986, Quarin & Norrmann 1987, Norrmann *et al.* 1989). Estudios realizados recientemente por Siena *et al.* (2008) demostraron que esos sacos embrionarios no reducidos son funcionales y cuando los mismos son fecundados por un gameto masculino reducido originan plantas triploides ($2n + n = 3n$). Por lo tanto, los autotetraploides podrían entonces originarse a partir de individuos diploides por un proceso consistente en dos etapas consecutivas: Inicialmente, en una población de plantas diploides, un individuo puede eventualmente producir un gameto femenino no reducido ($2n = 2x$) que luego podría ser fecundado por un gameto masculino reducido ($n = x$) de otro individuo de la

misma población produciendo un híbrido B_{III} ($2n + n$), es decir un nuevo triploide ($2n = 3x = 30$). Una vez que este nuevo citotipo triploide logra establecerse en la población diploide, podría dar origen a un nuevo autotetraploide ($3x + x = 4x$) por el mismo mecanismo, es decir a través de la fecundación de un gameto no reducido del triploide por un gameto reducido de alguno de los individuos diploides de la población (Quarin 1992).

Los triploides de los complejos agámicos de las especies de este género son parcialmente fértiles e indican que el aislamiento reproductivo entre diploides y tetraploides no es absoluto, razón por la cual tales triploides son considerados como puentes para el flujo génico entre ambos niveles de ploidía (Quarin 1992, Norrmann *et al.* 1994). De hecho, la ocurrencia de un puente triploide ha sido propuesta como uno de los principales mecanismos involucrados en la formación de poliploides en las poblaciones naturales (Ramsey & Shemske 1998). Este aumento en el nivel de ploidía desde $3x$ a $4x$ fue observada en numerosas especies del género *Paspalum* (Burton & Hanna 1986, Quarin *et al.* 1989). Por otra parte, en el género existen también triploides apomícticos exitosos, como ocurre en *P. quadrifarium* por ejemplo, que tiene razas diploides y razas tetraploides que están separadas geográficamente, pero a diferencia del caso anterior, aquí la triploidía en combinación con la apomixis constituyen la condición más común para la especie (Quarin & Lombardo 1986, Norrmann *et al.* 1989) y por lo tanto en este caso la triploidía no es solo un puente de flujo génico entre las razas coespecíficas.

Otro de los mecanismos de poliploidización presente en los complejos agámicos de *Paspalum*, involucra la generación de nuevos tetraploides a partir de la fecundación de gametos no reducidos de los diploides ($2n$) con polen reducido ($2n$) de plantas tetraploides que puedan encontrarse coexistiendo en la misma población (Siena *et al.* 2008). Este proceso de poliploidización recurrente en un solo paso, permite generar nuevas combinaciones genotípicas a nivel tetraploide, constituyendo una estrategia eficiente para el

mantenimiento de la variabilidad a nivel poliploide, aunque estos se reproduzcan por apomixis (Siena *et al.* 2008).

1.3.2.- Distribución de los complejos agámicos en las poblaciones naturales

Las diferentes razas que integran a los complejos agámicos se encuentran distribuidas en la naturaleza estableciéndose principalmente dos tipos de poblaciones: 1) poblaciones puras u homogéneas constituidas por individuos que presentan un único nivel de ploidía y 2) poblaciones mixtas, donde coexisten individuos o citotipos con diferentes niveles de ploidía en una misma comunidad. Ambos tipos de poblaciones fueron descritos para los complejos *Taraxacum* (den Nijs & Menken 1996), *Capillipedium-Dichantium-Bothriochloa* (De Wet & Harlan 1970), *Panicum maximum* (Pernès 1975), *Tripsacum* (Moreno-Pérez *et al.* 2009), *Ranunculus auricomus* (Hörandl *et al.* 1997, Hörandl & Greilhuber 2002, Cosendai & Hörandl 2010) y *Paspalum* (Norrman *et al.* 1989, Urbani *et al.* 2002, Daurelio *et al.* 2004).

Por otra parte, los complejos agámicos pueden presentar una gran variedad de combinaciones entre niveles de ploidía y sistemas reproductivos en las poblaciones naturales, lo que sugiere que la apomixis no necesariamente implica uniformidad en una especie y que la diversidad se mantiene en esas poblaciones. Estos mecanismos son responsables de generar y mantener la diversidad genética e involucran, entre otras cosas, el intercambio o recombinación genética entre diferentes citotipos (Berthaud 2001).

1.3.3.- Patrones de variación genética en poblaciones naturales de complejos agámicos

El potencial evolutivo de una población o especie depende en gran medida de los patrones de variación genética que presente la misma. La magnitud de esa variación está determinada por el tamaño efectivo de la población, los sucesivos

eventos históricos, el o los sistemas reproductivos y la estructura poblacional (Menken *et al.* 1995). La diferenciación de las poblaciones es promovida por una baja frecuencia de flujo génico, un tamaño reducido de las poblaciones y por la acción de los diferentes procesos que ejercen presión de selección. Por el contrario, patrones de variación espacialmente homogéneos se generan en condiciones de altas tasas de flujo génico, poblaciones de gran tamaño y regímenes uniformes de selección (Menken *et al.* 1995). De todos los procesos que promueven en mayor o menor grado diferenciación de las poblaciones, el flujo de genes es de vital importancia para dar forma a la estructura genética intra e interpoblacional (Endler 1977, Turner *et al.* 1982).

1.3.3.1.- Patrones de variación genética en plantas de reproducción sexual

Las plantas de reproducción sexual pueden ser autógamas, alógamas o bien pueden poseer una estrategia mixta con ambos sistemas reproductivos. La autogamia es la capacidad que tiene una planta para generar descendientes por autofecundación; mientras que en la alogamia necesariamente debe existir polinización cruzada entre diferentes genotipos de una población. Este último mecanismo se produce por la acción de diferentes barreras a la autofecundación, como ser las de tipo temporal (dicogamia), espacial (monoecia y dioecia) o de sistemas bioquímicos específicos de autoincompatibilidad. En las plantas autógamas, las poblaciones están constituidas por individuos homocigotos para la mayoría de los loci, por lo que constituyen una mezcla de líneas homocigotas, mientras que las poblaciones de plantas alógamas están conformadas por individuos que contienen una proporción muy alta de heterocigosis.

En general la variación genética intrapoblacional en gramíneas autógamas es baja, mientras que es intermedia en especies con sistema de fecundación mixto, y más elevada en las alógamas (Hamrick & Godt 1990). En cambio en las

especies alógamas, la variabilidad intrapoblacional es elevada y sustancialmente mayor que la interpoblacional (Huff *et al.* 1993).

I.3.3.2.- Patrones de variación genética en plantas de reproducción apomíctica

La magnitud de la variabilidad genética en las especies apomícticas es un tema de controversia entre los investigadores. La percepción de que las poblaciones apomícticas presentan escasa variabilidad fue la idea dominante durante buena parte del siglo XX. Este concepto se mantuvo hasta la actualidad a pesar de los estudios básicos en géneros apomícticos tales como *Crepis* (Darlington 1939, Stebbins 1950), *Rubus* (Gustafsson 1943), y *Townsendia* (Beaman 1957), estudios que indicaron altos niveles de variación cromosómica y morfológica en estos taxones.

Los patrones de diversidad genética pueden determinarse mediante la utilización de caracteres morfológicos, ecológicos, citológicos, bioquímicos (isoenzimas) y moleculares y en algunos casos resulta conveniente la combinación de estos métodos (Newell *et al.* 1974, Usberti & Jain 1978, Lyman & Ellstrand 1984, Hörandl *et al.* 2001).

La diversidad genética en poblaciones apomícticas abarca dos aspectos principales: 1) la heterocigosidad en muchos locus dentro de los individuos y 2) la diversidad de genotipos multilocus, que representa la presencia de individuos con genotipos diferentes dentro y entre poblaciones (Höralndl & Paun 2007). En ambos niveles, la estructura de la diversidad genética de las plantas apomícticas difiere de las plantas sexuales y esto puede ser demostrado al realizar una comparación directa entre razas sexuales y apomícticas relacionadas.

1.3.3.2.1.- Heterocigosidad y efectos de la poliploidía

En muchas especies que forman complejos agámicos, las poblaciones apomícticas muestran una mayor proporción de individuos heterocigotos para un gran número de loci que las razas sexuales, considerando que la heterocigosidad observada es calculada como número de individuos heterocigotos dividido el número total de individuos (Gornall 1999). Valores elevados de heterocigosidad en plantas apomícticas fueron tradicionalmente atribuidos al origen alopoliploide, que puede resultar en la fijación de la heterocigosis en los loci duplicados. Gornall (1999) demostró que la heterocigosis en las plantas apomícticas aumenta considerablemente con respecto a las plantas sexuales sólo si el origen de los individuos apomícticos es la aloploidía, lo que confirma que el origen híbrido tiene un efecto en la diversidad alélica. Sin embargo, se demostró que existen especies apomícticas que son de origen autopoliploides (revisado por Gornall 1999, Grimanelli *et al.* 2001).

Además del origen híbrido, los niveles de heterocigosidad pueden verse incrementados por mutaciones en diferentes alelos, especialmente en aquellos poliploides con niveles elevados de ploidía (superiores al tetraploide). En los linajes asexuales, los diferentes alelos de un locus evolucionan independientemente y acumulan diferentes mutaciones, lo que con el tiempo lleva a un incremento en la heterocigosidad (Birky 1996).

Debido a la ausencia de meiosis y de segregación, la heterocigosidad es preservada en las descendencias y tiene un efecto potencialmente importante en el mantenimiento de una parte de la diversidad alélica de individuos apomícticos. Esta diversidad puede ser liberada después de ocasionales eventos sexuales y posteriormente puede ser fijada para crear rápidamente una amplia gama de nuevas combinaciones genotípicas (Hörandl & Paun 2007).

Algunos de los efectos adicionales que pueden encontrarse relacionados con la hibridación son los rearrreglos estructurales de los cromosomas, la expresión desigual de genes duplicados, la activación de transposones o el silenciamiento de genes (Adams *et al.* 2003, Adams & Wendel 2005, Hegarty & Hiscock 2005, Salmon *et al.* 2005). Los híbridos muchas veces exhiben características fenotípicas nuevas o extremas respecto a sus parentales, propiedad conocida como vigor híbrido o heterosis; este fenómeno puede crear oportunidades para la adaptación evolutiva y el aislamiento reproductivo con respecto a taxones relacionados. De hecho, estudios realizados en híbridos poliploides determinaron que ocurren cambios en la expresión génica y la composición metabólica de estas plantas, los cuales muchas veces son responsables de alterar la respuesta de los poliploides apomícticos a predadores y adaptación a nuevos ambientes (Orians 2000, Kirk *et al.* 2005).

La poliploidización en sí resulta en una nueva diversidad alélica, como fue observado en los perfiles de AFLP y SSR obtenidos para un autotetraploide sexual de *Ranunculus cassubicifolius* (Paun *et al.* 2006b). Otra de las consecuencias del proceso de formación de los poliploides es la reorganización que ocurre a nivel genómico, la cual muchas veces involucra cambios en el tamaño del genoma (Leitch & Bennett 2004) En este aspecto, es de esperar que los genomas de las plantas poliploides apomícticas probablemente no sean meras adiciones y multiplicaciones de genotipos diploides sexuales, sino que representan nuevos genotipos y fenotipos en comparación con sus parientes sexuales (Hörandl & Paun 2007). Estudios llevados a cabo en algunas especies de *Paspalum* demostraron que luego del proceso de autoploidización se producen modificaciones genéticas que involucran la pérdida y ganancia de fragmentos como así también cambios en la expresión génica (Martelotto *et al.* 2005, Martelotto *et al.* 2007).

I.3.3.2.2.- Diversidad genotípica dentro y entre poblaciones

La diversidad genotípica de cada individuo es usualmente estimada mediante un patrón de bandas multilocus para varios loci. La variación en loci individuales depende de la dinámica molecular del marcador, y por lo tanto las medidas de diversidad genotípica dependen del tipo de marcador utilizado (Loxdale & Lushai 2003, Lushai *et al.* 2003). Es de esperar que la diversidad aumente en forma exponencial con el número de loci analizados dentro del mismo sistema de marcador (Hörandl *et al.* 2000). Más aún, la herencia de los marcadores dominantes vs. codominantes influye en la estimación de la diversidad, debido principalmente a las tasas de mutación que pueden ser detectadas con uno u otro sistema. Nybom (2004) realizó comparaciones de diferentes tipos de marcadores moleculares utilizados para estimar la diversidad genética intraespecífica en plantas. Sus resultados demostraron que las estimaciones realizadas con marcadores dominantes (RAPD, AFLP, ISSR) son muy similares y pueden ser directamente comparables. Con marcadores del tipo codominantes (STMS), los valores de diversidad genética estimada dentro de las poblaciones pueden llegar a ser hasta tres veces mayores debido a que este tipo de marcador proporciona una mayor resolución en la detección de mutaciones. Las estimaciones de la diversidad entre poblaciones en cambio, son similares a las obtenidas con el uso de marcadores de herencia dominante.

Ellstrand & Roose (1987) efectuaron una revisión de trabajos referidos a variabilidad genética en especies de multiplicación clonal en la cual incluyeron algunas especies de reproducción apomíctica. Ellstrand & Roose (1987) encontraron que en 6 de las 7 especies apomícticas estudiadas, las poblaciones tienen una estructura genética multiclonal con una diversidad genética elevada. Asimismo, informaron que los diferentes tipos clonales están confinados a una o a muy pocas poblaciones, y que es excepcional la expansión de un clon a través de toda el área de distribución de una especie.

Por otro lado, en la mayoría de las poblaciones estudiadas de cuatro géneros bien documentados (*Antennaria*, *Erigeron*, *Ranunculus*, *Taraxacum*) se observó la presencia de un clon dominante y algunos pocos genotipos de baja frecuencia, lo cual se ve reflejado en bajos valores de diversidad genotípica (Gornall 1999, Hörandl *et al.* 2001).

Si se considera la diversidad genética entre poblaciones, aún marcadores con baja variabilidad como las isoenzimas revelaron que, para *Hieracium*, *Taraxacum*, *Ranunculus auricomus*, *Antennaria rosea* y *Erigeron compositus*, la mayoría de los genotipos se encuentran restringidos a un solo sitio (Gornall 1999, Hörandl *et al.* 2001). Entre los linajes que fueron encontrados en más de una población, la mayoría presenta una distribución que en promedio, abarca 3,3 poblaciones por linaje. Por el contrario, estudios de variabilidad realizados en *Taraxacum officinale*, *Limonium durifourii*, *Heteropogon contortus*, *Hieracium pilosela* y *Ranunculus carpaticola* utilizando marcadores como AFLP, RAPD o ISSR, revelaron que casi todos los genotipos analizados se encontraban restringidos a un solo sitio (Palacios & Gonzales-Candelas 1997, Carino & Daehler 1999, Van der Hulst *et al.* 2000, Houliston & Chapman 2004, Paun *et al.* 2006a). Estos datos sugirieron un patrón general de diversidad genotípica en plantas apomícticas, donde la misma se encuentra mayormente particionada entre poblaciones y en menor grado dentro de las poblaciones, al igual que en las plantas autógamias y se distribuye en una escala geográfica más amplia en comparación con las especies sexuales afines (Nybom 2004).

Si bien se han realizado numerosos estudios sobre la estructura genética de las poblaciones de complejos agámicos en muchos de los géneros con especies apomícticas, poco se conoce sobre la estructura de las poblaciones naturales de las especies apomícticas del género *Paspalum*. En este aspecto, Daurelio *et al.* (2004) analizaron la variabilidad genética de dos tetraploides apomícticas de *Paspalum notatum*, una simpátrica con una población diploide sexual y otra alopátrica y encontraron que entre las poblaciones apomícticas, el grado de

variabilidad observado es significativamente diferente: la población tetraploide apomíctica simpátrica tiene una diversidad sustancialmente mayor que la población alopátrica.

1.3.3.3- Origen de la variabilidad en plantas apomícticas

La estabilidad genética es una característica notable de las especies apomícticas como consecuencia de la formación de progenies por vía agámica. Por lo tanto, el éxito evolutivo de una agamospecie dependerá de sus posibilidades de adquirir eventualmente variabilidad genética para adecuarse a los diferentes cambios de los factores ambientales con el correr del tiempo. De acuerdo a Hörandl & Paun (2007), los procesos más importantes que producen diversidad heredable en las especies apomícticas son los siguientes: 1) la ascendencia de los complejos apomícticos como factor histórico; 2) el flujo de genes con especies sexuales relacionadas genéticamente; 3) la sexualidad facultativa y 4) las mutaciones. A continuación se describen cada uno de estos procesos.

1.3.3.3.1.- La ascendencia de los complejos apomícticos como factor histórico

En las plantas apomícticas de origen aloploiploide, es probable que se generen altos niveles iniciales de heterocigosidad (Hörandl & Paun 2007). Podría hipotetizarse entonces que la hibridación de ancestros genéticamente divergentes, responsable de originar a una nueva especie apomíctica, se caracteriza por generar altos niveles de diversidad alélica y genotípica en poblaciones de híbridos aloploiploides. La diversidad que se genera inicialmente puede ser conservada con el tiempo a través de la reproducción apomíctica y

también puede verse incrementada a partir de la generación de nuevos genotipos vía sexualidad facultativa y mutaciones.

Aunque la idea es simple, esta hipótesis resulta a veces difícil de probar. Los ancestros de los cuales derivaron las razas apomícticas sólo fueron estudiados para unos pocos géneros y la posibilidad de la existencia de especies sexuales desconocidas, ya extintas, representa la incertidumbre de los enfoques que utilizan la reconstrucción filogenética.

1.3.3.3.2.- Flujo de genes con especies sexuales relacionadas genéticamente

Muchas de las especies apomícticas no poseen un sistema reproductivo cerrado ya que pueden producir polen meióticamente reducido y fértil, permitiendo que en aquellas especies poliploides que constituyen complejos agámicos los individuos apomícticos polinicen y fecunden a los individuos sexuales simpátricos. El contacto (simpatría) entre diploides y tetraploides permite el intercambio génico entre los dos grupos. Básicamente, la sexualidad es mantenida al nivel diploide mientras que en los niveles de ploidía superior la creación de plantas apomícticas por alguna de las vías de poliploidización permite la generación de nuevas combinaciones genotípicas incrementando la diversidad genética. Estos mecanismos son factores importantes en la evolución de las gramíneas tropicales apomícticas.

En *Antennaria rosea* (Bayer 1990), *Taraxacum* sect. *Rudelaria* (Menken *et al.* 1995) y *Amelanchier* (Campbell *et al.* 1999), se observó una variabilidad considerable en poblaciones apomícticas simpátricas con sus respectivas contrapartes sexuales. Si bien no fue estudiada simultáneamente la variabilidad de poblaciones apomícticas simpátricas y alopátricas, en casos separados se encontró que la magnitud de la variabilidad de las poblaciones simpátricas fue similar en algunos casos a la de las poblaciones sexuales con las cuales comparten el hábitat (Ellstrand & Roose 1987, Hamrick & Godt 1990).

En *Paspalum notatum*, Daurelio *et al.* (2004) compararon los niveles de variabilidad de dos poblaciones tetraploides apomícticas de las cuales una de ellas se encontraba en simpatría con una población diploide sexual. Estos autores también observaron una variabilidad considerable en la población simpátrica con su contraparte sexual y entre las poblaciones apomícticas, los valores encontrados fueron mayores para la población apomíctica simpátrica con la raza sexual en comparación a los encontrados para la población apomíctica alopátrica. Esto sugiere la ocurrencia de mecanismos de flujo génico entre ambas poblaciones simpátricas, a pesar de su diferencia en el nivel de ploidía. Por el contrario, Hörandl *et al.* (2001) observaron que las poblaciones apomícticas simpátricas con poblaciones sexuales del complejo agámico *Ranunculus auricomus* presentaron una variabilidad deprimida, similar o aún menor que la de algunas poblaciones alopátricas, sugiriendo la ocurrencia de mecanismos de exclusión en estas poblaciones simpátricas de los genotipos que se originarían de los cruzamientos entre sexuales y apomícticos.

Estos ejemplos sugieren que el retrocruzamiento con las especies sexuales relacionadas puede ser un mecanismo importante y recurrente para la generación de un gran número de genotipos nuevos. Sin embargo, la cantidad real de retrocruzamiento depende en gran medida de las barreras reproductivas, como la separación geográfica, la diferenciación ecológica y la distribución de los niveles de ploidía (Hörandl & Paun 2007).

1.3.3.3.- Sexualidad facultativa

El incremento en la información sobre las vías del desarrollo de la reproducción apomíctica demostró que la apomixis casi nunca es obligada (Asker & Jerling 1992). De hecho, la apomixis y la sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes ya que pueden aparecer simultáneamente sacos embrionarios reducidos (meióticos) y no reducidos (apomeióticos) en una

misma planta, en una misma inflorescencia y aún en un mismo óvulo (Harlan *et al.* 1964). Los beneficios de la sexualidad y la recombinación para promover la adaptación de las poblaciones frente a cambios del entorno fueron bien documentados (Otto 2003). La sexualidad tiene la ventaja de generar variación genética y por lo tanto, ante la exposición de los organismos a cambios ambientales, facilita la adaptación (Tucker & Koltunow 2009).

Se considera que una planta es apomíctica cuando genera descendientes a través de esta vía reproductiva. Del mismo modo, una planta apomíctica capaz de generar al menos una parte de su progenie por la vía sexual a través de sacos embrionarios de origen meiótico, se conoce como apomíctica facultativa. Las progenies de los genotipos apomícticos facultativos generalmente pueden segregarse en dos clases: con genotipo materno, debido a procesos de apomeiosis y partenogénesis ($2n + 0$) o como nuevos genotipos, productos de meiosis y fecundación ($n + n$). A las primeras se las conoce como plantas de tipo materno y de tipo aberrante o fuera de tipo a las que provienen de reproducción sexual. Sin embargo, las vías de formación de descendientes en una planta con apomixis gametofítica pueden ser aún más complejas, y se pueden resumir en cuatro caminos diferentes, sin considerar casos más raros que involucren, por ejemplo, no-reducción en granos de polen (Savidan 2000):

1. Apomeiosis + partenogénesis = $2n + 0$, descendencia de genotipo materno.
2. Apomeiosis + fecundación = $2n + n$, híbridos BIII.
3. Meiosis + fecundación = $n + n$, reproducción sexual, nuevo genotipo.
4. Meiosis + partenogénesis = $n + 0$, descendientes haploides.

Pernès *et al.* (1970) observaron en *Panicum maximum* una frecuencia de alrededor del 3% de plantas diferentes al tipo materno, producto de la fecundación de gametos femeninos reducidos de sacos embrionarios meióticos,

fenómeno que también se observó en *Dichantium* y *Bothriochloa* (Harlan *et al.* 1964) y en *Pennisetum* (Bashaw *et al.* 1992).

Las razas tetraploides naturales de *Paspalum notatum* son apomícticas obligadas (Burton 1948, Bashaw *et al.* 1970). Sin embargo, estudios recientes realizados por Ortiz *et al.* (1997), Martínez *et al.* (2001), Espinoza *et al.* (2006) y Rebozzio *et al.* (2010) mediante análisis cito-embriológicos y moleculares, determinaron que diferentes genotipos 4x naturales se reproducían por apomixis, pero que en mayor o menor grado, retenían algún potencial para la reproducción sexual. En efecto, mediante análisis de progenie asistido por marcadores moleculares, Ortiz *et al.* (1997) y Rebozzio *et al.* (2010) lograron identificar individuos segregantes en la descendencia de aquellos genotipos que por técnicas embriológicas fueron clasificados como apomícticos obligados. Sin embargo, también demostraron que genotipos apomícticos facultativos que en estudios embriológicos habían resultado con un grado importante de sexualidad, resultaron expresar la sexualidad en muy baja proporción o no expresarla, cuando se analizó la descendencia con marcadores moleculares. Estos resultados, de todas maneras, indican que esta especie tiene potencial para la sexualidad, por lo que seguramente la sexualidad ocasional es un mecanismo generador de variabilidad genética en las gramíneas tropicales apomícticas. Del mismo modo, Hörandl *et al.* (2001) encontraron evidencias de recombinación y fecundación cruzada entre tetraploides apomícticos naturales del complejo agámico *Ranunculus auricomus*. De acuerdo a estos autores, tales eventos de recombinación facultativa entre los tetraploides de este complejo agámico pueden constituirse en un factor muy importante para su evolución. Uno o algunos de los nuevos genotipos mejor adaptados pueden ser fijados a través de la apomixis y constituirse en el camino inicial para la formación de nuevas agamospecies (Hörandl *et al.* 2001).

Según Hörandl & Paun (2007) la sexualidad residual puede jugar un rol crucial en la creación de variación genotípica de los complejos agámicos debido

a que de todos los procesos probablemente este sea el que presenta los mayores efectos cuantitativos en un corto plazo.

I.3.3.3.4.- Mutaciones

Estudios recientes utilizando marcadores moleculares de mayor sensibilidad y métodos que permiten discriminar mutaciones por eventos de recombinación, permitieron determinar que la acumulación de mutaciones somáticas puede tener un alto impacto en los niveles de variación genética detectados en las plantas apomícticas (Mes *et al.* 2002, Van der Hulst *et al.* 2003, Hörandl 2004, Houliston & Chapman 2004). Tales alteraciones del material hereditario no son desenmascaradas rápidamente a través de la recombinación, como en el caso de las especies sexuales, sino que son fijadas en la población debido al modo asexual de reproducción (De Wet & Stalker 1974, Asker & Jerling 1992). Aquellas mutaciones que ocurren en los tejidos esporógenos de los primordios florales se transmitirán sexualmente a través de los gametos masculinos y femeninos, o asexualmente a través del desarrollo partenogenético de la ovocélula.

Ellstrand & Roose (1987) encontraron que la variación genética en algunas poblaciones de especies apomícticas tales como *Erigeron annuus*, *Taraxacum obliquum*, *T. officinale*, *T. tortilobum* y *Pallea andromedifolia*, en las que no se conoce ninguna alternativa a la reproducción apomíctica, se debería exclusivamente a procesos de mutación o a orígenes múltiples de los clones detectados. En *Paspalum dilatatum*, una especie pentaploide apomíctica obligada que posee 3 genomas diferentes IIJX (Burson 1983), se encontró variación para 17 caracteres morfológicos en poblaciones naturales procedentes del mismo sitio (Phalen 1986). Este autor consideró que buena parte de la variabilidad genética sería consecuencia de mutaciones génicas, principalmente

a nivel del genoma X. La condición de hemicigosis de este genomio permitiría una expresión directa de las mutaciones, tanto dominantes como recesivas.

Estudios realizados por Paun & Hörandl (2006) proporcionaron evidencia directa de la evolución de las poblaciones naturales asexuales de *Ranunculus carpaticola* y demostraron que una extensa variación pudo ser generada dentro de estas poblaciones a través de la mutación. Sin embargo las mutaciones dentro de las razas asexuales incrementan la variabilidad de las poblaciones en una menor escala y tienen un impacto local mucho menor que la recombinación a través de la sexualidad facultativa.

1.4.- Los complejos agámicos del género Paspalum: Generalidades

El género *Paspalum* L. comprende cerca de 330 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales a templadas principalmente de América, con unas pocas especies que habitan en el viejo mundo (Clayton & Renvoize 1986, Watson & Dallwitz 1992). Son a menudo dominantes en lugares abiertos, como pantanos, planicies y praderas; también se hallan especies en ambientes selváticos o boscosos y en dunas costeras y hábitats halófitos o anegados. Algunas de las especies son ruderales o malezas, hallándose en bordes de caminos, vías férreas y suelos modificados. En lo que se refiere al rango altitudinal, algunas especies (como por ejemplo las del grupo *Racemosa* y *Bonplandia*) llegan hasta los 4600 msnm (Zuloaga & Morrone 2005). El centro de diversidad del género se halla en la región central de Brasil (Chase 1929) con numerosas especies asociadas a cerrados y campos rupestres.

En cuanto al número cromosómico, la mayoría de las especies tienen un número básico de cromosomas de $x = 10$ (Quarin 1992), aunque hay casos excepcionales de especies que presentan $x = 6$ (Quarin 1974) y $x = 9$ (Davidse & Pohl 1974). Diferentes niveles de ploidía fueron citados dentro del género: desde diploides ($2n = 2x$) hasta hexadecaploides ($2n = 16x$). Según datos

recopilados por Quarin (1992), aproximadamente el 80% de las especies estudiadas son poliploides o tienen razas poliploides. Alrededor del 50% de los poliploides son tetraploides y la mayoría de estos son apomícticos, mientras que la reproducción sexual puede presentarse tanto en diploides como en poliploides, desde la autogamia más extrema hasta la alogamia debida a la autoincompatibilidad. Honfi (2003) realizó una revisión de antecedentes sobre números cromosómicos dentro del género y logró reunir 933 registros para 167 especies. Estos datos permitieron agrupar a las especies en tres grupos. En el primero se encuentran aquellas especies para las cuales el único número cromosómico encontrado es $2n = 2x = 20$. En el segundo se agrupan las especies para las que se conocen tanto razas diploides como poliploides. El tercer grupo está formado por especies en las que se han encontrado exclusivamente razas poliploides. En este último grupo, aproximadamente la mitad de los poliploides poseen exclusivamente razas tetraploides. También se encontraron poliploides impares naturales en el género, abarcando desde la triploidía ($3x$), pentaploidía ($5x$), heptaploidía ($7x$) y eneaploidía ($9x$).

Diversos estudios experimentales fueron llevados a cabo dentro del género *Paspalum* para tratar de dilucidar el/los procesos que dieron origen a los poliploides (Quarin & Hanna 1980, Quarin *et al.* 1984, Quarin & Norrmann 1987, Quarin *et al.* 1989, Quarin *et al.* 1996, Quarin *et al.* 2001). Si bien fueron encontrados dentro del género especies alopoliploides de reproducción apomíctica tales como el pentaploide *Paspalum dilatatum* (Burson 1989) y el tetraploide *P. pauciciliatum* (Smith 1948, *P. dilatatum* var. *pauciciliatum*), algunos autores consideran que la gran mayoría de los tetraploides apomícticos de *Paspalum* son de origen autoploide (Forbes & Burton 1961, Norrmann *et al.* 1989, Quarin *et al.* 1998, Quarin 1992, Pupilli *et al.* 1997).

En *Paspalum*, muchas de las entidades apomícticas forman parte de complejos poliploides cuyos citotipos diploides son de reproducción sexual, alógamos por autoincompatibilidad y tienen meiosis normal (los cromosomas

forman regularmente bivalentes), mientras que los poliploides coespecíficos (la gran mayoría tetraploides) son de reproducción apomíctica, pseudógamas y generalmente forman asociaciones multivalentes en la meiosis (meiosis irregular). Las razas cromosómicas integrantes de estos complejos agámicos son morfológicamente muy similares y son detectados solamente por medio de estudios que permitan conocer su nivel de ploidía (Quarin & Lombardo 1986, Quarin & Norrmann 1987, Norrmann *et al.* 1989, Quarin 1992).

En general la información sobre los niveles de ploidía y los sistemas reproductivos proviene de estudios que involucran una o unas pocas plantas por población. Sin embargo, no existe información sobre la manera en que están constituidas las poblaciones naturales respecto al nivel de ploidía de sus individuos, la variabilidad genética de los poliploides apomícticos, el tipo de apomixis (obligada o facultativa) y la tasa de sexualidad en el caso de que la apomixis sea facultativa.

1.5.- Las especies en estudio

Las especies estudiadas en este trabajo forman parte de los grupos mencionados anteriormente y son las que se detallan a continuación:

Paspalum buckleyanum Mez es una especie americana con distribución disyunta: originalmente descrita para México. En América del Sur se encuentra en Colombia, en Argentina abarca la Provincia fitogeográfica Chaqueña (Corrientes, Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Santa Fe y Salta) (Cabrera 1994) y la parte occidental de Paraguay. Crece en campos anegadizos o esteros, con agua permanente; también se encuentra en bordes de caminos sobre suelos húmedos y pantanosos entre 0 y 200 msnm.

Es una valiosa gramínea forrajera natural con citotipos diploide sexual ($2n = 2x = 20$), tetraploide apomíctico facultativo ($2n = 4x = 40$), pentaploide

apomítico obligado ($2n = 5x = 50$) y hexaploide ($2n = 6x = 60$) (Burson 1997, Hojsgaard *et al.* 2009).

Paspalum denticulatum Trin. es una especie nativa del oeste de Brasil, Paraguay y norte de Argentina. Naturalmente crece en lugares bajos y húmedos, en bordes de arroyos, acequias y ríos; además es frecuente en suelos modificados, hallándose en márgenes de caminos. Es un forraje apetecido por el ganado y es medianamente productivo (Rosengurtt *et al.* 1970).

Si bien se han descrito citotipos diploides (Morrone *et al.* 2006, Sede *et al.* 2010) y autotetraploides apomíticos facultativos (Quarin & Burson 1991), es muy probable que puedan encontrarse otros niveles de ploidía y modos reproductivos.

Paspalum lividum Trin. presenta una distribución que abarca desde el sur de los Estados Unidos, México hasta el sur de Argentina, encontrándose también en Cuba. Crece en suelos bajos, planicies húmedas, pantanos y a lo largo de arroyos y canales. Es una gramínea perenne y estolonífera. Estudios citogenéticos siempre reportaron al citotipo tetraploide y apomítico (Gould 1958, Gould 1968, Reeder 1967, Burson & Bennett 1971, Davidse & Pohl 1972, Quarin 1977, Pagliarini *et al.* 2001). No obstante, también existen registros formales de una introducción heptaploide ($2n = 7x = 70$) (Snyder 1953).

Si bien algunos autores se refieren a *P. lividum* como una sinonimia de *P. denticulatum* (Denham *et al.* 2010), en esta tesis se tomó el criterio original de Chase (1929) para clasificar a ambas especies debido a que las evidencias utilizadas para el tratamiento de la sinonimia no fueron convincentes.

Paspalum nicorae Parodi pertenece al grupo Plicatula y se distingue de *P. plicatum* por la presencia de largos rizomas cundidores y hojosos. Su distribución geográfica abarca Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Crece en

campos bajos, preferentemente en suelos flojos y arenosos. Según Burkart (1969), esta es una especie muy útil para la fijación de médanos aunque es un forraje poco apetecido y medianamente productivo. Fue descrita como una especie tetraploide ($2n = 4x = 40$) y el modo de reproducción es la apomixis apospórica y seudógamas (Burson & Bennett 1970). Un gran número de introducciones tetraploides fueron informadas por diferentes autores (Moraes Fernandes *et al.* 1974, Pagliarini *et al.* 2001), incluyendo una lista de mas de 50 introducciones coleccionadas a lo largo del estado de Río Grande do Sul, Brasil (Reis *et al.* 2010).

Paspalum unispicatum Scribn. y Merr. pertenece al grupo Decumbentes y se distribuye desde el Sur de Texas, Estados Unidos hasta América del Sur en Venezuela, Bolivia, Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. Se caracteriza por incluir plantas con inflorescencias terminales y axilares presentes en la última vaina foliar, con uno o dos racimos por inflorescencia y espiguillas con gluma inferior dimorfa. Crece en campos, en bordes de caminos y barrancas de ríos, sobre suelos modificados y es considerada un forraje poco productivo (Rosengurtt *et al.* 1970). Se encontraron citotipos diploides ($2n = 2x = 20$), triploides ($2n = 3x = 30$) y tetraploides ($2n = 4x = 40$), siendo estos últimos de reproducción apomítica facultativa (Burson 1997).

Paspalum rufum Nees ex Steud. habita en Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Crece en bordes de esteros y arroyos, en campos bajos con suelos húmedos. Su posición taxonómica es indefinida ya que presenta caracteres afines a especies de los grupos Eriantha y Virgata. Se aproxima a especies del primer grupo por el tipo de pilosidad de las espiguillas, distinguiéndose por el porte y la coloración del antecio superior. Por otra parte, la similitud al grupo Virgata es por poseer antecio superior oscuro y por el porte de las plantas, con hojas rígidas y cortantes; se separa a su vez de este último por la pilosidad de

las espiguillas. Son plantas perennes, cespitosas, robustas, formando matas densas, con hojas predominantemente basales y rizomas cortos, rígidos. Rosengurtt *et al.* (1970) citan que es un forraje apetecido, medianamente productivo. Esta especie involucra a razas diploides ($2n = 2x = 20$) que se reproducen por sexualidad (Saura 1948, Norrmann *et al.* 1989) y razas tetraploides ($2n = 4x = 40$) de reproducción apomíctica facultativa (Burson 1975, Moraes Fernandes *et al.* 1974, Norrmann *et al.* 1989).

II.- HIPÓTESIS

II.- HIPÓTESIS

El planteo de hipótesis en el área de los estudios moleculares tendientes a identificar el/los genes de la apomixis se verá favorecida si se dilucida el sistema genético de este carácter en las poblaciones naturales. Es por ello que se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

- Existen diferencias entre las especies de *Paspalum* respecto a la conformación de las poblaciones en: 1) el nivel de ploidía de los individuos que las integran; 2) la variación genética presente en los individuos poliploides apomícticos; y 3) el grado de apomixis facultativa que los individuos poliploides expresan realmente en su descendencia.
- No existen, entre las poblaciones naturales de los citotipos poliploides apomícticos, individuos que sean 100% sexuales.
- Existe variabilidad en el contenido absoluto de ADN a nivel interespecífico e intraespecífico en *Paspalum*. Esa variabilidad no es exclusiva del nivel de ploidía.

III.- OBJETIVOS

III.- OBJETIVOS

III.1.- Objetivo general

Establecer la relación entre niveles de ploidía, sistemas de reproducción y variabilidad genética en poblaciones naturales de distintas especies de *Paspalum*.

III.2.- Objetivos particulares

- Determinar la uniformidad o heterogeneidad del nivel de ploidía en poblaciones naturales de *Paspalum*.
- Estudiar con marcadores moleculares, en distintas especies de *Paspalum*, la variación genética entre individuos tetraploides y apomícticos pertenecientes a una misma población.
- Hacer, en algunas poblaciones seleccionadas, un análisis del sistema reproductivo, mediante técnicas de citometría de flujo, en búsqueda de posibles individuos de reproducción sexual en especies que son 4x apomícticas.
- Determinar y comparar el tamaño del genoma de algunas especies del género, incluyendo distintos niveles de ploidía, mediante técnicas de citometría de flujo utilizando ioduro de propidio como colorante.

IV.-MATERIALES Y MÉTODOS

IV.-MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- Material Vegetal

Se colectaron individuos de 22 poblaciones naturales correspondientes a las 6 especies seleccionadas para este estudio. Estas colecciones se realizaron en diferentes localidades pertenecientes al rango de distribución geográfica en Argentina y dos localidades de Paraguay (Tabla 1). Los sitios de colección de las especies fueron seleccionados en base a datos recopilados sobre distribución y recuentos cromosómicos.

Tabla 1. Identificación y sitios de colección de las poblaciones naturales de las diferentes especies de *Paspalum* seleccionadas para este estudio.

Especie	Introducción	Población	Lugar de colección
<i>P. buckleyanum</i>	MS1	A1	56 km norte de Sáenz Peña, Chaco, Argentina
	MS10	A2	2 km este de El Galpón, Salta, Argentina
	MS13	A3	Acceso a Puerto Antequeras, Chaco, Argentina
	Q4303	A4	120 km noroeste de Asunción, Paraguay
<i>P. denticulatum.</i>	MS12	D1	Acceso a Puerto Antequeras, Chaco, Argentina
	MS2	D2	9 km oeste de Tres Isletas, Chaco, Argentina
	Q4304	D3	49 km noroeste de Asunción, Paraguay
<i>P. lividum</i>	MS9	L1	2 km oeste de El Galpón, Salta, Argentina
	MS8	L2	4,5 km norte de Orán, Salta, Argentina
	MS25	L3	3,8 km sur de Riachuelo, Corrientes, Argentina

<i>P. nicorae</i>	MS7	N1	6 km noroeste Pedro R. Fernández, Corrientes, Argentina
	MS4	N2	Santa Ana, Corrientes, Argentina
	MS5	N3	Parque Arqueológico "Santa Fe La Vieja", Cayastá, Santa Fe, Argentina
<i>P. rufum</i>	MS6	R1	Paso Rosario, Corrientes, Argentina
	MS22	R2	Paso Lucero, Corrientes, Argentina
	MS18	R3	22 km norte de Gobernador Crespo, Santa Fe, Argentina
	MS23	R4	2 km norte del acceso a Saladas, Corrientes, Argentina
	MS20	R5	13 km norte de Concordia, Entre Ríos, Argentina
	MS16	R6	50 km norte de Resistencia, Chaco, Argentina
<i>P. unispicatum</i>	U15	U1	3 km sudoeste de Campo Largo, Chaco, Argentina
	MS14	U2	10 oeste noroeste de Pozo del Tigre, Formosa, Argentina
	MS11	U3	Intersección de ruta provincial 34 y ruta nacional 16, Salta, Argentina

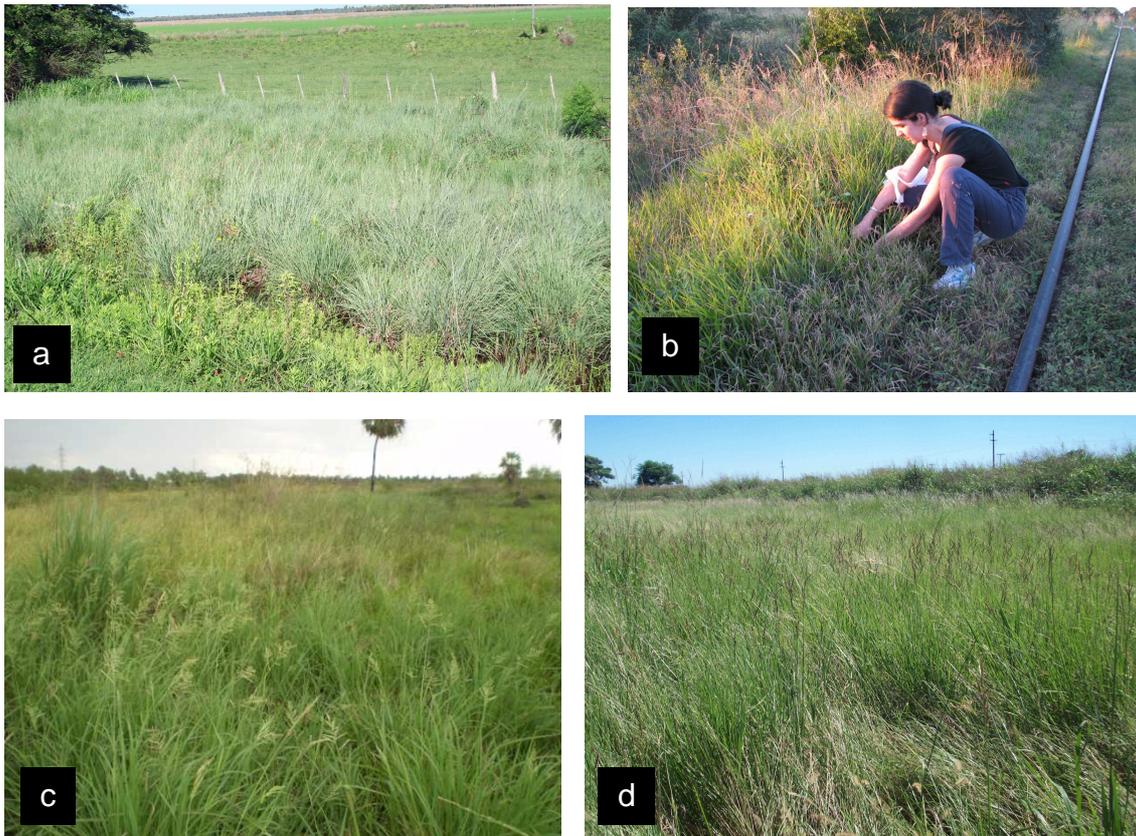
MS, María Sartor; Q, Quarin

Esta información fue utilizada para construir los mapas de distribución de cada especie, utilizando el programa DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2004. Este programa puede ser empleado para mapear y analizar datos de distribución biológica generalmente referidos a localizaciones donde se han observado, o quizás colectado diferentes ejemplares. El programa permite importar bases de datos de colecciones utilizando los datos de latitud y longitud.

IV.2.- Muestreo de las poblaciones

Las colecciones se realizaron durante los veranos de 2006/07, 2007/08 y 2008/09. De cada población se tomaron entre 30 y 100 trozos de rizomas de distintas plantas individuales. Estas muestras fueron coleccionadas por lo menos a 10 m de distancia entre ellas, para evitar tomar dos muestras de un mismo individuo. En general, las colectas se realizaron sobre los bordes de caminos, rutas y vías férreas, ya que en estos lugares es donde aún se mantiene la vegetación natural (Fig. 1).

Figura 1. Vista de algunas de las poblaciones naturales coleccionadas: a) Población R6 de *Paspalum rufum*; b) Población U1 de *P. unispicatum*; c) Población D1 de *P. denticulatum*; d) Población A3 de *P. buckleyanum*.



Las plantas colectadas fueron luego trasplantadas a macetas y mantenidas bajo invernáculo hasta completar la determinación del nivel de ploidía de cada una de ellas. Adicionalmente, en algunas poblaciones se cosecharon semillas maduras de unas 10 plantas tomadas al azar, las que fueron utilizadas para determinar el modo de reproducción. De cada colección se realizaron ejemplares de herbario, los que fueron estudiados para confirmar la identificación de las especies y luego fueron depositados en el herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES).

IV.3.- Determinación del nivel de ploidía

Para establecer el nivel de ploidía de cada uno de los individuos de las 22 poblaciones analizadas, se determinó el contenido relativo de ADN utilizando la técnica de citometría de flujo. Esta técnica es extensamente utilizada en investigación básica y aplicada. El principio básico involucra el análisis de la fluorescencia y de las propiedades de dispersión de la luz de una solución con partículas individuales (células, núcleos, cromosomas, etc.) durante su pasaje a través de un estrecho y preciso canal. Debido a que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN presente en las células (Heslop-Harrison & Schwarzacher 1996), la citometría de flujo permite estimar el nivel de ploidía de un individuo determinado, transformándose en un recurso de alto rendimiento que permite el análisis de un gran número de plantas en poco tiempo.

El citómetro de flujo que se utilizó en este estudio pertenece a la marca Partec PAII (Partec GmbH, Münster, Germany). Para la preparación de las muestras se utilizó el kit de extracción y tinción CyStain UV Precise P (marca Partec), manejando el protocolo descrito por el fabricante. Aproximadamente 0,5 cm² de tejido foliar fresco fue colocado en una caja de Petri junto con una cantidad similar de hoja del material usado como patrón. Luego se adicionó 0,5

mL del buffer de extracción de núcleos y se trituró finamente el material con una hoja de afeitar. Pasado 1 minuto de incubación la muestra fue filtrada a través de una malla de 50 μm y luego se adicionó 1,5 mL de buffer de tinción con DAPI (4'-6-diamidino-2 fenilindol). Esta mezcla fue incubada durante 1 minuto y luego fue analizada a través del citómetro de flujo con el detector operando a 350 nm. El nivel de ploidía de cada planta fue estimado en relación al pico de ADN de una planta utilizada como patrón de referencia. Para cada población se tomó como estándar una planta de la misma especie, cuyo nivel de ploidía fue previamente determinado a través de recuentos cromosómicos en puntas de raíces. Las plantas seleccionadas como patrón fueron tomadas en algunos casos de las poblaciones colectadas durante el desarrollo de esta tesis y en otros se utilizaron genotipos de colecciones previas que se encuentran conservados en el banco de germoplasma del IBONE. Adicionalmente, se realizaron recuentos cromosómicos en plantas representativas de cada población para confirmar los datos obtenidos por citometría de flujo.

Para realizar los recuentos cromosómicos se extrajeron 3 o 4 raicillas nuevas de las plantas criadas en maceta y se pretrataron durante 2 horas con una solución saturada de α -bromonaftaleno, sin fijación previa se hidrolizaron en HCl 1000 mol. m^{-3} a 60°C durante 10 minutos y se colorearon con una solución de fucsina básica 20 mol m^{-3} . El aplastado se hizo con una gota de orceína acética al 2% y la observación se realizó con un microscopio óptico LEICA.

IV.4.- Análisis del modo reproductivo

El modo reproductivo de cada población fue estimado por citometría de flujo de acuerdo a la metodología descrita por Matzk *et al.* (2000). El análisis de semillas por citometría de flujo permite discriminar aquellas semillas originadas por sexualidad de las que fueron originadas vía apomixis mediante la comparación del contenido de ADN del embrión con el ADN del endospermo.

Asumiendo que el valor C_x se refiere al contenido de ADN nuclear de un complemento cromosómico monoploide (la letra x representa el número básico de cromosomas) de una planta y contando con la ventaja que nos proporciona la citometría de flujo para cuantificar el contenido de ADN de los tejidos del embrión y del endospermo de semillas maduras, es posible establecer el modo reproductivo de una planta (en particular de las especies del género *Paspalum*) determinando el origen de las semillas que produce esta planta en particular.

Inicialmente, entre 6 y 10 individuos por población fueron seleccionados al azar para determinar el modo de reproducción. Para cada una de las plantas seleccionadas, se analizó un grupo de 10 cariopses. Los histogramas presentan en general dos picos principales, los cuales representan el contenido de ADN del embrión y el endospermo. Una planta en particular puede generar descendientes exclusivamente por sexualidad, es decir, semillas de origen no materno generadas a partir de sacos embrionarios meióticos (embrión = $n + n$; endospermo = $n + n + n$). Sin embargo, la relación entre el contenido de ADN del embrión y endospermo es diferente cuando el genotipo analizado produce descendientes vía apomixis, es decir semillas de origen materno generadas a partir de sacos embrionarios apospóricos (embrión = $2n + 0$; endospermo = $2n + 2n + n$). También es posible que el genotipo analizado produzca descendencia por la vía sexual y por apomixis, por lo que en estos casos se observarían tres picos principales: uno de ellos representando el contenido de ADN de los embriones tanto de origen materno ($2n + 0$) como no materno ($n + n$) con un mismo nivel de ploidía y los otros dos picos correspondientes al contenido de ADN del endospermo de las semillas de origen materno ($2n + 2n + n$) y no materno ($n + n + n$). Este tipo de histogramas estaría indicando que este individuo se reproduce por apomixis facultativa y que produce sacos embrionarios meióticos y sacos embrionarios apospóricos. En aquellos casos donde se presentaron este tipo de histogramas, se realizó el estudio adicional de 2 individuos de la población analizando individualmente 20 semillas de cada

uno. A partir de este análisis de semillas individuales es posible determinar si los individuos estudiados producen híbridos B_{III}. Esta clase de híbridos se origina cuando un saco embrionario no reducido (2n) es fecundado, generando un aumento en el nivel de ploidía del individuo con respecto al progenitor femenino.

Por otra parte, en los histogramas obtenidos del análisis por citometría de flujo, suelen observarse picos adicionales que representan el contenido de ADN de las células del tejido embrionario y endospermático que se encuentran en un estado G2 del ciclo celular, es decir que el ADN se encuentra replicado en esas células.

Para el análisis del modo reproductivo, se separaron 10 cariopses de las espiguillas y fueron finamente picados en 0,5 mL de un buffer de extracción de núcleos. Luego, la suspensión de núcleos fue filtrada utilizando un filtro de 30 µm y transferida a un tubo en el cual se adicionó 1,5 mL del buffer de tinción con DAPI. Los buffers de extracción y tinción están incluidos en el kit comercial CyStain UV Precise P (marca Partec). La muestra fue examinada a través del citómetro de flujo y los datos fueron analizados con el paquete informático FloMax proporcionado por el mismo fabricante. El análisis de semillas individuales, se realizó utilizando la misma metodología pero procesando en este caso un cariopse por muestra.

IV.5.- *Determinación de la variabilidad genética*

Para determinar en nivel de variabilidad genética de cada una de las poblaciones estudiadas se analizaron cerca de 30 individuos por población mediante marcadores moleculares del tipo AFLP.

IV.5.1.- Extracción de ADN

A partir de hojas frescas se realizaron microextracciones de ADN genómico utilizando el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983), con las modificaciones realizadas por Ortiz *et al.* (1997).

Microextracciones

Se cosecharon entre 0,2 y 0,4 gramos de hojas frescas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Luego fueron molidas en presencia de nitrógeno con mortero y pilón de porcelana. El polvo obtenido se colectó en tubos Eppendorf de 2 mL y se agregó 1,3 mL de buffer de extracción [Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), EDTA 50 mM (pH 8), NaCl 500 mM, SDS 2% y polivinilpirrolidona PM 360.000 1%] previamente calentado a 68 °C y al que se le adicionaron 100 µL de β-mercaptoetanol por cada 10 mL de buffer. Las muestras se incubaron durante 7 minutos a 68 °C. Luego se agregaron 250 µL de acetato de potasio 5M y se incubaron en hielo entre 1 y 2 horas. Los tubos se sometieron a 20 minutos de centrifugación a 10000 rpm en centrifuga Eppendorf a 4 °C. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL limpio, se agregó 1 mL de isopropanol frío. Esta mezcla se mantuvo durante toda la noche a -20 °C. Luego los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 10000 rpm a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes, se secaron los pellets y se resuspendieron en 250 µL de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8) y EDTA 1 mM (pH 8)]. Los tubos se agitaron durante una hora para disolver los pellets. Luego se realizó un tratamiento con 1 µL de ARNasa (10mg/mL) durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Cada muestra se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL, donde recibieron un tratamiento con fenol/cloroformo, donde se agregaron 125 µL de fenol y 125 µL de cloroformo. Los tubos fueron agitados por inversión y se centrifugaron a 14000 rpm. Se transfirieron 150 µL de la fase superior a tubos limpios y se agregó 10 µL de

NaCl 5 M y 500 μ L de etanol absoluto. Esta mezcla se mantuvo toda la noche a -20 °C. Luego las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 70%. Las muestras nuevamente se centrifugaron 14000 rpm 10 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante y las muestras se secaron en estufa a 37 °C. Una vez secas se resuspendieron en 25 μ L agua ultrapura estéril.

Concentración y Calidad de ADN

La concentración de ADN se estimó utilizando un espectrofotómetro (SmartSpec 3000 de BioRad) mediante mediciones de absorbancia a 260 nm (Sambrook *et al.* 1989). Una vez determinada la concentración, se realizaron diluciones para uniformar la concentración en 300 ng/ μ L. La calidad del ADN se evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TAE 1X [Tris-acético 40 mM y EDTA 1 mM (pH 8)]. Se sembraron aproximadamente 300 ng de muestra con buffer de siembra 1X (azul de bromofenol 0,25 %, xilenol 0,25% y glicerol 30%). La electroforesis se llevo a cabo a 70V durante aproximadamente 2 horas, momento en el cual el frente de corrida alcanzó las tres cuartas partes del gel. Luego se realizó la tinción sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) por 30 minutos aproximadamente. Se determinó la calidad del ADN visualizando el gel en el transiluminador de luz ultravioleta.

IV.5.2.- Marcadores moleculares del tipo AFLP

Para llevar a cabo el estudio con AFLP se utilizó la técnica descrita por Vos *et al.* (1995), con modificaciones que se detallan a continuación.

Digestión

La digestión del ADN se realizó utilizando simultáneamente dos enzimas de restricción: *EcoRI* y *MseI*. Para realizar la digestión se seleccionó el buffer OPA 5X [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), Acetato de Magnesio 10 mM, Acetato de potasio 50 mM], que es compatible para ambas enzimas y para T4 DNA ligasa.

La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L conteniendo la mezcla de reacción que se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes de mezcla de digestión *EcoRI-MseI*.

Componentes	Concentración final
Buffer OPA	1X
DTT	5 mM
<i>EcoRI</i>	5 unidades
<i>MseI</i>	5 unidades
ADN	1 μ g

La reacción se llevo a cabo a 37 °C durante 4 horas y luego se detuvo colocando los tubos en baño maría a 72 °C durante 10 minutos.

Generación de adaptadores

Los adaptadores utilizados se prepararon utilizando oligonucleótidos de cadena simple sintetizados por la Universidad de British Columbia. Para obtener adaptadores de doble cadena se mezclaron en tubos de PCR 10 μ g de los oligonucleótidos *EcoRI* "forward" (5'-CTC GTG ACT GCG TAC C-3') y "reverse" (5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3') y 10 μ g de los oligonucleótidos *MseI* "forward" (5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') y "reverse" (5'-TAC TCA GGA CTC ATC-3'). Las mezclas se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y luego a temperatura ambiente durante 30 minutos. Ambos adaptadores se diluyeron a 50 pM/ μ L. Los adaptadores *EcoRI* fueron diluidos nuevamente 1:10 para llevarlos a una concentración final de 5pM/ μ L.

Adaptador EcoRI: 5'-CTCGTGACTGCGTACC-3'

3'-CTGACGCATGGTTAA-5'

Adaptador MseI: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Ligación de adaptadores

La ligación de los adaptadores *EcoRI* y *MseI* se realizó en el mismo tubo donde se llevó a cabo la reacción de digestión. A cada tubo se agregaron 7,5 μ L de solución de ligación de adaptadores (ATP 1mM, buffer OPA 1X, DTT 5mM, BSA 50 ng / μ L), 5 pMoles de adaptador *EcoRI*, 50 pMoles de adaptador *MseI* y 5 unidades de T4 DNA ligasa. Las muestras se incubaron a 37° C durante 4 horas. Una vez finalizado el periodo de incubación las muestras se conservaron a -20 °C.

Amplificaciones

Para todas las reacciones de amplificación se utilizaron como cebadores oligonucleótidos sintetizados por la Universidad de British Columbia y la enzima polimerasa GoTaq® DNA de Promega.

Preamplificaciones

Las reacciones de preamplificación se llevaron a cabo utilizando como templado el producto de la ligación y como cebadores los oligonucleótidos E01 (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3') y M01 (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AA-3'), los cuales son complementarios a los adaptadores *EcoRI* y *MseI*, respectivamente. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ L con los componentes que se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de mezcla de preamplificación.

Componentes	Concentración final por tubo
Producto de ligación	2 μ l
dNTP's	1,2 ng/ μ l
Cebador E01	30 ng
Cebador M01	30 ng
Go Taq	1 unidad
Buffer	1X

Las reacciones de preamplificación se llevaron a cabo en un termociclador Biometra UNO programado como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Esquema de ciclado de preamplificaciones.

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1 ciclo	94 °C	60 s
20 ciclos	94 °C	30 s
	56 °C	60 s
	72 °C	60 s
1 ciclo	72 °C	120 s

Amplificaciones selectivas

Las amplificaciones selectivas se llevaron a cabo utilizando como templado una dilución 1:10 del producto de preamplificación y como cebadores se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores E y M las cuales se indican en la Tabla 5. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L, conteniendo 2 μ L de la dilución 1:10 del producto de preamplificación, 1,2 ng/ μ L de dNTP's, 30 ng de cada uno de los cebadores E y M, 1 unidad de DNA polimerasa Go Taq (Promega), 1X del buffer de la enzima Go Taq.

Tabla 5. Combinaciones de cebadores E y M ensayadas para las amplificaciones selectivas de AFLP.

Combinación de cebadores	Secuencia de cebadores
E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA A-3'
E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
M36	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC A-3'
E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
M40	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG T-3'
E36	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC C-3'
M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC A-3'
E36	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC C-3'
M36	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG A-3'
E36	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC C-3'
M40	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC AC-3'
E37	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC G-3'
M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA C-3'
E37	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC G-3'
M36	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG C-3'
E37	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'
M40	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA C-3'
E38	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'
M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA G-3'
E38	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'
M36	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG C-3'
E38	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'
M40	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC AT-3'

E40	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG C-3'
M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA T-3'
E40	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG C-3'
M36	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG C-3'
E40	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG G-3'
M40	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC TC-3'

Las amplificaciones selectivas se realizaron en un termociclador Biometra UNO, siguiendo las condiciones indicadas en Vos *et al.* (1995). El programa de amplificación constó de 36 ciclos y se indica en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa de ciclado utilizado en las amplificaciones selectivas.

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1	94 °C	30 s
	65 °C	30s
	72 °C	30s
2 a 13	94 °C	30 s
	64 °C	30 s
	72 °C	30 s
Disminución de la temperatura en 0,7 °C por ciclo durante 12 ciclos		
14 a 36	94 °C	30 s
	56 °C	30 s
	72 °C	60 s

IV.5.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los marcadores moleculares de AFLP se resolvieron en geles de poliacrilamida al 6% [acrilamida:bisacrilamida (38:2); urea 7M, buffer TBE 0,5X] de 0,4 mm de espesor. Antes de realizar la siembra se adicionó, a cada muestra el buffer de siembra 1X (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%,

formamida 95% y NaOH 10 mM) y luego fueron desnaturalizadas a 95° C durante 5 minutos y colocadas inmediatamente en hielo. La electroforesis se realizó en una cuba vertical TVS1400/FHS-Kit, de 41 x 33 cm (marca Scie-Plas) utilizando para el reservorio inferior buffer TBE 1X y en el superior buffer TBE 0,5 X. Antes de realizar la siembra se realizó una pre-corrída del gel a una potencia constante de 60W por aproximadamente 1 hora, hasta alcanzar una temperatura de 50°C. Una vez pre-corrído el gel se sembraron 6 µL de las muestras desnaturalizadas. Para estimar el peso molecular de las bandas se utilizó el marcador de peso molecular CienMarker (Biodynamics). La corrida electroforética se llevó a cabo a una potencia constante de 60W por aproximadamente 1 hora y 30 minutos, utilizando una fuente de poder marca Consort, modelo EV233.

Para visualizar los fragmentos de ADN, los geles fueron teñidos con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito en el manual técnico de Promega "DNA Silver Staining System". Este protocolo consiste en una fijación en ácido acético al 10% durante 20 minutos, seguida de 3 lavados con agua bidestilada durante 2 minutos y un proceso de tinción con nitrato de plata al 0,1% y formaldehído 1,5 mL/litro de solución durante 30 minutos. Luego del paso de la tinción se realiza un lavado con agua bidestilada fría durante 5-10 segundos y posteriormente se revela con una solución desarrolladora (carbonato de sodio 3%, formaldehído 1,5 mL/litro y 2 mg/litro de tiosulfato de sodio). El gel se sumerge en esta solución y se agita lentamente hasta observar la coloración deseada. El revelado se detiene con ácido acético al 10% y luego se enjuaga el gel con agua bidestilada. Los geles se dejaron secar a temperatura ambiente.

IV.6.- Análisis de datos

Los geles fueron analizados en un transiluminador de luz blanca. Se realizó el registro de los patrones electroforéticos obtenidos para los AFLP mediante el

sistema de presencia (1) o ausencia (0) de bandas. Los datos fueron cargados en tablas del programa Microsoft Excel y luego se construyeron matrices que fueron procesadas por los programas InfoStat (2002) y GenAIEx (Peakall & Smouse 2006).

IV.7.- Análisis de la variabilidad genética

Para el estudio de la variación genética de cada población se determinó el coeficiente de variación de todos los valores del coeficiente de Jaccard de la población utilizando el programa InfoStat. El coeficiente de similitud para pares de individuos Jaccard (1908), calculado también con el programa InfoStat, se obtiene a partir de $J' = a/[a+b+c]$, donde a es el número de marcadores en común entre los individuos, b es el número de marcadores pertenecientes al primer individuo y ausentes en el segundo y c es el número de marcadores presentes en el segundo y ausentes en el primero). Este coeficiente toma valores entre 0 (cuando los individuos no presentan ningún marcador en común) y 1 (que significa que todos los marcadores analizados están presentes en todos los individuos analizados, o sea que dichos individuos son clones). Se eligió el coeficiente de Jaccard por considerar al mismo el más consistente y conservador, ya que no tiene en cuenta la ausencia de banda como una similitud entre dos individuos (Campbell *et al.* 1999). Adicionalmente se calculó el coeficiente de variación (CV) de los coeficientes de similitud, el cual representate un indicador global de la variabilidad genética de una población independientemente de los genotipos estudiados (Nieto-López 2000).

El programa GenAIEx se utilizó para calcular el porcentaje de alelos polimórficos (un alelo o marcador se consideró polimórfico cuando presenta presencias y ausencias dentro de la población con una frecuencia mayor al 1%) y la relación genética total entre los individuos, evaluada a partir del análisis de coordenadas principales (en inglés Principal Coordinates Analysis, PCoA),

basado en la matriz de distancia genética y trazando la relación entre los individuos según sus dos primeras coordenadas principales.

En algunos casos se realizó una diferenciación entre citotipos y entre poblaciones mediante la determinación del número de alelos privados (alelos o marcadores presentes en un citotipo o población y ausente en los restantes) y mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA).

IV.8.- Análisis de la variabilidad genotípica

La variación genotípica dentro de las poblaciones se estimó siguiendo los métodos de Ellstrand & Roose (1987), usados comúnmente para plantas clonales: cada genotipo fue establecido a partir del patrón de bandeo completo de cada individuo. Un individuo se consideró un genotipo distinto cuando presentó diferencias en al menos un marcador con respecto a cada uno de los individuos de su población. El número de genotipos multilocus distinguibles en cada población se denominó G. La proporción de genotipos multilocus distinguibles se calculó como G/N donde N es el número de individuos analizados en cada población. La diversidad de genotipos multilocus (D) se determinó como el índice de Gini en la versión corregida por Pielou (1969), $D = 1 - \sum [n_i (n_i - 1)] / [N (N - 1)]$ donde n_i es el número de individuos presentando el genotipo i , con i variando entre 1 y G. La uniformidad genotípica (E) se calculó como $E = [D_{obs} - D_{mín}] / [D_{máx} - D_{mín}]$, donde D_{obs} es la diversidad de genotipos multilocus observado, $D_{mín} = [(G-1)(2N-G)] / [N(N-1)]$ y $D_{máx} = [N(G-1)] / [G(N-1)]$. Los valores de D y E varían entre 0 (cuando la población consta de un único genotipo) a 1 (cuando cada individuo de la población presenta un genotipo diferente).

IV.9. Determinación del contenido absoluto de ADN

Para determinar el tamaño del genoma de los distintos citotipos detectados en cada una de las seis especies en estudio, se estimó el contenido absoluto de ADN, utilizando ioduro de propidio para la tinción de las muestras. Este colorante es recomendado por Dôlezel & Bartoš (2005) para determinar tamaño de genoma, ya que a diferencia del DAPI (fluorocromo que se une a las regiones ricas en A-T del genoma) el ioduro de propidio se intercala a lo largo de toda la cadena de ADN y permite inferir con mayor exactitud el contenido absoluto de ADN.

Para la preparación de las muestras se utilizó el kit de extracción y tinción CyStain PI Absolute P, marca Partec. Aproximadamente 0,5 cm² de tejido foliar fresco fueron colocados en una caja de Petri junto con una cantidad similar de hoja del material usado como estándar. Luego se adicionó 0,5 mL del buffer de extracción y se molió finamente el material con una hoja de afeitar. Pasado 1 minuto de incubación la muestra fue filtrada a través de una malla de 50 µm y luego se adicionó 1,5 mL de buffer de tinción con Ioduro de Propidio. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos y luego fueron analizadas a través del citómetro de flujo (Partec PAII) con el detector operando a 480 nm.

Paspalum dilatatum ssp. flavescens, Q3952 (4x = 2C = 2,43pg) y *Paspalum intermedium*, Sch28857 (2x = 2C =1,51 pg) fueron utilizados como estándares de referencia interna. El contenido absoluto de ADN de la introducción Q3952 fue determinado por Vaio *et al.* (2007) y a partir del mismo se estimó el contenido absoluto de la introducción Sch28857 para emplear la misma como un estándar de menor tamaño de genoma. Al menos tres mediciones fueron realizadas para cada citotipo. El contenido absoluto de ADN nuclear fue calculado como: (valor medio de la intensidad de fluorescencia de la muestra/valor medio de intensidad de fluorescencia del estándar) x contenido de ADN del estándar (pg).

V.- RESULTADOS

V.- RESULTADOS

V.1.- Niveles de ploidía

A través del uso de la técnica de citometría de flujo se determinó el nivel de ploidía de 1351 individuos pertenecientes a 22 poblaciones naturales (Tabla 7). Todos los niveles de ploidía detectados fueron confirmados a partir de recuentos cromosómicos en puntas de raíces.

En base a los resultados de este estudio y a los antecedentes bibliográficos en los cuales se pudo constatar el nivel de ploidía y el origen del material, se estableció la distribución de los citotipos identificados para cada una de las especies.

Tabla 7. Identificación y nivel de ploidía revelado por citometría de flujo de los individuos de distintas poblaciones de 6 especies de *Paspalum*.

Especie	Población	Nº de plantas analizadas	Número de individuos con					
			2x	3x	4x	5x	6x	7x
<i>P. buckleyanum</i>	A1	57				48	8	1*
	A2	10					10	
	A3	64					64	
	A4	35					35	
<i>P. denticulatum</i>	D1	60			60			
	D2	73			73			
	D3	52	42	2*	8			
<i>P. lividum</i>	L1	63			63			
	L2	72			72			
	L3	44			44			
<i>P. nicorae</i>	N1	88			88			
	N2	84			84			
	N3	90			90			
<i>P. rufum</i>	R1	74	1		73			
	R2	83	83					
	R3	70	15		55			
	R4	62			62			
	R5	45	45					
	R6	61	61					
<i>P. unispicatum</i>	U1	68	68					
	U2	29		25	4			
	U3	67			67			

*Son nuevos niveles de ploidía hallados.

En el caso de *P. buckleyanum*, los datos cromosómicos registrados por otros autores permitieron identificar y localizar dentro del área de distribución de la especie citotipos diploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides (Fig. 1a). De las cuatro poblaciones analizadas en este estudio, tres (A2, A3 y A4) presentaron exclusivamente individuos hexaploides. Por el contrario, en la población A1, se detectaron individuos con 3 niveles diferentes de ploidía. De las 57 plantas muestreadas en la población A1, el 84,2% resultó ser pentaploide, el 14% fueron hexaploides y una planta (1,8%) fue heptaploide (Fig. 1b). En ninguna de las poblaciones estudiadas se detectaron citotipos diploides y/o tetraploides, a pesar de haber realizado algunas de las colectas en sitios donde estas razas habían sido citadas. Por esta razón, se realizó un viaje de colección adicional con el objeto de ampliar la búsqueda de estas razas dentro del área de distribución de la especie. A partir de esta nueva colección se estimó el nivel de ploidía de 45 nuevos individuos correspondientes a 11 localidades de las provincias de Santa Fe, Santiago del Estero y Chaco. Nuevamente, los citotipos que se encontraron fueron pentaploides y hexaploides. En cuatro de las localidades solo se encontraron plantas pentaploides, otras seis localidades presentaron únicamente plantas hexaploides y en una de las localidades se identificaron individuos de ambos niveles de ploidía (Tabla 8).

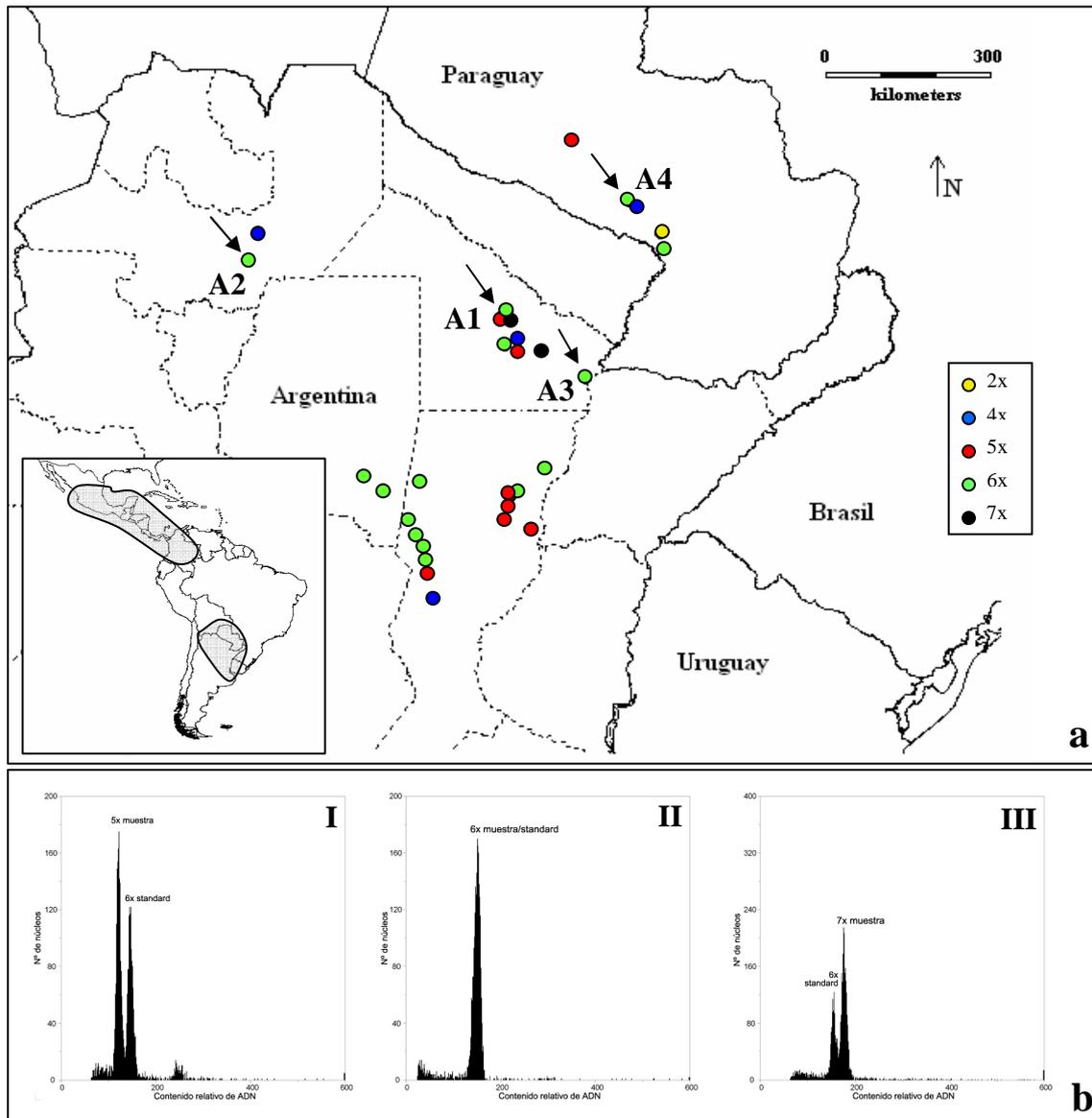


Figura 1 a) Distribución geográfica de *Paspalum buckleyanum* y sus distintos citotipos; las flechas indican la localización de las poblaciones analizadas en este estudio. **b)** Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo a partir de hojas frescas. **I)** una planta pentaploide ($2n = 5x = 50$); **II)** una planta hexaploide ($2n = 6x = 60$); **III)** una planta heptaploide ($2n = 7x = 70$).

Tabla 8. Identificación y nivel de ploidía revelado por citometría de flujo de los individuos coleccionados en distintas poblaciones de *Paspalum buckleyanum*.

Introducción	Lugar de colección	Nº de plantas analizadas	Número de individuos con	
			5x	6x
MS27	1,5 Km norte de Acceso a Vera. Santa Fe, Argentina	6	2	4
MS28	7,5 Km norte de acceso a Margarita. Santa Fe, Argentina	6	6	
MS30	Acceso a Calchaquí. Santa Fe, Argentina	6	6	
MS32	Acceso a San Justo. Santa Fe, Argentina.	6	6	
MS33	6 Km sur de Palacios. Santa Fe, Argentina	2		2
MS36	5,5 Km norte de Las Palmeras. Santa Fe. Argentina	4		4
MS37	3 Km norte de Curupaity. Santa Fe, Argentina	6		6
MS38	5 Km norte de Arrufo. Santa Fe, Argentina	3		3
MS41	Acceso a Malbrán. Santiago del Estero. Argentina	2		2
MS44	1 Km norte acceso a Pinto. Santiago del Estero, Argentina	2		2
MS46	4,5 Km norte de acceso a Quitilipi. Chaco, Argentina	2		2

MS, María Sartor

Para *P. denticulatum*, el único citotipo que se encontró descripto a partir de recuentos cromosómicos existentes en plantas individuales fue el tetraploide (Fig. 2a). De manera similar, todos los individuos analizados para 2 de las poblaciones analizadas en este estudio (D1 y D2) fueron tetraploides. Sin embargo, entre las 52 plantas de la población D3, se detectaron citotipos diploides (80,77%), triploides (3,85%) y tetraploides (15,38%) (Fig. 2b). Este es el primer reporte de una raza triploide para esta especie.

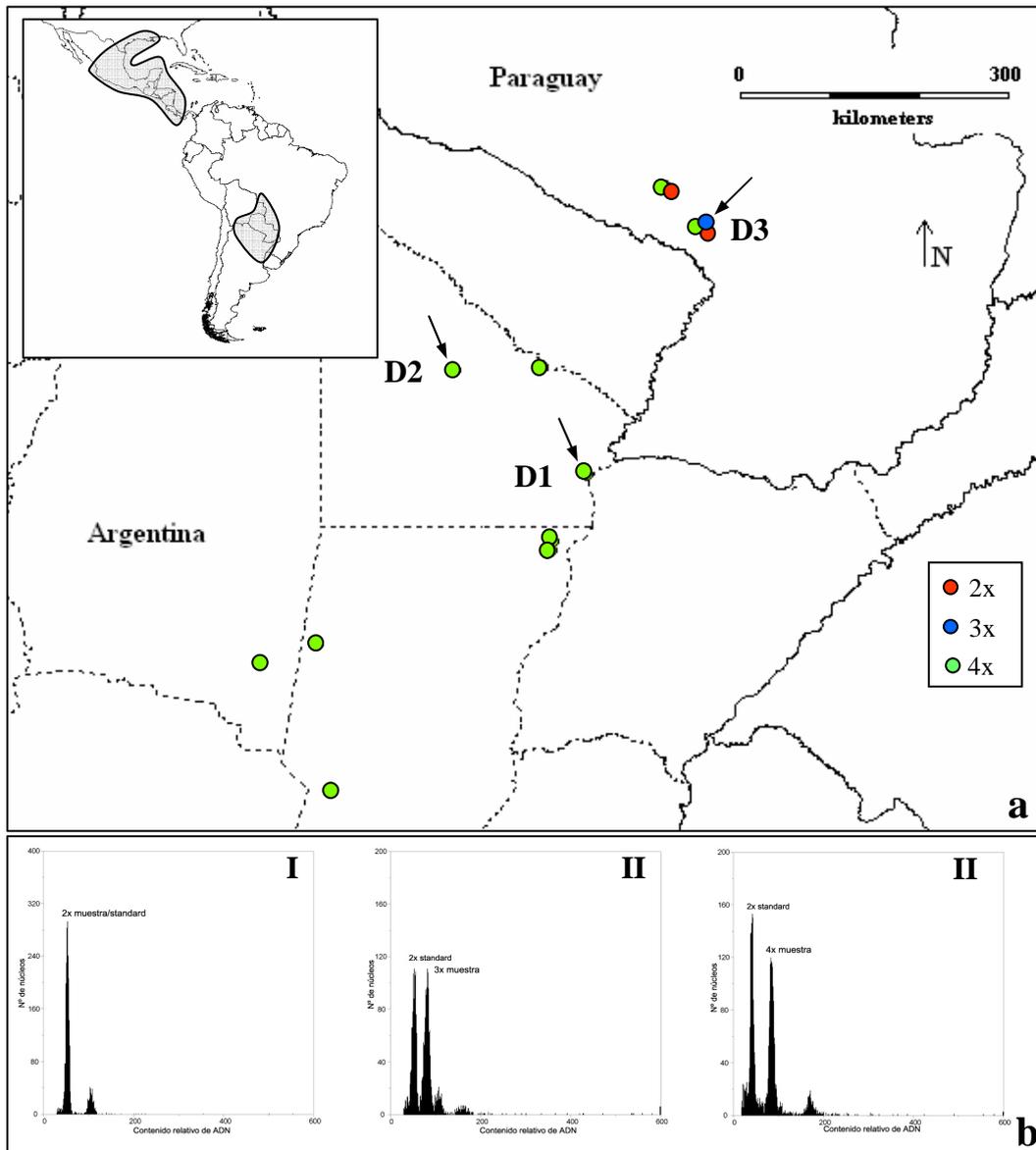


Figura 2 a) Distribución geográfica de *Paspalum denticulatum* y sus distintos citotipos; las flechas indican la localización de las poblaciones estudiadas. **b)** Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo a partir de hojas frescas: **I)** una planta diploide ($2n = 2x = 20$); **II)** una planta triploide ($2n = 3x = 30$); **III)** una planta tetraploide ($2n = 4x = 40$).

Los datos bibliográficos recopilados para *P. lividum* indicaron la presencia de citotipos tetraploides desde Estados Unidos hasta Argentina (Fig. 3a). Del mismo modo, entre las 179 plantas analizadas en este estudio y que correspondieron a tres poblaciones diferentes, el único citotipo que se encontró fue el tetraploide (Fig. 3b).

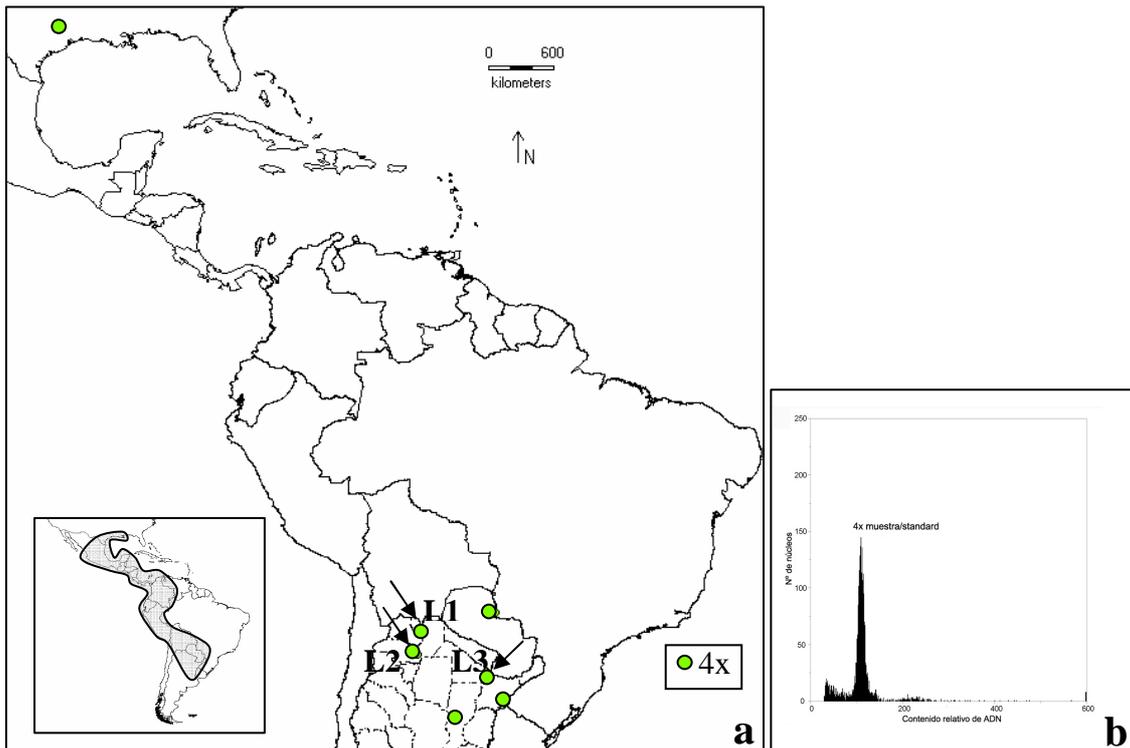


Figura 3 a) Distribución geográfica de *Paspalum lividum*; las flechas indican la localización de las poblaciones estudiadas. **b)** Histograma de contenido de ADN obtenido por citometría de flujo a partir de hojas frescas de una planta tetraploide ($2n = 4x = 40$).

Al igual que la especie anterior, el nivel de ploidía registrado previamente para *P. nicorae* y para los individuos de las tres poblaciones aquí estudiadas fue el tetraploide (Fig. 4a). Los histogramas obtenidos por citometría de flujo para las 262 plantas analizadas en este estudio, fueron similares al mostrado en la Figura 4b, indicando que todas fueron tetraploides.

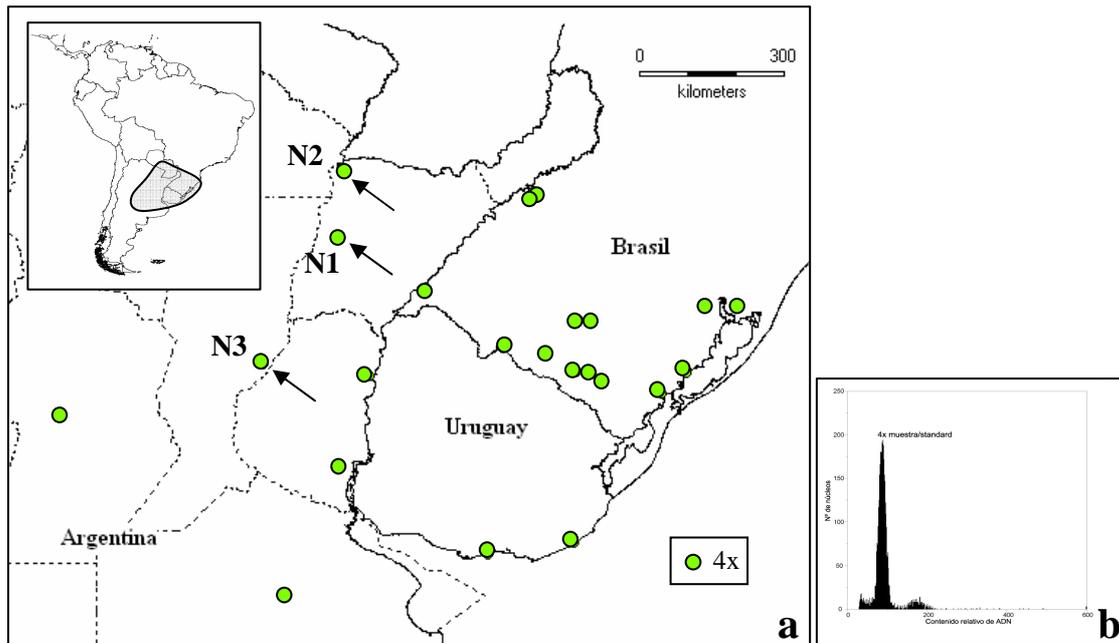


Figura 4 a) Distribución geográfica de *Paspalum nicorae*; las flechas indican la localización de las poblaciones estudiadas. **b)** Histograma de contenido de ADN obtenido por citometría de flujo a partir de hojas frescas indicando una planta tetraploide ($2n = 4x = 40$).

Por otra parte, la revisión de datos para *P. rufum* mostró que el 61% de los introducciones estudiadas por otros autores fueron diploides. También se registraron razas tetraploides que se localizaron al sur del área de distribución de los citotipos diploides (Fig. 5a). De las 6 poblaciones que se estudiaron en esta investigación, tres (R2, R5 y R6) estuvieron conformadas solamente por individuos diploides, mientras que otra (R4) presentó exclusivamente individuos tetraploides (Fig. 5b). Las otras dos poblaciones restantes (R1 y R3) fueron mixtas y en ellas se identificaron citotipos diploides y tetraploides, siendo el nivel tetraploide el que predominó en ambas poblaciones. La frecuencia de los individuos diploides alcanzó el 1,3% en la población R1 y el 21,4% en la población R3. En ninguna de las poblaciones de *P. rufum* se pudo constatar la existencia de individuos triploides.

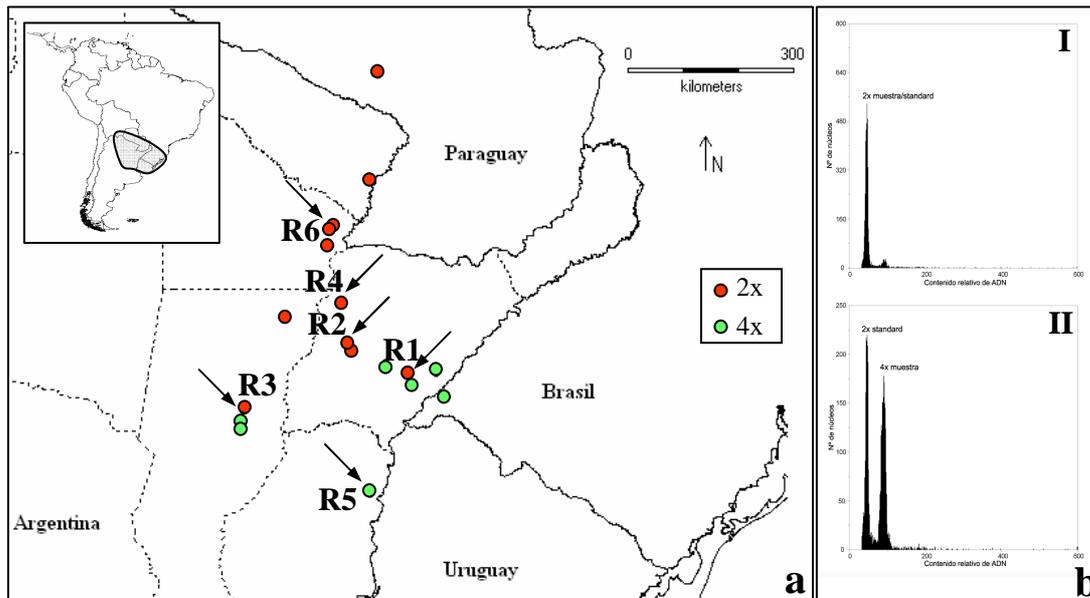


Figura 5 a) Distribución geográfica de *Paspalum rufum* y sus distintos citotipos; las flechas indican la localización de las poblaciones estudiadas. **b)** Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo a partir de hojas frescas: **I)** una planta diploide ($2n = 2x = 20$); **II)** una planta tetraploide ($2n = 4x = 40$).

En los registros de nivel de ploidía existentes para *P. unispicatum* se localizaron razas diploides, triploides y tetraploides, siendo el nivel tetraploide el más frecuentemente encontrado (Fig. 6a). De las tres poblaciones que fueron analizadas en este estudio, la población U1 (68 individuos) presentó solo plantas diploides; mientras que la población U3 (67 individuos) estuvo conformada exclusivamente por plantas tetraploides. En la población U2 sin embargo, se encontraron 25 plantas triploides (86,2%) y 4 plantas tetraploides (13,8%). En la Figura 5b pueden observarse ejemplos de histogramas obtenidos por citometría de flujo para cada uno de los niveles de ploidía detectados.

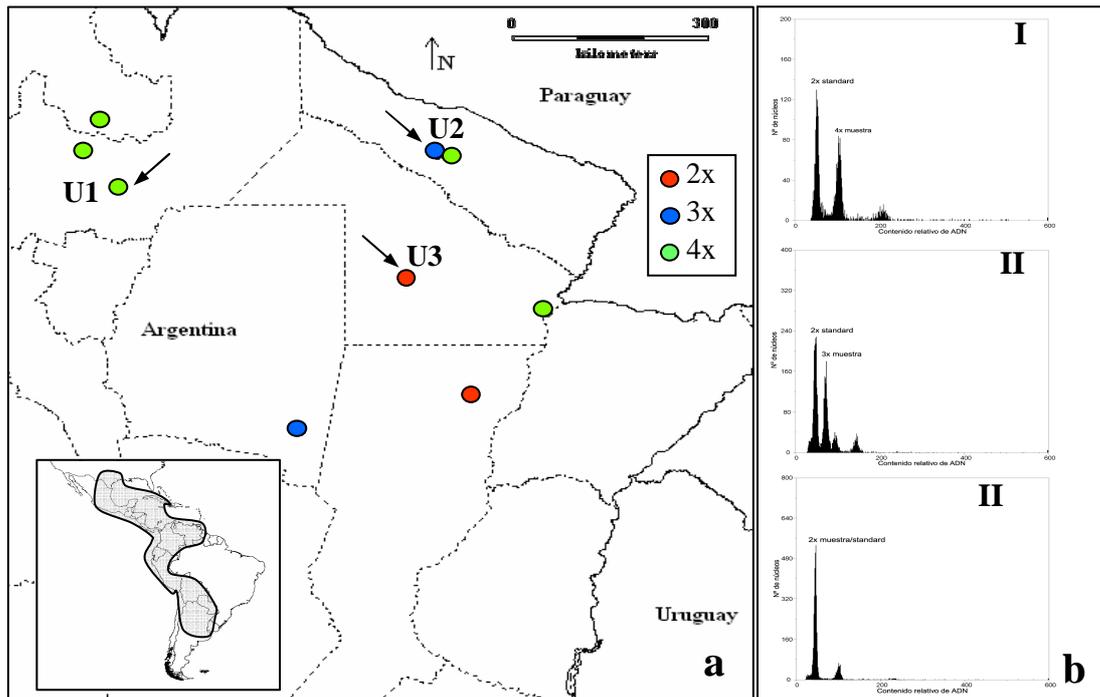


Figura 6 a) Distribución geográfica de *Paspalum unispicatum* y sus distintos citotipos; las flechas indican la localización de las poblaciones estudiadas. **b)** Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo a partir de hojas frescas: **I)** una planta diploide ($2n = 2x = 20$); **II)** una planta triploide ($2n = 3x = 30$); **III)** una planta tetraploide ($2n = 4x = 40$).

V.2.- Sistemas reproductivos

La clasificación del modo reproductivo de los individuos de las diferentes poblaciones se realizó mediante el análisis del contenido relativo de ADN del embrión y del endospermo de semillas maduras, estimado por citometría de flujo. Esta clasificación involucró el estudio de muestras constituidas por grupos de 10 semillas para cada una de las 10 plantas seleccionadas al azar en cada población (Tabla 9).

Los resultados indicaron que los individuos pentaploides y hexaploides de las poblaciones de *Paspalum buckleyanum* se reproducen por apomixis. Todos los histogramas generados mostraron por lo menos dos picos principales, los que corresponden al contenido de ADN del embrión y del endospermo y cuya relación es $5Cx : 12Cx$ y $6Cx : 15Cx$ respectivamente (Fig. 7a y 7b). En las especies apomícticas de *Paspalum*, el saco apospórico usualmente contiene cuatro células y cinco núcleos no reducidos ($2n$): una ovocélula, dos sinérgidas y una gran célula central binucleada. El embrión se desarrolla por partenogénesis ($2n + 0$) y el endospermo se origina por pseudogamia como resultado de la fecundación de los dos núcleos polares por un núcleo espermático reducido ($2n + 2n + n$). Asimismo, muchos de los histogramas de las plantas pertenecientes a las poblaciones A2 y A3 mostraron una relación embrión: endospermo $6Cx : (9Cx + 15Cx)$. Debido a que estos histogramas fueron logrados utilizando grupos de 10 semillas por planta, se analizaron de manera individual 40 semillas correspondientes a 2 plantas y esta misma metodología se realizó para cada población. Los histogramas de estas 40 semillas fueron agrupados en dos categorías: en una se incluyeron los histogramas que presentaron una relación embrión: endospermo de $6Cx : 15Cx$ y que correspondieron a semillas originadas por apomixis: embrión $2n + 0$ (aposporia + partenogénesis) y endospermo $2n + 2n + n$ (aposporia + pseudogamia). En la otra categoría están los histogramas que presentaron una relación $9Cx : 15Cx$ (Fig. 7c), los que concuerdan con la

formación de semillas B_{III} originadas a partir de la fecundación de un gameto femenino no reducido por un gameto masculino reducido ($2n + n$) debido a la falla de la partenogénesis. Esto significa que la doble fecundación ocurre en algunos de los sacos embrionarios apospóricos (aposporia + doble fecundación; embrión $2n + n$ y endospermo $2n + 2n + n$).

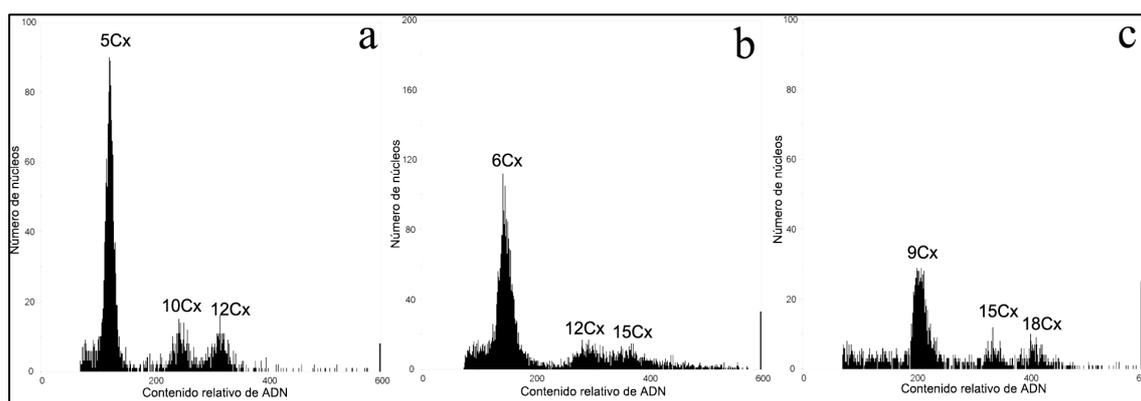


Figura 7. Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo a partir del análisis de grupos de semillas y semillas individuales de *Paspalum buckleyanum*. **a)** Grupo de 10 semillas de un pentaploide apomítico: embrión 5Cx y endospermo 12Cx; **b)** grupo de 10 semillas de un hexaploide apomítico: embrión 6Cx y endospermo 15Cx; **c)** semilla individual de una planta hexaploide originada por doble fecundación de un saco embrionario apospóricos (híbrido B_{III}). Los picos adicionales observados en los diferentes histogramas corresponden a los núcleos de las células del tejido embrionario en estado G2 del ciclo celular.

El análisis de 10 de semillas realizado para las dos poblaciones 4x puras de *Paspalum denticulatum* (D1 y D2), mostraron histogramas con una relación embrión:endospermo del tipo 4Cx : (6Cx + 10Cx) (Fig. 8a). Sin embargo, del análisis posterior de semillas individuales que se realizó en dos plantas de cada población (20 semillas de cada planta), resultaron relaciones de contenido de ADN entre embrión y endospermo de tres clases: a) la mayoría de las semillas presentaron una relación 4Cx : 10Cx, indicando que las mismas se originaron por apomixis (embrión = $2n + 0$ y endospermo = $2n + 2n + n$) (Fig. 8b); b) algunas semillas mostraron una relación 4Cx : 6Cx, ya que las mismas se

generaron por la vía sexual a través de la doble fecundación de un saco embrionario meiótico (embrión = $n + n$ y endospermo = $n + n + n$) (Fig. 8c); y c) un tercer grupo de semillas presentó una relación $6Cx : 10Cx$, revelando el origen B_{III} de las mismas (embrión = $2n + n$ y endospermo = $2n + 2n + n$) (Fig. 8d). Estos resultados indicaron que las poblaciones tetraploides puras de *P. denticulatum* D1 y D2 son apomícticas facultativas con una sexualidad residual del 23,6% y del 17,5% respectivamente. Las mismas tienen además el potencial para eventualmente incrementar la ploidía al nivel hexaploide a través de la producción de semillas B_{III} (Tabla 9).

En el caso de la población mixta D3 originaria de Paraguay, se analizaron grupos de semillas para 9 individuos seleccionados: 6 de estas plantas fueron diploides y pudo determinarse que las mismas se reproducen exclusivamente por sexualidad, mostrando histogramas con una relación entre embrión y endospermo de $2Cx : 3Cx$ (Fig. 8e). Una de las plantas fue triploide y presentó histogramas con relaciones de contenido de ADN entre el tejido embrionario y el endospermático de $3Cx : 8Cx$. Esto significa que esta planta origina semillas por apomixis a través del desarrollo partenogenético del embrión por $(2n + 0)$ y de la formación del endospermo a través de la fecundación de los dos núcleos polares $(2n + 2n)$ por un núcleo espermático reducido de 20 o cerca de 20 cromosomas (Fig. 8f). Las otras dos plantas fueron tetraploides y exhibieron en el análisis de grupos de semillas, relaciones embrión : endospermo del tipo $4Cx:(6Cx + 10Cx)$. El estudio de semillas individuales de estos tetraploides permitió determinar que los mismos conservan en promedio un 8,3% de sexualidad residual y que un 12,5% de las semillas que producen son B_{III} (hexaploides).

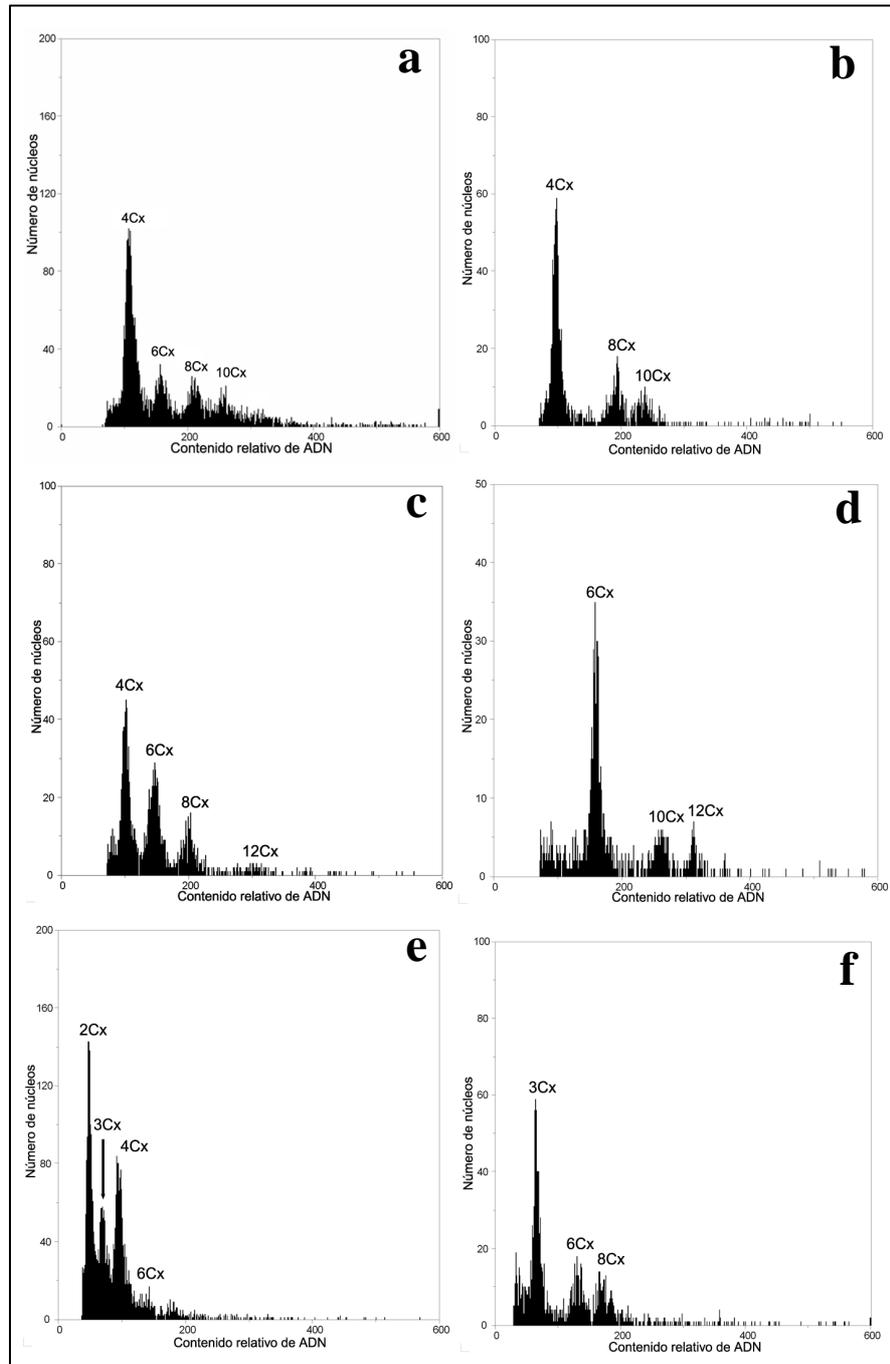


Figura 8. Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo a partir grupos de semillas y semillas individuales de *Paspalum denticulatum*. a) Grupo de 10 semillas de un tetraploide apomíctico facultativo: embrión 4Cx y endospermo 6Cx + 10Cx; b) semilla individual de una planta tetraploide originada vía apomixis: embrión 4Cx y endospermo 10Cx; c) semilla individual de una planta tetraploide originada por sexualidad: embrión 4Cx y endospermo 6Cx; d) semilla individual de una planta tetraploide originada por doble fecundación de un saco embrionario apospórico (híbrido B_{III}): embrión 6Cx y endospermo 10Cx; e) grupo de 10 semillas de una planta diploide sexual: embrión 2Cx y endospermo 3Cx; f) grupo de 10 semillas de un triploide apomíctico: embrión 3Cx y endospermo 8Cx. Los picos adicionales que se observan en los diferentes histogramas corresponden a los núcleos de las células de los tejidos embrionarios y endospermáticos en estado G2 del ciclo celular.

En *Paspalum lividum* se determinó el sistema reproductivo de las poblaciones L1 y L2. El análisis de los grupos de semillas mostró que en todos los casos, para ambas poblaciones, la relación entre contenido de ADN del tejido embrionario y el endospermático fue 4Cx : (6Cx y 10Cx) (Fig. 9). Posteriormente, el análisis de semillas individuales provenientes de dos plantas de la población L1 reveló que el 30% de las semillas se originó por la vía sexual, mientras que el 70% restante surgió por apomixis. En esta población no se recuperaron semillas B_{III}. Sin embargo, el análisis de semillas en grupos de L3 y de semillas individuales de las poblaciones L2 y L3 no se realizó debido a la falta de semillas. Estos resultados indican que los genotipos tetraploides estudiados de *P. lividum* (correspondientes a la población L1) se reproducen por apomixis facultativa. Los genotipos originados en la población L2 pueden presentar apomixis facultativa y/o apomixis obligada combinada con producción de B_{III}, necesiéndose más evidencias experimentales para distinguir entre estas situaciones.

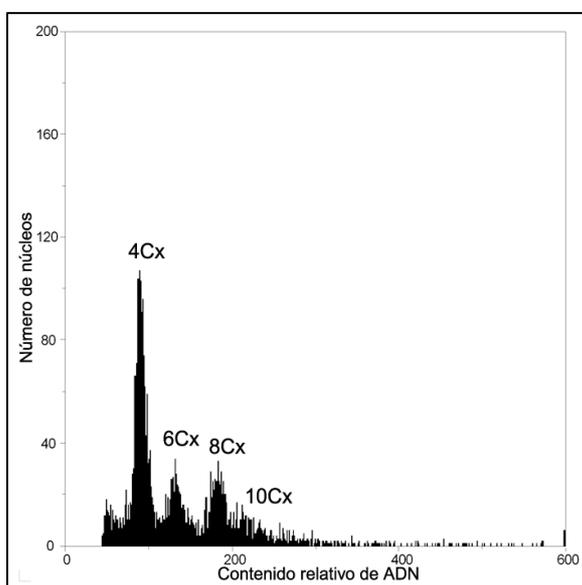


Figura 9. Histograma de contenido de ADN obtenido por citometría de flujo a partir de un grupo de 10 semillas de un tetraploide apomítico facultativo de *Paspalum lividum* embrión 4Cx y endospermo 6Cx + 10Cx; el pico 8Cx corresponde a los núcleos de las células del embrión en fase G2.

Las 3 poblaciones de *Paspalum nicorae* fueron examinadas realizándose el análisis de grupos y de semillas individuales. Los resultados indicaron que esta especie se reproduce por apomixis facultativa (Fig. 10), con un 5% de sexualidad residual en las poblaciones N1 y N2 y un 2,5% en la población N3. Inesperadamente, una alta proporción de semillas fueron B_{III}, es decir originadas a partir de la doble fecundación de un saco apospórico no reducido ($2n + n$). Esta proporción varió desde un 15% en las poblaciones N2 y N3 alcanzando el 32,5% en la población N1.

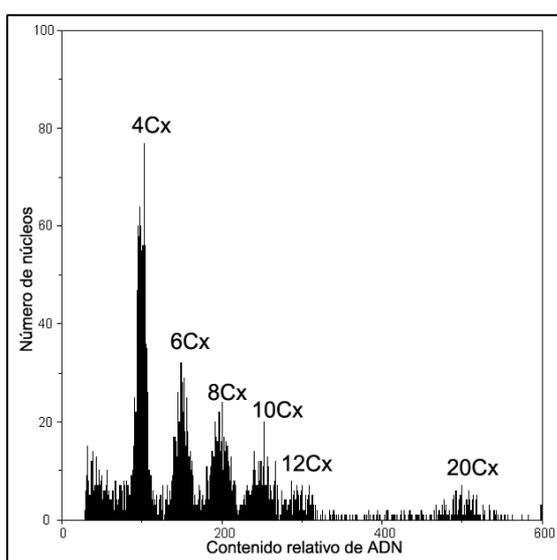


Figura 10. Histograma de contenido de ADN obtenido por citometría de flujo a partir un grupo de 10 semillas de una planta tetraploide apomítica facultativa de *Paspalum nicorae*: embrión 4Cx y endospermo 6Cx + 10Cx; los picos restantes corresponden a los núcleos de las células de los embriones (8Cx), el endospermo de las semillas de origen sexual (12Cx) y el endospermo de las semillas de origen apomítico (20x), todos en fase G2.

En el caso de *Paspalum rufum*, los individuos diploides de dos poblaciones puras (R2 y R5) y de una de las poblaciones mixtas (R3) siempre mostraron relaciones del tipo 2Cx : 3Cx (Fig. 11a) y fueron clasificados como de reproducción sexual. Por otro lado, el análisis de grupos de semillas en los genotipos tetraploides de la población mixta (R3) mostró en todos los casos, una relación embrión : endospermo de 4Cx : 10Cx (Fig. 11b), mientras que para los tetraploides de las poblaciones R1 y R4 la relación fue de 4Cx : (6Cx + 10Cx). El análisis de semillas individuales de estas dos últimas poblaciones permitió determinar que algunos de los individuos 4x producen ocasionalmente semillas

B_{III}. El modo reproductivo de la única planta diploide encontrada en la población R1 no pudo ser determinado debido a que la misma murió antes de la floración. Estos resultados indican que los citotipos 2x de *P. rufum* se reproducen por sexualidad y que los citotipos 4x lo hacen por la vía apomítica. Si bien no fue posible detectar sexualidad residual entre los tetraploides ($n + n$), los mismos pueden ocasionalmente formar semillas B_{III}.

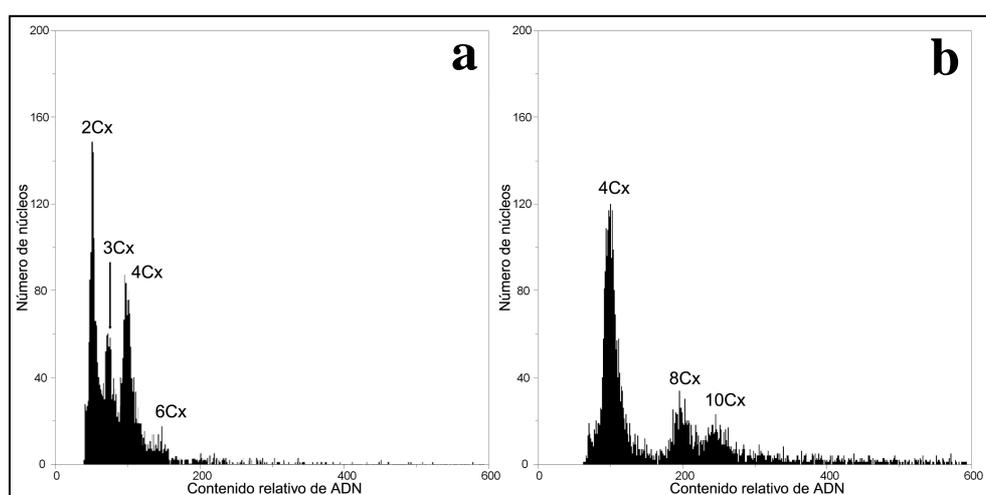


Figura 11. Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo a partir de grupos de semillas de *Paspalum rufum*. a) Grupo de 10 semillas de un diploide sexual: embrión 2Cx y endospermo 3Cx; los picos 4Cx y 6Cx corresponden a los núcleos de las células del embrión y el endospermo en fase G2; b) grupo de 10 semillas de una planta tetraploide apomítica: embrión 4Cx y endospermo 10Cx; el pico 8Cx corresponde a los núcleos de las células del embrión en fase G2.

Estudios adicionales permitieron determinar el nivel de ploidía por citometría de flujo de plántulas derivadas de semillas provenientes de plantas tetraploides pertenecientes a las poblaciones N1 de *P. nicorae* y D1 de *P. denticulatum*. El análisis reveló que el 30,5% y el 11% de la progenie de *P. nicorae* y *P. denticulatum* respectivamente fueron hexaploides, revelando el origen híbrido (B_{III}) de las mismas. Estos valores están en concordancia con la proporción de semillas B_{III} formadas en las poblaciones naturales N1 (32,5%) y D1 (17,5) de ambas especies.

El análisis del modo reproductivo de las poblaciones de *P. unispicatum* no se realizó debido a la dificultad para obtener semillas maduras. Al momento de la colección del material a campo las plantas se encontraban en floración y no fue posible cosechar semillas. Por otro lado, si bien las plantas fueron mantenidas en macetas bajo invernáculo, fertilizadas y en condiciones de humedad controlada, no fue posible lograr una buena floración y por la tanto, la producción de semillas fue nula.

Tabla 9. Modo reproductivo de cinco especies de *Paspalum* analizadas por citometría de flujo en semillas maduras mediante la relación de contenido de ADN del embrión y el endospermo: $n + n$ = sexualidad; $2n + 0$ = aposporia + partenogénesis + seudogamia; $2n + n$ = aposporia + fecundación (B_{III}).

Especies y poblaciones	Nivel de ploidía	Nº de plantas analizadas	Plantas que originan semillas por			Sexualidad residual (%)*	Proporción de semillas con embriones B_{III} (%)	Modo reproductivo**
			$n + n$	$2n + 0$	$2n + n$			
<i>P. buckleyanum</i>								
A1	5x	6		+				A
	6x	4		+				A
A2	6x	10		+	+		7,5 (9x)	A
A3	6x	10		+	+		5,0 (9x)	A
A4	6x	10		+				A
<i>P. denticulatum</i>								
D1	4x	10	+	+	+	17,5	17,5 (6x)	Af
D2	4x	10	+	+	+	23,6	12,5 (6x)	Af
D3	2x	6	+					S
	3x	1		+				A
	4x	2	+	+	+	8,3	12,5 (6x)	Af
<i>P. lividum</i>								
L1	4x	10	+	+		30,0		Af
L2	4x	10	+	+		na		Af ó A + B_{III}
L3	4x	-				na		na
<i>P. nicorae</i>								
N1	4x	10	+	+	+	5,0	32,5 (6x)	Af
N2	4x	10	+	+	+	5,0	15,0 (6x)	Af
N3	4x	10	+	+	+	2,5	15,0 (6x)	Af
<i>P. rufum</i>								
R1	2x	-				na		na
	4x	10		+	+		6,25 (6x)	A
R2	2x	10	+					S
R3	2x	3	+					S
	4x	7		+				A
R4	4x	10		+	+		5,0 (6x)	A
R5	2x	10	+					S

* Proporción de semillas formadas por sexualidad ($n + n$), promedio del análisis de dos plantas por población tomadas al azar

** Modo reproductivo (A apomíctica, Af apomíctica facultativa, S sexual, na no analizada)

V. 3.- Variabilidad genética

V.3.1.- Análisis de AFLP

Para la determinación de la variabilidad genética se seleccionaron 16 poblaciones. Del total de individuos cuyo nivel de ploidía fue determinado por citometría de flujo, se seleccionaron entre 27 y 30 individuos por población, los cuales fueron sometidos a extracciones de ADN genómico. Se seleccionaron las combinaciones de cebadores más adecuadas a partir del análisis del ADN de dos individuos de cada especie con 15 combinaciones diferentes de cebadores para las amplificaciones selectivas (E33 M31, E33 M36, E33 M40, E36 M31, E36 M36, E36 M40, E37 M31, E37 M36, E37 M40, E38 M31, E38 M36, E38 M40, E40 M31, E40 M36, E40 M40). Todas las combinaciones generaron diferentes patrones de amplificación. Para el análisis de las poblaciones se seleccionaron 3 combinaciones de primers (E36M31, E40M31 y E38M40) debido a que presentaron perfiles de bandas claros y definidos, se distribuyeron a lo largo de todo el gel de poliacrilamida y fueron apropiados para determinar polimorfismos entre los individuos de las poblaciones. El número total de marcadores que se registró en cada una de las poblaciones varió entre 91 y 205 y el porcentaje de bandas polimórficas osciló entre el 0% (en las 3 poblaciones de *P. buckleyanum*) y el 100% (en una población diploide de *P. rufum*) (Tabla 10).

V.3.2. Variabilidad genética poblacional

Según los datos de presencia o ausencia de bandas se estableció el perfil genético de cada individuo. Se hicieron cálculos de variabilidad genotípica y genética en las 16 poblaciones por separado. Los distintos estimadores son mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10. Medidas de variación genotípica y genética para cada una de las poblaciones analizadas. NP: nivel de ploidía; N: número de individuos analizados; BT: bandas totales analizadas; %BP: porcentaje de bandas polimórficas; G: número de genotipos multilocus distintos; G/N: proporción de genotipos distinguibles; D: diversidad de genotipos multilocus; E: uniformidad de genotipos multilocus; CV: coeficiente de variación de los valores de similitud de Jaccard para pares de individuos.

Especie	Población	NP	N	BT	%BP	G	G/N	D	E	CV	
<i>P. buckleyanum</i>	A2	6x	30	201	0	1	0,03	0	0	0	
	A3	6x	30	198	0	1	0,03	0	0	0	
	A4	6x	30	205	0	1	0,03	0	0	0	
<i>P. denticulatum</i>	D1	4x	30	122	28,69	4	0,13	0,51	0,56	4,89	
	D2	4x	30	114	29,82	3	0,10	0,13	0,01	5,64	
	D3	2x	23	197	66,50	23	1	1	1	1	9,75
		3x	2	197	8,63	2	1	1	1	1	-
	4x	5	197	38,07	4	1	1	1	1	12,56	
<i>P. lividum</i>	L1	4x	20	168	16,07	14	0,7	0,93	0,5	3,69	
<i>P. nicorae</i>	N1	4x	30	122	78,69	23	0,76	0,97	0,66	15,20	
	N2	4x	29	146	90,41	23	0,79	0,98	0,75	23,94	
	N3	4x	30	118	76,27	28	0,93	0,99	1	12,43	
<i>P. rufum</i>	R1	4x	29	134	67,91	29	1	1	1	9,77	
	R3	2x	8	139	58,74	8	1	1	1	13,15	
		4x	21	139	90,91	21	1	1	1	19,93	
	R6	2x	30	130	100	30	1	1	1	23,74	
<i>P. unispicatum</i>	U1	2x	30	135	66,67	30	1	1	1	9,97	
	U2	3x	24	91	46,15	24	1	1	1	4,93	
		4x	4	91	20,88	4	1	1	1	7,87	
	U3	4x	30	99	45,45	30	1	1	1	5,91	

En cada una de las poblaciones de *Paspalum buckleyanum* se identificó un único genotipo multilocus (G=1), lo que significa que los individuos de una misma población son genotípicamente iguales, mostrando un valor de 0 para los indicadores D y E. Al comparar los genotipos de las tres poblaciones se pudo determinar que los mismos son diferentes entre sí, con una distancia genética que osciló entre el 24 y el 46% (Fig. 12a, 12b). Cada genotipo posee además

alelos exclusivos, es decir, marcadores que se encuentran en uno de los genotipos y que no son encontrados en los otros (Fig. 12c).

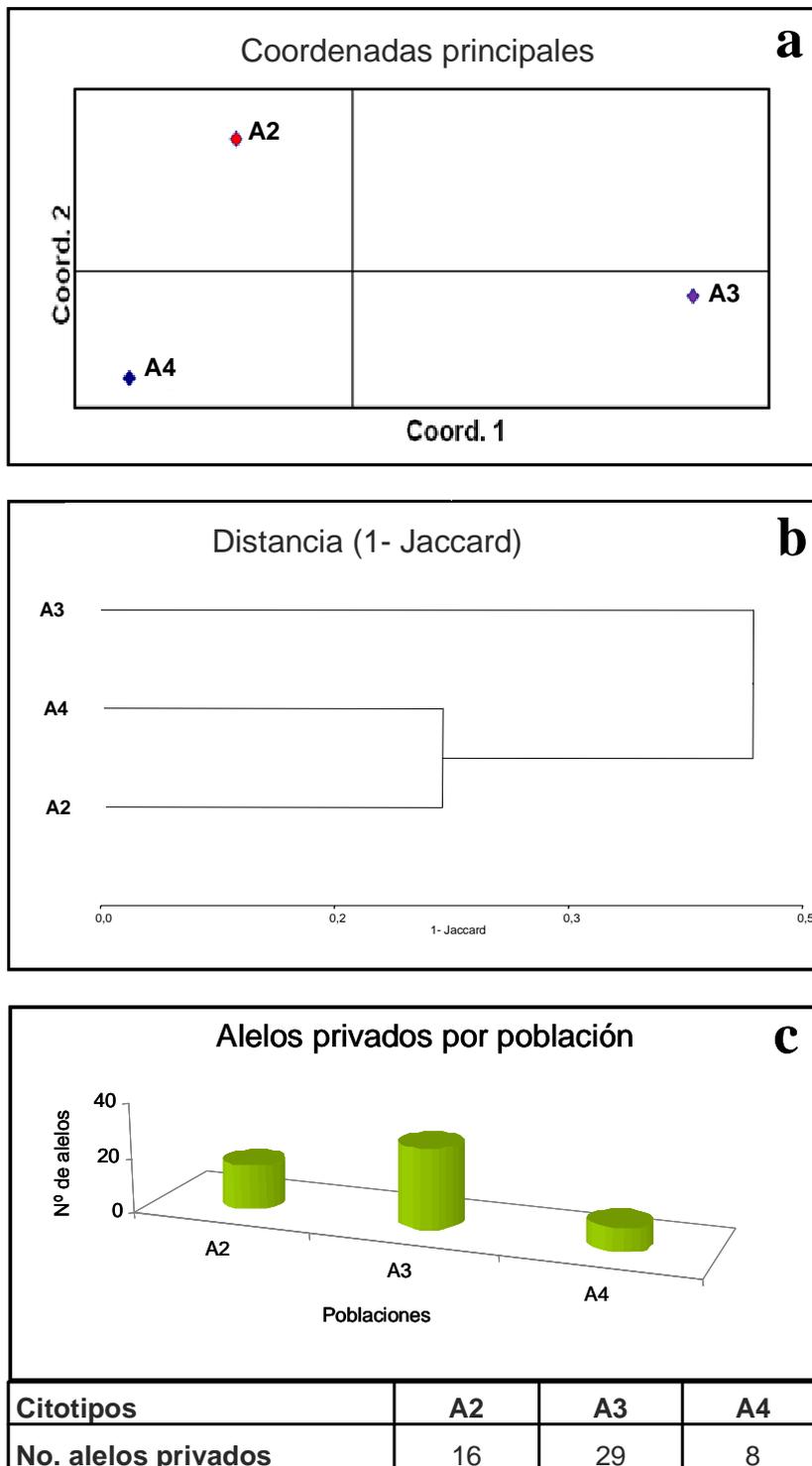


Figura 12. *Paspalum buckleyanum*: distancia genética entre los genotipos de las poblaciones A2, A3 y A4; **a)** análisis de coordenadas principales; **b)** fenograma de distancia genética (UPGMA); **c)** número de alelos exclusivos encontradas para cada una de las poblaciones.

En *Paspalum denticulatum*, la población D1 presentó 4 genotipos diferentes (Fig. 13), mientras que D2 presentó 3 genotipos multilocus (Fig. 14), existiendo una predominancia de uno o dos clones en cada población. Estos genotipos representaron entre el 30 y el 93% de los individuos. Los porcentajes de polimorfismos en estas poblaciones fueron del 28,69% (D1) y 29,82% (D2), respectivamente. Sin embargo, la población mixta D3 mostró la máxima variación genotípica para esta especie con valores de G/N, D y E iguales a 1. El mayor porcentaje de bandas polimórficas se observó en los individuos 2x de esta población alcanzando el 66,5%, demostrando que este citotipo es el que mostró mayor variabilidad (Fig. 15a, 15b). De igual manera, los individuos 4x de esta población presentaron un 38,07% de bandas polimórficas, siendo este valor el más alto registrado entre los citotipos tetraploides de esta especie. Como puede observarse en el análisis de coordenadas principales, cada uno de los individuos analizados en la población D3 representa genotipos diferentes los cuales se agrupan en función del nivel de ploidía (Fig. 15a). Los genotipos diploides además presentaron el mayor número de alelos exclusivos lo cual indica, al igual que el porcentaje de bandas polimórficas, que este es el citotipo con mayor variabilidad (Fig. 15b). En esta población la variabilidad es mayor dentro de cada citotipo (80%), mostrando una baja diferenciación entre ellos (20%) (Fig. 15c).

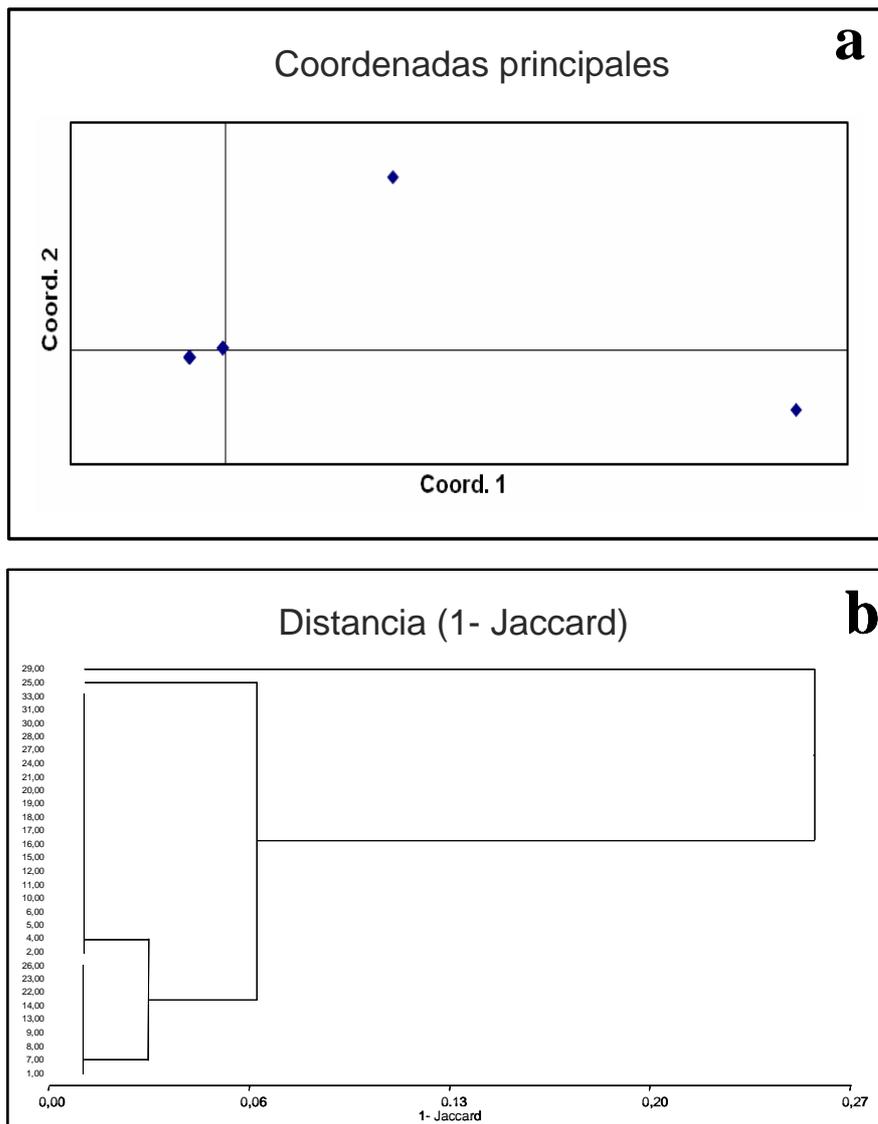


Figura 13. *Paspalum denticulatum*: **a)** análisis de coordenadas principales de los 4 genotipos detectados en la población D1; **b)** fenograma de distancia genética (UPGMA) de los 30 individuos correspondientes a la población D1.

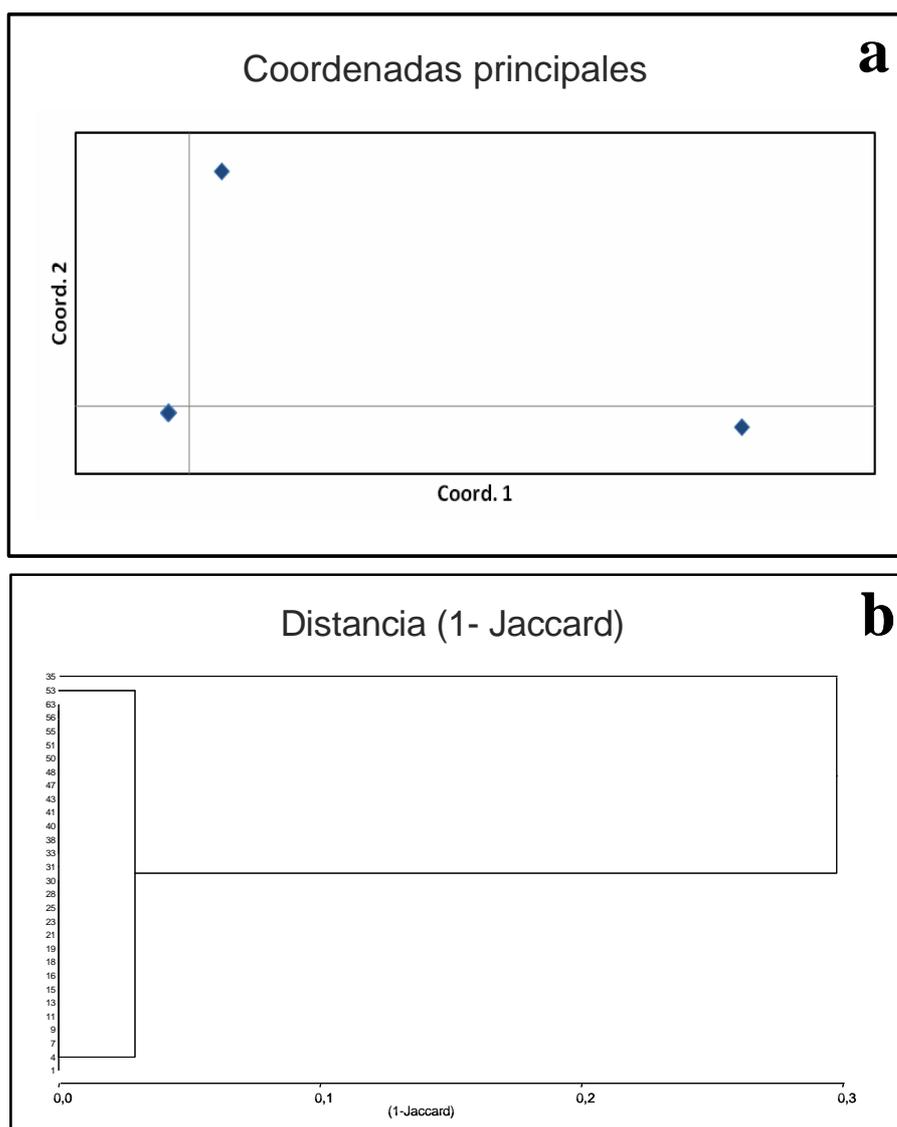


Figura 14. *Paspalum denticulatum*: **a)** análisis de coordenadas principales de los 3 genotipos detectados en la población D2; **b)** fenograma de distancia genética (UPGMA) de los 30 individuos correspondientes a la población D2.

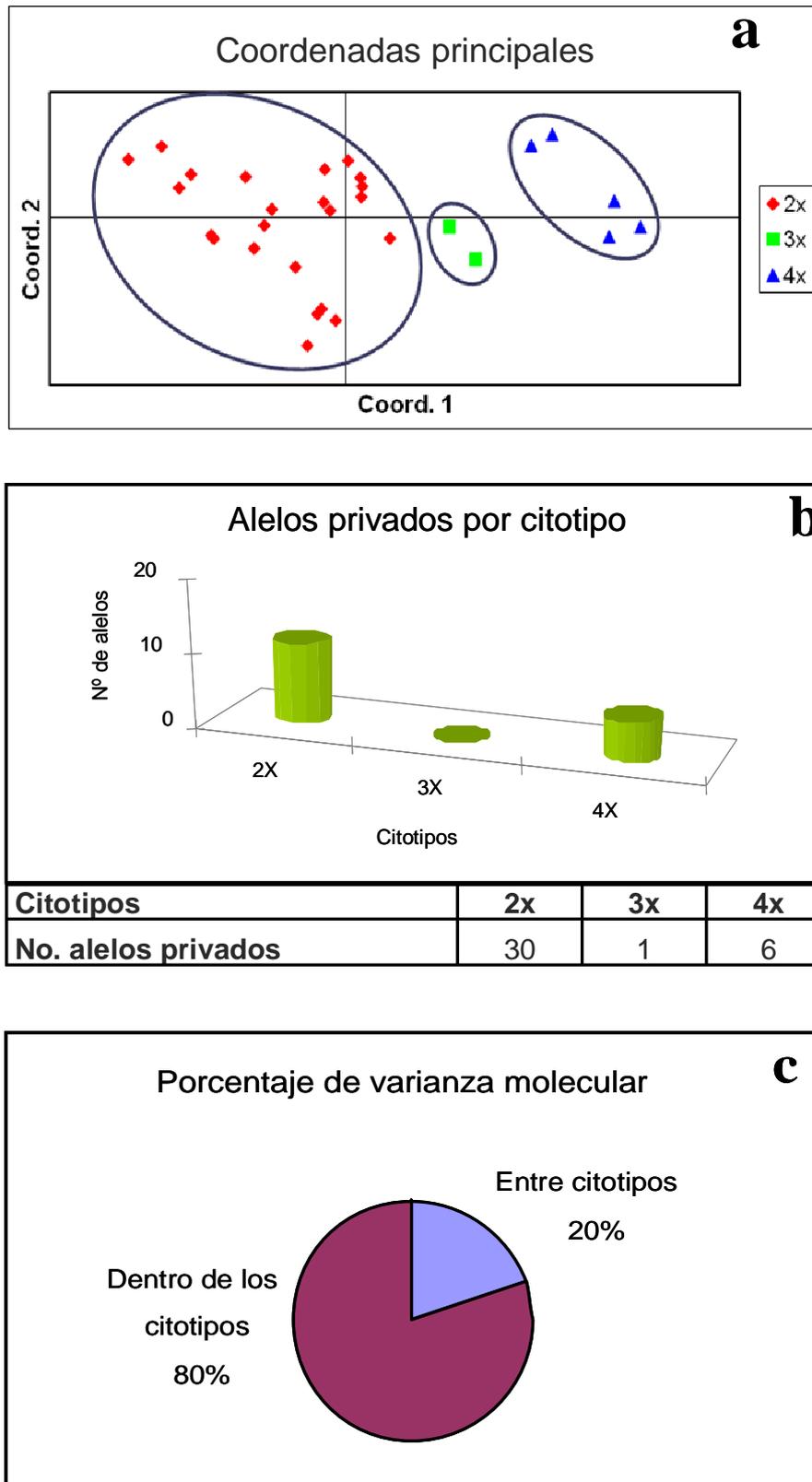


Figura 15. *Paspalum denticulatum*, población D3: **a)** análisis de coordenadas principales para los 30 genotipos detectados en la población; **b)** número de alelos exclusivos para cada citotipo detectado; **c)** Porcentaje de varianza molecular dentro y entre citotipos.

Al examinar la distancia genética existente entre las poblaciones a través del análisis de coordenadas principales, se observó que los genotipos de cada población se agruparon juntos entre sí pero separados de los genotipos correspondientes a las otras dos poblaciones (Fig. 16a). Sin embargo, los individuos 4x de la población mixta (D3) se agruparon más cerca de los tetraploides de la población D2 (círculo punteado en la Fig. 16a). El análisis de la varianza molecular (AMOVA) indicó que el 55% de la variación se dio dentro de las poblaciones, mientras que el 45% restante correspondió a la variación entre poblaciones, indicando un grado importante de diferenciación entre las poblaciones analizadas (Fig. 16b).

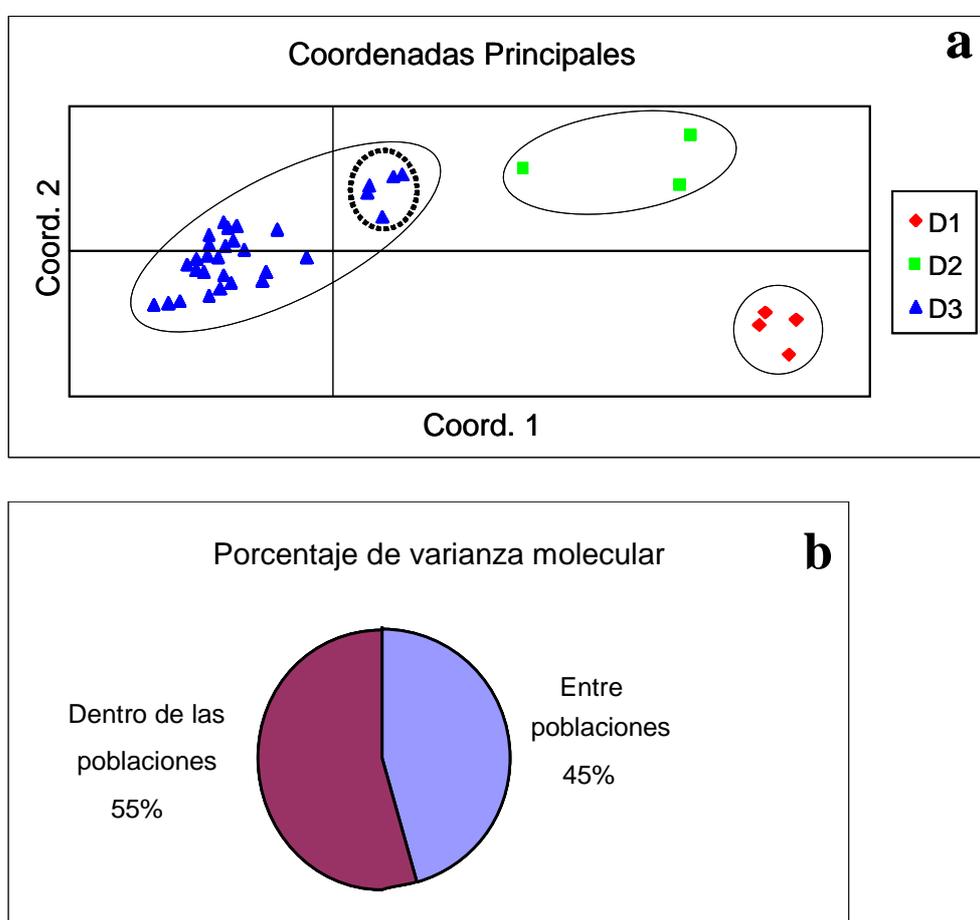


Figura 16. *Paspalum denticulatum*: **a)** análisis de coordenadas principales de los genotipos encontrados en las tres poblaciones; **b)** determinación del porcentaje de la varianza molecular dentro y entre las poblaciones.

En los 20 individuos seleccionados de la población L1 de *Paspalum lividum*, se identificaron 14 genotipos diferentes (Fig. 17a). Esto indicaría que si bien existen individuos con el mismo genotipo, no hay un predominio de alguno de ellos dentro de la población. Por otra parte, el porcentaje de bandas polimórficas fue sólo de 16,07% y fue la población que presentó el menor coeficiente de variación (3,69), lo que indica que en esta población la variabilidad genética es menor que en las demás poblaciones que se analizaron.

Las poblaciones N1, N2 y N3 de *Paspalum nicorae* mostraron una elevada variación genotípica, encontrándose en cada población valores de G/N, D y E iguales o cercanos a 1, lo que indica que todos o casi todos los individuos analizados corresponden a genotipos multilocus diferentes (Fig. 17b, 17c, 17d). Por otra parte, las poblaciones presentaron entre el 76,27% y el 90,41% de bandas polimórficas, siendo valores elevados, debido a que las poblaciones fueron clasificadas como apomícticas con un porcentaje de sexualidad residual que alcanzó solo al 5%. Los coeficientes de variación también fueron muy elevados, alcanzando en la población N2 un valor de 23,94, siendo este valor el máximo encontrado entre todas las poblaciones analizadas. Esto indica que esta población es la de mayor variabilidad genética.

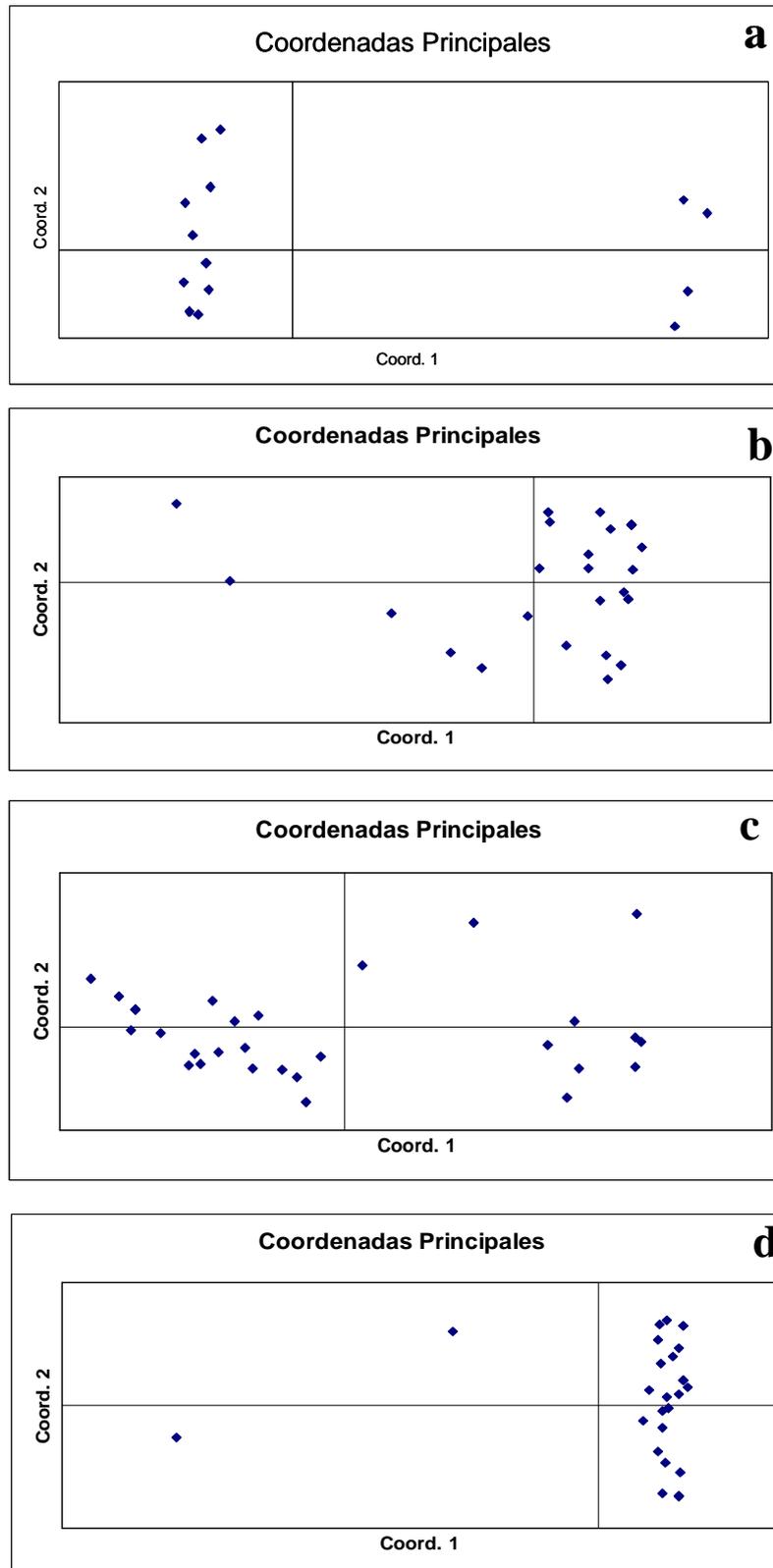


Figura 17. *Paspalum lividum*: **a)** análisis de coordenadas principales de los 14 genotipos detectados en la población L1. *Paspalum nicorae*: **b)** análisis de coordenadas principales de los 23 genotipos detectados en la población N1; **c)** análisis de coordenadas principales de los 23 genotipos detectados en la población N2; **d)** análisis de coordenadas principales de los 28 genotipos detectados en la población N3.

Las tres poblaciones seleccionadas de *P. rufum* mostraron valores máximos de diversidad genotípica, con G/N, D y E iguales a 1 visualizándose claramente en el análisis de coordenadas principales basado en la distancia genética (Fig. 18). La población diploide R6 fue la que presentó el mayor porcentaje de bandas polimórficas (100%) y el mayor valor de coeficiente de variación de esta especie. Estos resultados son los esperados para una población constituida por individuos de reproducción sexual y alógamos. En la población R3 en cambio, los genotipos diploides presentaron valores de %BP y de %CV menores que los obtenidos para los genotipos tetraploides de la misma población (Tabla 9). Esto indicaría una mayor variabilidad en el nivel 4x.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) permitió determinar que el 89% de la variabilidad encontrada en esta población ocurre dentro de cada citotipo, mientras que el 11% restante corresponde a la variabilidad encontrada entre las razas 2x y 4x. Esto indicaría la ocurrencia de una baja diferenciación entre citotipos dentro de esta población (Fig. 19). Este hecho también se ve reflejado al observar el número de alelos exclusivos, que fue de 21 para los 4x y sólo 1 para los 2x. Aquí, la mayor diversidad estaría conservada a nivel tetraploide y no a nivel diploide. Los menores valores de diversidad genética fueron obtenidos para la población R1, la que está constituida principalmente por individuos tetraploides, entre los que sólo pudo detectarse un individuo diploide. Esta planta 2x no fue incluida en el análisis debido a que la misma murió antes de poder realizar la extracción de ADN.

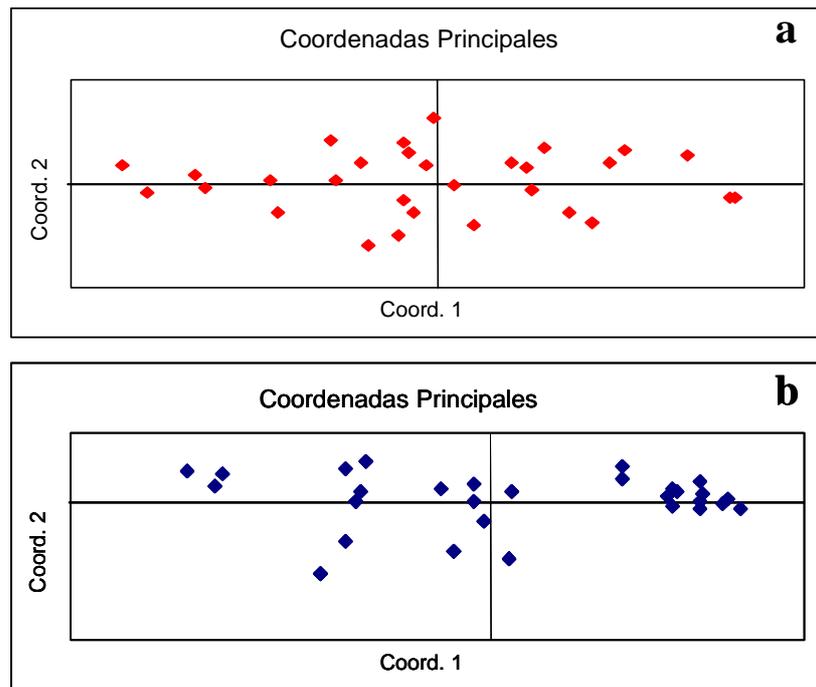


Figura 18. *Paspalum rufum*: **a)** análisis de coordenadas principales de los 30 genotipos analizados para la población R6; **b)** análisis de coordenadas principales de los 30 genotipos analizados para la población R1.

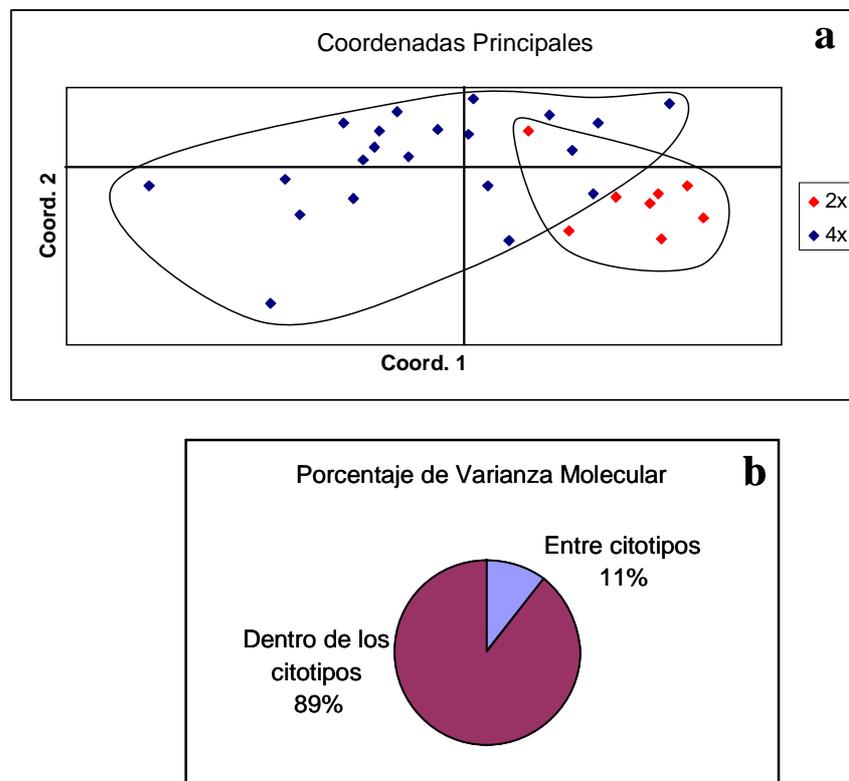


Figura 19. *Paspalum rufum*, población R3: **a)** análisis de coordenadas principales de los genotipos correspondientes a los citotipos 2x y 4x detectados en la población; **b)** determinación del porcentaje de varianza molecular dentro y entre citotipos.

Valores máximos de diversidad genotípica también fueron encontrados en las poblaciones de *Paspalum unispicatum*, entre las que los citotipos diploides fueron los que presentaron mayores valores de bandas polimórficas y de coeficientes de variación de esta especie, es decir, mayores niveles de variabilidad genética (Tabla 9). En la población U2, los genotipos triploides tuvieron un mayor porcentaje de BP que los tetraploides de la misma población (46,15% y 20,88% respectivamente). Estas diferencias podrían deberse en parte a que el número de individuos tetraploides analizados fue menor con respecto al número de individuos triploides. Sin embargo, el coeficiente de variación fue mayor para los individuos 4x que para los 3x, lo cual indicaría que los cuatro genotipos tetraploides se encontrarían más diferenciados entre sí que los genotipos triploides. El análisis de coordenadas principales permitió discernir dos grupos: uno constituido por individuos 3x, mientras que en el segundo se agruparon los genotipos 4x junto con algunos 3x. En este caso, los triploides mostraron 11 alelos exclusivos que no fueron detectados entre los tetraploides; en cambio, entre los tetraploides no se encontraron alelos exclusivos, es decir que comparten todos los marcadores analizados con los genotipos triploides (Fig. 20d). La población U3 presentó un 45,45% de bandas polimórficas con un valor de CV de 5,91. Estos resultados indicarían que si bien existen muchos genotipos, la distancia genética entre ellos es baja. Las diferencias en el grado de variabilidad que fueron encontrados para cada población pueden observarse en los gráficos de análisis de coordenadas principales realizado en base a la distancia genética de individuos de una misma población (Fig. 20a, 20b, 20c).

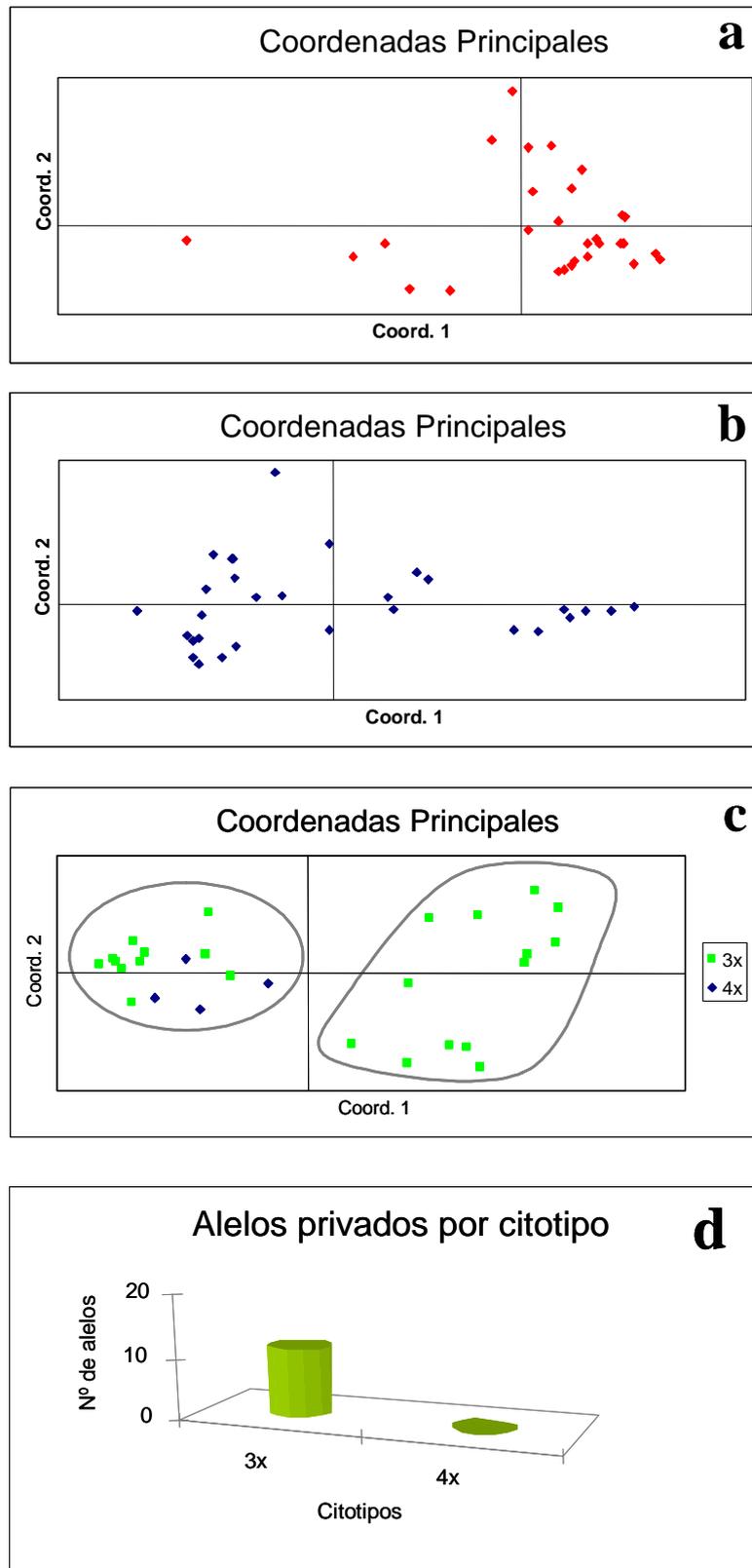


Figura 20. *Paspalum unispicatum*: **a)** análisis de coordenadas principales de los 30 genotipos detectados en la población U1; **b)** análisis de coordenadas principales de los 30 genotipos detectados en la población U3; **c)** análisis de coordenadas principales de los 28 genotipos detectados en la población mixta U2, **d)** número de bandas privadas para cada citotipo detectado en la población U2.

V.4.- Tamaño de genoma

A través de la técnica de citometría de flujo utilizando ioduro de propidio como fluorocromo de ADN intercalante, se determinó el contenido absoluto de ADN (expresado en picogramos) de los diferentes citotipos de las 6 especies que se analizaron en este estudio (Tabla 11).

El contenido 2C de ADN de las diferentes especies varió desde 1,23pg para la raza diploide de *Paspalum denticulatum* a 3,93pg hallado en el citotipo hexaploide en *P. buckleyanum*. Entre los citotipos diploides estudiados, aquellos correspondientes a *P. denticulatum* presentaron el menor contenido (1,23pg), mientras que el mayor contenido que se observó a nivel diploide fue para los citotipos de *P. rufum* (entre 1,6 y 1,64pg). Entre los citotipos tetraploides el valor más bajo fue el encontrado para la introducción MS11 de *P. unispicatum* con 2,68pg, mientras que el más alto fue para la introducción MS20 de *P. rufum*, con un contenido de ADN de 3,14pg. En la Fig. 20 puede observarse un histograma ilustrando el contenido 2C de ADN de la especie utilizada como estándar y de uno de los citotipos de *P. unispicatum*.

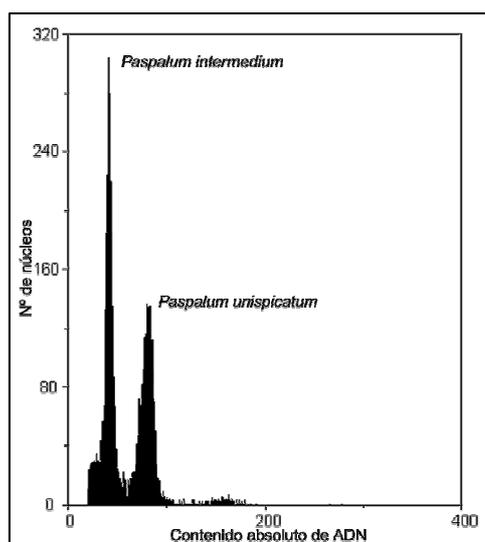


Figura 20. Histograma de contenido absoluto de ADN obtenido por citometría de flujo a partir de hojas frescas de *Paspalum intermedium* (estándar) y *Paspalum unispicatum* introducción 4x MS11(muestra).

El valor Cx representa el contenido de ADN de un genoma monoploide no replicado con un número x de cromosomas (Greilhuber *et al.* 2005). Este valor puede ser calculado como el contenido 2C de ADN dividido el nivel de ploidía. Los citotipos pentaploides y hexaploides de *P. buckleyanum* presentaron valores Cx semejantes entre sí (0,64 y 0,65pg respectivamente). Del mismo modo, en las demás especies los valores Cx fueron similares entre las razas estudiadas para cada una de ellas (Tabla 10). *P. buckleyanum*, *P. denticulatum*, *P. lividum* y *P. unispicatum* presentaron menores valores Cx (entre 0,61 y 0,69pg), los que a su vez fueron muy parecidos para las cuatro especies. La especie con mayor contenido Cx de ADN fue *P. nicorae* (0,96pg), mientras que valores intermedios fueron obtenidos para *P. rufum*, oscilando entre 0,76 y 0,82pg.

Tabla 11. Nivel de ploidía, contenido de ADN expresado en valor 2C, 1C y Cx (pg) de los diferentes citotipos pertenecientes a las seis especies de *Paspalum* en estudio. La especie utilizada como estándar interno en cada caso es también señalada.

Especie	Introducción	Nivel de ploidía	Cont. de ADN 2C (pg)	Cont. de ADN 1C (pg)	Valor Cx (pg)	Estándar Interno
<i>P. buckleyanum</i>	MS1	5x	3,20	1,6	0,64	I
	MS13	6x	3,93	1,96	0,65	F
<i>P. denticulatum</i>	Q4304	2x	1,23	0,61	0,61	F
		3x	1,95	0,97	0,65	F
		4x	2,69	1,34	0,67	I
	MS12	4x	2,72	1,36	0,68	I
<i>P. lividum</i>	MS25	4x	2,69	1,34	0,67	I
<i>P. unispicatum</i>	U15	2x	1,34	0,67	0,67	F
	MS14	3x	2,05	1,02	0,68	F
		4x	2,76	1,38	0,69	I
	MS11	4x	2,68	1,34	0,67	I
<i>P. nicorae</i>	MS5	4x	3,86	1,93	0,96	I
	MS4	4x	3,85	1,92	0,96	I
<i>P. rufum</i>	MS16	2x	1,64	0,82	0,82	F
	MS18	2x	1,60	0,8	0,8	F
		4x	3,05	1,52	0,76	I
	MS6	4x	3,10	1,55	0,77	I
	MS20	4x	3,14	1,57	0,78	I

Estándar interno: F, *P. dilatatum ssp flavescens*; I, *P. intermedium*

VI.- *DISCUSIÓN*

VI.- DISCUSIÓN

VI.1.- Nivel de ploidía y sistema reproductivo

La mayoría de las especies del género *Paspalum* cuentan con un citotipo diploide de reproducción sexual y un citotipo poliploide de reproducción apomíctica. La apomixis y la poliploidía (principalmente la tetraploidía), constituyen la condición más común dentro del género (Quarin 1992). Si bien existe una gran diversidad de sistemas genéticos entre las especies de *Paspalum*, los estudios realizados hasta el momento fueron llevados a cabo en una o muy pocas plantas. Actualmente, la citometría de flujo resulta una excelente alternativa para la determinación del nivel de ploidía y el sistema reproductivo de individuos pertenecientes a una misma población, constituyendo un método eficiente, que permite analizar un gran número de plantas en poco tiempo.

Los resultados presentados en esta tesis muestran una gran variabilidad en los niveles de ploidía y sistemas reproductivos de los individuos de las 22 poblaciones estudiadas de 6 especies diferentes de *Paspalum*. Mientras que las poblaciones diploides se reproducen por sexualidad, los poliploides 3x, 4x, 5x y 6x se reproducen por la vía apomíctica. Si bien la apomixis fue el modo de reproducción de todos los individuos tetraploides que se analizaron, la mayoría presentó algún grado de sexualidad residual. Esto significa que estos individuos mantienen la capacidad para originar sacos embrionarios apospóricos y sacos embrionarios meióticos, en donde la ovocélula de estos últimos puede ser fecundada por un gameto masculino para producir un embrión de origen no materno ($n + n$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para algunas razas tetraploides naturales de *Paspalum notatum*, en las que se pudo determinar, mediante análisis cito-embriológicos y moleculares, que existen genotipos 4x naturales de reproducción apomíctica que conservan en mayor o menor grado algún potencial para la reproducción sexual (Ortiz *et al.* 1997,

Martínez *et al.* 2001, Espinoza *et al.* 2006, Rebozzio *et al.* 2010). Entre las poblaciones estudiadas en esta tesis, la frecuencia de individuos de origen no materno ($n + n$) varió desde el 2,5% para *P. nicorae* (población N3) hasta el 30% para *P. lividum* (población L1). Sin embargo no se observó sexualidad residual en los citotipos triploides, pentaploides y hexaploides. Además se determinó que algunos individuos de 10 de las poblaciones estudiadas, tuvieron la capacidad de producir semillas B_{III} ($2n + n$).

Por otra parte, los datos obtenidos en este estudio demostraron que no fue posible detectar plantas sexuales a nivel tetraploide u otro nivel poliploide. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en poblaciones naturales de *Paspalum simplex* (Urbani *et al.* 2002) y *P. notatum* (Daurelio *et al.* 2004). Hasta el momento no se encontró en la naturaleza ningún individuo $4x$ que se reproduzca exclusivamente por sexualidad. Sin embargo, plantas $4x$ 100% sexuales fueron obtenidas experimentalmente a partir de genotipos $2x$ por duplicación cromosómica con colchicina en 3 especies de *Paspalum*: *P. notatum* (Burton & Forbes 1960; Quarin *et al.* 2001), *P. simplex* (Cáceres *et al.* 1999), y *P. plicatulum* (Sartor *et al.* 2009). De manera similar, en *P. notatum* se obtuvieron dos plantas apomícticas facultativas luego de la duplicación cromosómica a partir de diferentes genotipos diploides (Quarin *et al.* 2001).

Reportes previos basados en estudios genéticos y moleculares concluyeron que la aposporia posee una herencia monogénica con una relación de segregación distorsionada y que el locus se encuentra situado en una región genómica caracterizada por una severa restricción en la recombinación (Martínez *et al.* 2001; Martínez *et al.* 2003; Stein *et al.* 2007). La apomixis es controlada por un factor dominante como se postuló para *P. notatum* (Martínez *et al.* 2001) y para otras especies como *Panicum maximum* (Savidan 1975), *Brachiaria sp.* (Ndikumana 1985; Valle *et al.* 1994) y *Ranunculus auricomus* (Nogler 1975). Por otra parte, los resultados obtenidos apoyan la idea de la existencia de sexualidad residual en los tetraploides apomícticos como fue

postulado por Asker & Jerling (1992), quienes cuestionaron la existencia de especies 100% apomícticas. Si la apomixis es controlada por un alelo dominante y la sexualidad residual existe en las poblaciones apomícticas, sería necesario realizar investigaciones adicionales para determinar por qué individuos 100% sexuales están ausentes en poblaciones silvestres de especies apomícticas de *Paspalum*.

Quarin (1992) describió un modelo de poliploidización, el cual es aplicable a un gran número de especies de *Paspalum*. Este modelo comprende citotipos diploides sexuales, triploides apomícticos (en baja frecuencia) y tetraploides apomícticos, siendo este último el nivel de ploidía más común en la mayoría de los casos. Los diploides sexuales desarrollan sacos embrionarios reducidos (n) como consecuencia de la megasporogénesis. Sin embargo, en muchas especies de *Paspalum*, puede ocurrir que algunos individuos diploides eventualmente produzcan sacos embrionarios apospóricos que pueden encontrarse en el mismo óvulo junto con los sacos meióticos normales (Norrman *et al.* 1989). Estudios realizados por Siena *et al.* (2008) demostraron que algunos de esos sacos embrionarios son funcionales y que cuando son fecundados por un gameto masculino reducido, originan plantas triploides ($2x + x = 3x$). Estos triploides pueden a su vez originar nuevos tetraploides, si un gameto femenino no reducido del triploide es fecundado por un gameto masculino reducido proveniente de una planta diploide o del mismo triploide ($3x + x = 4x$). Por otra parte, en poblaciones mixtas (diploide + tetraploide), un gameto $2n$ de un saco apospórico generado en plantas diploides puede eventualmente ser fecundado por un gameto reducido (n) de alguna planta $4x$ y originar nuevos genotipos tetraploides tal como se obtuvo experimentalmente en *Paspalum rufum* (Norrman *et al.* 1994). Sorprendentemente, el trabajo experimental realizado por Siena *et al.* (2008) mostró que cuando plantas diploides son expuestas a su propio polen haploide ($n = x$) y al polen reducido haploide de un tetraploide co-específico ($n = 2x$), se obtuvo descendencia poliploide a través de dos vías

diferentes: 82% fueron triploides producto de la autofecundación de un gameto femenino no reducido ($2x$) con un gameto masculino reducido (x) y 18% fueron tetraploides resultantes de fecundación cruzada entre un gameto femenino no reducido ($2x$) y un gameto masculino reducido ($2x$). Ninguno de los descendientes poliploides se originó por fecundación cruzada entre un gameto femenino reducido (x) y un gameto masculino reducido ($2x$). Estos resultados experimentales sugieren que en las poblaciones mixtas $2x-4x$, ocurre un proceso de poliploidización recurrente mediante la fecundación de gametos no reducidos de plantas diploides y no a través de la fecundación de gametos femeninos reducidos de plantas diploides por el polen de los representantes tetraploides. Dependiendo del nivel de ploidía de la fuente de polen ($n = x$ para diploides o $n = 2x$ para tetraploides) el poliploide resultante puede ser triploide o un nuevo tetraploide (Siena *et al.* 2008).

Es importante destacar que, en esta tesis, se encontraron plantas triploides en la población mixta $2x-4x$ de *P. denticulatum*. Estos triploides se reproducen por apomixis al igual que otros $3x$ encontrados en otras especies de *Paspalum* (Quarin *et al.* 1989). Dado que el trabajo experimental sugiere que los triploides se forman exclusivamente por gametos de diploides (ovocélulas no reducidas fecundadas por un núcleo espermático reducido), cabe suponer que en aquellas plantas diploides que eventualmente forman sacos apospóricos además de los sacos meióticos normales, existe una probabilidad de contener el gen o los genes para la apomixis, aunque el rasgo apenas se exprese a nivel diploide. Sin embargo, la poliploidización podría dar lugar a la expresión normal de la apomixis, tal como se produjo cuando se obtuvieron nuevos tetraploides inducidos con colchicina a partir de plantas diploides de *P. notatum* (Quarin *et al.* 2001). De hecho, Ramsey & Shemske (1998) propusieron que la ocurrencia de un puente triploide es uno de los mecanismos más prominentes para la formación de poliploides en poblaciones naturales. De manera similar, nuevos tetraploides pueden generarse por la unión de gametos haploides de razas

tetraploides y gametos no reducidos provenientes de razas diploides, como se describió para otras especies (Woodell & Valentine 1961, Bretagnolle & Lumaret 1995, Siena *et al.* 2008). Los resultados obtenidos en esta tesis en relación a *P. denticulatum* y *P. rufum* coinciden con lo postulado en cuanto a la ocurrencia de autotetraploidización recurrente basada en la fecundación de gametos no reducidos de ocasionales sacos apospóricos que puedan formar los citotipos diploides. Entonces, la combinación de la apomixis y la tetraploidía constituye, para estas dos especies y probablemente para muchas otras especies de *Paspalum*, la condición más eficaz para tener éxito en la naturaleza.

Las poblaciones de *P. nicorae* y *P. lividum* están formadas exclusivamente por plantas tetraploides. Previamente, Reis *et al.* (2008) analizaron 53 introducciones de *P. nicorae* de Rio Grande do Sul, Brasil y todas ellas fueron tetraploides. Basados en estudios citoembriológicos de 10 introducciones tetraploides de *P. nicorae*, Burson & Bennett (1970) consideraron a la especie de reproducción apomíctica obligada. Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis prueban que existe un pequeño grado de sexualidad residual, el cual fue detectado por citometría de flujo. Este hecho juega un rol importante en la generación de variación genotípica dentro de las poblaciones naturales de esta especie, como ocurre también en otros complejos agámicos, con efectos cuantitativamente elevados en un corto plazo (Hörandl & Paun 2007).

También se detectó una alta proporción de híbridos B_{III} (2n + n) en semillas obtenidas por polinización abierta a partir de plantas poliploides de *P. buckleyanum*, *P. denticulatum*, *P. nicorae* y *P. rufum*. Además en un ensayo complementario se sembraron semillas obtenidas en polinización abierta provenientes de plantas tetraploides de *P. nicorae* y *P. denticulatum* y se obtuvieron algunas plantas hexaploides. Considerando exclusivamente el nivel tetraploide de *P. denticulatum*, *P. nicorae* y *P. rufum*, se observó la formación de semillas B_{III} en algunas plantas tetraploides selectas de ocho poblaciones (D1, D2, D3, N1, N2, N3, R1, y R4). Curiosamente, no se encontró ninguna planta

hexaploide entre el total de 538 plantas tetraploides analizadas en estas ocho poblaciones. Los nuevos genotipos poliploides sólo sobreviven si son capaces de competir exitosamente con sus antecesores y otras especies por hábitats disponibles, lo que depende de su habilidad y capacidad para superar las desventajas minoritarias (De Wet 1980, Felber 1991). La ausencia de plantas hexaploides en las poblaciones tetraploides que usualmente forman semillas B_{III} (y también plántulas) sugiere que estos pueden ser seleccionados en contra, posiblemente debido a alguna desventaja adaptativa. Para determinar la naturaleza exacta de esta desventaja se necesitan estudios adicionales acerca del establecimiento y la persistencia de nuevos poliploides en el nivel tetraploide.

Paspalum buckleyanum es un caso particular con respecto a las demás especies estudiadas. Burson (1997) reportó datos citoembriológicos correspondientes a tres introducciones de esta especie para la región chaqueña en Paraguay y una introducción originaria de la región central de Argentina. Burson describió un citotipo diploide sexual, un citotipo tetraploide apomíctico facultativo y un citotipo pentaploide apomíctico obligado para Paraguay, mientras que la introducción proveniente de Argentina fue tetraploide y de reproducción apomíctica facultativa. Sin embargo, en tres de las poblaciones naturales estudiadas en esta tesis (provenientes del norte de Argentina y Paraguay) sólo se detectaron individuos hexaploides, mientras que en una cuarta población se encontraron plantas pentaploides, hexaploides y un raro individuo heptaploide. Resultados similares se obtuvieron del estudio adicional de plantas de 11 localidades de la región central de Argentina en las que nuevamente sólo se encontraron individuos 5x y 6x. Llamativamente, las plantas hexaploides de las poblaciones A2 y A3 también generaron semillas B_{III} (9x) en polinización abierta, pero tal como se indicó para el caso de las poblaciones tetraploides de las otras especies, no se encontraron plantas 9x en la naturaleza. Estos resultados son similares a los informados para *Potentilla argentea*. Para

esta especie no se encontraron plantas 9x en las poblaciones 6x analizadas, pero sí se cosecharon semillas 9x a partir de plantas 6x mantenidas bajo invernáculo (Holm & Ghatnekar 1996).

En *P. unispicatum*, las poblaciones U1 y U3 presentaron exclusivamente individuos diploides y tetraploides respectivamente. Sin embargo en la población U2, la mayoría de los individuos se identificaron como triploides (85,2%), entre los que también se encontraron algunos tetraploides. En *Paspalum*, los citotipos triploides generalmente forman parte de los complejos agámicos y se encuentran en una muy baja frecuencia en las poblaciones naturales, actuando como puente de transferencia de genes desde los diploides sexuales coespecíficos a sus contrapartes tetraploides (Quarin 1992). Sin embargo en el caso de *P. unispicatum*, los triploides no estarían actuando exclusivamente como puentes para transferir genes entre diploides y tetraploides, sino que en combinación con la apomixis constituirían un sistema más exitoso para competir y adaptarse en los hábitat disponibles. Este tipo de triploides apomícticos exitosos se observó también en *P. quadrifarium*, en donde los triploides constituyen el citotipo más comúnmente encontrado debido a su amplia distribución geográfica (Quarin & Lombardo 1986, Norrmann *et al.* 1989).

VI.2.- Variabilidad genética

Un complejo agámico constituye una unidad evolutiva, en la cual los ecotipos sexuales y sus contrapartes apomícticas se encuentran en diferentes niveles de ploidía, siendo mayoritariamente diploides sexuales y tetraploides apomícticos (Savidan 2000). Para el género *Paspalum*, Quarin (1992) propuso un modelo de flujo génico que involucra como componentes del sistema a individuos con distintos niveles de ploidía y diferentes modos de reproducción: individuos $2x$ sexuales y $4x$ apomícticos, además de eventuales $3x$ como puente entre ambos citotipos. De acuerdo a este modelo, en *Paspalum* la variabilidad puede generarse mediante recombinación sexual en los $2x$ y pasar al nivel poliploide por medio de las hibridaciones que involucrarían gametos $2n$ y n en dos eventos sucesivos: en el primero, una ocasional ovocélula no reducida ($2n$) de una planta diploide es fecundada por un gameto reducido (n) también de una planta diploide y originarían un triploide; y en el segundo evento, el triploide puede producir nuevos tetraploides apomícticos al formar híbridos B_{III} ($2n + n$) combinando ovocélulas no reducidas ($2n = 3x$) con gametos reducidos ($n = x$) de los diploides circundantes. Esto indica que el flujo génico tiene un solo sentido y va desde los diploides sexuales y alógamos hacia los tetraploides apomícticos. Sin embargo, en una población mixta $2x/4x$ podrían generarse nuevos genotipos $4x$ por eventos de hibridación entre gametos femeninos no reducidos ($2n$) de los $2x$ fecundados con gametos reducidos (n) de los $4x$ circundantes. Este mecanismo de poliploidización fue demostrado experimentalmente en otras especies de *Paspalum* mediante cruzamientos inter e intraespecíficos entre $2x$ y $4x$ (Quarin *et al.* 1984, Quarin & Norrmann 1987, Norrmann *et al.* 1994, Quarin *et al.* 1998, Siena *et al.* 2008).

Existen antecedentes en la literatura donde se estudió el flujo de genes y el nivel de variabilidad genética en poblaciones integrantes de complejos agámicos. Entre estos estudios se encuentran los realizados en los géneros

Antennaria (Bayer 1990), *Bohemeria* (Yahara 1990), *Taraxacum* secc. *Ruderalia* (Menken *et al.* 1995) y *Amelanchier* (Campbell *et al.* 1999). Para estos géneros los investigadores demostraron que la variabilidad de las poblaciones apomícticas simpátricas con sus razas sexuales es considerablemente superior en relación a las que son alopátricas con su contraparte sexual. En contraposición a esto, Hörandl *et al.* (2001) estudiaron poblaciones del complejo agámico de *Ranunculus auricomus* y hallaron que una población apomíctica simpátrica con una sexual tiene un patrón de variabilidad similar y en algún caso más deprimido que otras poblaciones que son alopátricas. En particular dentro del género *Paspalum*, son escasos los estudios que involucran el análisis de la variabilidad genética poblacional. Daurelio *et al.* (2004) determinaron la variabilidad intra e interpoblacional en tres poblaciones de *P. notatum*: una diploide sexual y dos tetraploides apomícticas, de las cuales una de ellas se encontraba en simpatría con la raza sexual. Estos autores encontraron mayores niveles de variabilidad genética en la población tetraploide apomíctica simpátrica con la población diploide sexual que en la otra población apomíctica, pero alopátrica con la raza sexual. Resultados similares fueron hallados del análisis de la variabilidad genética de 2 poblaciones diploides sexuales y 4 poblaciones tetraploides apomícticas de *P. simplex*, una de ellas simpátrica con una población diploide. Los indicadores de variabilidad mostraron que la población 4x simpátrica con su contraparte diploide posee una variabilidad genética más elevada que las 4x alopátricas con las 2x (Urbani 2004).

Independientemente del nivel inicial de variabilidad que presenten las poblaciones constituidas por razas poliploides, la misma puede mantenerse o eventualmente verse incrementada mediante la generación de nuevas variantes genotípicas originadas por la vía sexual y/o a través de mutaciones (Hörandl & Paun 2007).

Los resultados del estudio de la variabilidad genética determinada con AFLP de 16 poblaciones pertenecientes a las 6 especies de *Paspalum* analizadas en

esta tesis, muestran que existe heterogeneidad en cuanto a los niveles de diversidad genética que pueden encontrarse en los complejos agámicos. En particular para las poblaciones de *P. denticulatum*, los indicadores de variabilidad genética calculados en esta tesis mostraron resultados similares a los reportados por Daurelio *et al.* (2004) y Urbani (2004). De las tres poblaciones estudiadas para esta especie, la población mixta D3 fue la más variable. En ella se encontraron coexistiendo plantas diploides sexuales junto a 2 plantas triploides apomícticas y 8 plantas tetraploides apomícticas facultativas. La variabilidad genética más elevada de esta población se debe principalmente al sistema reproductivo de los integrantes diploides. En general, las gramíneas sexuales y alógamas por autoincompatibilidad presentan niveles elevados de variabilidad genética intrapoblacional debido a la polinización cruzada entre diferentes genotipos (Huff *et al.* 1993). Los individuos tetraploides de esta misma población (D3) tuvieron también una mayor variabilidad con respecto a las poblaciones tetraploides puras D1 y D2. Este es un indicio de que en la población D3 se estarían incorporando nuevas combinaciones genotípicas a nivel tetraploide a partir de plantas 2x mediante la generación eventual de individuos triploides apomícticos que actuarían como puentes del flujo génico. Nuevos genotipos tetraploides podrían también originarse a partir de un proceso de poliploidización recurrente en donde los gametos femeninos no reducidos (2n) de los diploides son fecundados por gametos reducidos (2n) provenientes de las plantas tetraploides. Estos mecanismos generadores de nuevas combinaciones genotípicas en la población mixta 2x/4x serían los principales responsables de que D3 sea genéticamente más variable que las otras poblaciones 4x donde no existe contacto con plantas 2x. Además, si consideramos que los individuos tetraploides conservan cierto grado de sexualidad residual, esto también contribuye al incremento de los niveles de variabilidad en este citotipo. Las poblaciones formadas exclusivamente por individuos 4x apomícticos facultativos (D1 y D2) son genéticamente más

uniformes y presentaron uno o dos genotipos que predominaron en estas poblaciones además de algunos otros genotipos que se encuentran en muy baja frecuencia. Este mismo patrón de distribución genotípica es frecuentemente observado en las poblaciones de especies apomícticas (Gornall 1999, Hörandl *et al.* 2001). En estas poblaciones, la sexualidad ocasional es el principal mecanismo generador de variabilidad genética. Según Hörandl & Paun (2007), la recombinación producida por la apomixis facultativa puede jugar un rol crucial en la creación de variación genotípica de los complejos agámicos debido a que este presenta los mayores efectos cuantitativos en un corto plazo.

Las poblaciones apomícticas presentan una estructura y dinámica que resulta comparable a la de las poblaciones de especies autógamias, en donde predominan los genotipos mejor adaptados. En aquellas poblaciones apomícticas con un número reducido de genotipos es probable que la diversidad genotípica se encuentre mayormente particionada entre poblaciones y en menor grado dentro de las poblaciones (Stebbins 1950, Nybom 2004). En las tres poblaciones de *P. denticulatum*, donde la variabilidad intra e interpoblacional aportan en partes iguales a la variabilidad total, las poblaciones estarían aún en un proceso de diferenciación entre ellas. En la población mixta, los altos niveles de variabilidad se mantienen por tratarse de una población constituida principalmente por plantas diploides sexuales. Los genotipos presentes en las poblaciones tetraploides puras podrían haber surgido de la población diploide, a partir de la cual se expandieron y colonizaron nuevos habitats gracias a las ventajas adaptativas que le proporciona su condición de poliploides apomícticos.

Entre las poblaciones de *P. rufum* se observó que la variabilidad genética fue mayor en la población constituida exclusivamente por plantas diploides sexuales. A nivel poliploide, la variabilidad genética de la población donde los tetraploides coexisten con los diploides, fue mayor que en la población tetraploide alopátrica, población que se encuentra distanciada geográficamente

de su contraparte sexual. Nuevamente, estos resultados concuerdan con los estudios de Daurelio *et al.* (2004) y Urbani (2004), quienes observaron una mayor diversidad genética en las poblaciones diploides que en las poblaciones tetraploides y mayor diversidad en las poblaciones simpátricas que en las alopátricas con las razas sexuales. Llamativamente, en la población mixta 2x-4x de *P. rufum*, la variabilidad fue mayor a nivel tetraploide, raza que además predominó en esta población. Esta situación podría tener dos explicaciones: a) que los genotipos diploides estén generando continuamente nuevos tetraploides, los que debido a la ventaja adaptativa que les proporciona la combinación entre poliploidía y apomixis, estén desplazando de la población a sus ancestros diploides; ó b) que alguno de los genotipos tetraploides apomícticos produzca eventualmente sacos embrionarios reducidos (2x) y a partir de estos se generen por partenogénesis nuevos genotipos dihaploides ($n + 0$). Si bien hasta el momento no fueron detectados dihaploides para ninguna de las especies de *Paspalum* estudiadas, los mismos fueron reportados para otras especies que forman complejos agámicos (De Wet 1968; Savidan & Pernès 1982). De cualquier modo, serían necesarios estudios adicionales para poder explicar el comportamiento del flujo génico en esta población mixta 2x/4x de *P. rufum*.

Entre las especies apomícticas, la presencia de un gran número de genotipos es esperable en poblaciones antiguas, sobre las cuales es posible observar el efecto de las fuerzas generadoras de variabilidad, tales como la sexualidad residual y las mutaciones (Paun *et al.* 2006a, Richards 2003). Este parece ser el caso de *P. nicorae*, en donde las tres poblaciones estudiadas presentaron valores elevados de diversidad genotípica con valores de diversidad de genotipos multilocus y uniformidad genotípica iguales o cercanos a 1 y donde los niveles de diversidad genética fueron mayores que los valores promedio determinados para la mayoría de las especies apomícticas (Ellstrand & Roose 1987, Gornall 1999, Chapman *et al.* 2000, Mes *et al.* 2002).

La población L1 de *P. lividum* también presentó una elevada diversidad genotípica, donde se detectaron 14 genotipos entre los 20 individuos analizados. Sin embargo, la diversidad genética de esta población fue similar a los valores encontrados para otras especies apomícticas (Ellstrand & Roose 1987, Gornall 1999, Chapman *et al.* 2000, Mes *et al.* 2002).

A diferencia de la mayoría de las especies de *Paspalum*, donde las poblaciones poliploides están constituidas principalmente por individuos tetraploides, las tres poblaciones de *P. buckleyanum* que fueron seleccionadas para este análisis, estuvieron constituidas sólo por individuos hexaploides. El grado de diversidad genética de estas poblaciones fue mínimo y cada una de ellas estuvo constituida por un único genotipo que se encuentra representado en el 100% de la población. Si bien ejemplos de poblaciones uniclonales raramente fueron encontrados en estudios que involucran marcadores moleculares de alta resolución, en *Ranunculus carpaticola* se detectaron poblaciones 6x uniclonales a partir del estudio de la diversidad genética utilizando marcadores de AFLP (Paun *et al.* 2006a). Estos autores sugieren que en las poblaciones 6x uniclonales de *R. carpaticola*, la falta de variabilidad se debe a que: 1) las mismas son de formación reciente; 2) no se producen eventos de sexualidad o bien existe una fuerte presión de selección en contra de los genotipos que puedan originarse por sexualidad residual. Estos mismos mecanismos son los que podrían estar actuando en las poblaciones 6x apomícticas de *P. buckleyanum*. Los citotipos 6x podrían haber surgido a partir de citotipos tetraploides a través de la fecundación de gametos femeninos no reducidos con polen reducido generando híbridos B_{III}. A su vez, estos nuevos genotipos hexaploides pudieron haber sido exitosos para competir con sus antecesores tetraploides y con otras especies colonizando rápidamente los hábitats disponibles a través de la reproducción apomíctica. Si bien no se encontraron plantas tetraploides en las poblaciones estudiadas de *P. buckleyanum*, existen estudios cito-embriológicos que revelan la existencia de

este nivel de ploidía para esta especie (Burson 1997). No se conoce si estos tetraploides tuvieron la capacidad de producir híbridos B_{III}; sin embargo este mecanismo de poliploidización es un fenómeno que se presenta en razas 4x de varias especies de *Paspalum* (Quarin & Hanna 1980, Urbani *et al.* 2002, Rebozzio *et al.* 2010). De hecho en esta tesis se detectó que las razas 4x de *P. denticulatum*, *P. lividum*, *P. nicorae* y *P. rufum* producen semillas 6x en polinización libre.

En *P. unispicatum*, las poblaciones puras diploides y tetraploides (identificadas como U1 y U3 respectivamente), al igual que la población mixta U2 constituida por plantas triploides y algunos tetraploides, mostraron valores máximos de diversidad de genotipos. Sin embargo, la diferenciación entre los genotipos de cada población fue mayor para la población diploide. Esto podría estar relacionado con el modo de reproducción de cada raza, ya que en general los citotipos diploides de las especies de *Paspalum* se reproducen por sexualidad mientras que los poliploides son de reproducción apomíctica (Quarin 1992), lo que podría estar influyendo en los niveles de variabilidad genética encontrado en las poblaciones de *P. unispicatum*. Sin embargo, sería necesario determinar el modo de reproducción de los individuos de las poblaciones *P. unispicatum* para poder relacionar este carácter con el nivel de variabilidad encontrado en cada población.

VI.3.- *Tamaño del genoma*

Los valores de contenido absoluto de ADN nuclear estimados por citometría de flujo en las especies analizadas en esta tesis (con valores 1C menores a 2pg) ponen en evidencia el bajo contenido de ADN de estas 6 especies de *Paspalum*. Leitch *et al.* (1998) realizó una clasificación del tamaño del genoma de las angiospermas en base al valor 1C de contenido de ADN de 2802 especies. Según el criterio propuesto por Leitch *et al.* (1998), las especies con valores de 1C menores o iguales a 1,4pg y valores entre 1,4 y 3,5pg se clasifican como especies de tamaño de genoma muy pequeño y pequeño respectivamente. Especies con valores de 1C mayores a 14pg y mayores a 35pg se definen como especies con tamaño de genoma grande y muy grande respectivamente. Los valores de contenido entre 3,51 y 13,99pg son considerados como tamaños de genoma intermedios. Según esta clasificación, *P. denticulatum*, *P. unispicatum* y *P. lividum*, incluyendo los distintos citotipos detectados en cada caso, poseen genomas muy pequeños (entre 0,61 y 1,38pg). El citotipo diploide de *P. rufum* también se encuentra incluido en esta categoría, mientras que las razas tetraploides se incluyen en la categoría de genomas pequeños, al igual que los tetraploides de *P. nicorae* y los niveles pentaploides y hexaploides de *P. buckleyanum*.

Estudios sobre el contenido de ADN de algunas especie del género *Paspalum* fueron reportados previamente por Jarret *et al.* (1995) y Vaio *et al.* (2007). Los valores 2C de contenido de ADN obtenidos en estos trabajos variaron entre 1,02 y 3,86pg, valores que pueden ser comparables con los resultados observados en las 6 especies analizadas en esta tesis, cuyos valores oscilaron entre 1,23pg en *P. denticulatum* y 3,93pg en *P. buckleyanum*.

Por otra parte, Bennetzen & Kellogg (1997) propusieron que la evolución del tamaño del genoma en las plantas sería en gran medida unidireccional, con un patrón general de crecimiento como resultado de la influencia combinada de la

poliploidía y la acumulación de retroelementos, sugiriendo que las plantas tienen un “billete sin retorno” a la obesidad genética. Los resultados del análisis del tamaño del genoma obtenidos en esta tesis parecen estar en coincidencia con la hipótesis del crecimiento unidireccional del genoma planteada por Bennetzen & Kellogg (1997). El contenido de ADN expresado en valor 2C para los citotipos diploides varió entre 1,34 y 1,64pg mientras que los poliploides presentaron valores que variaron desde 1,95pg para el triploide de *P. denticulatum* hasta 3,93pg para el hexaploide de *P. buckleyanum*. Por otra parte, en todas las especies con más de un nivel de ploidía, el contenido de ADN de los poliploides de orden superior fue proporcional al contenido de sus contrapartes diploides y/o poliploides de orden inferior, lo cual indicaría la ausencia de mecanismos que alteren el tamaño del genoma, tales como el proceso de reducción del genoma postulado por Leitch & Bennett (2004). Este efecto aditivo en el aumento del tamaño del genoma fue también observado en otras especies poliploides (Suda *et al.* 2007, Eilam *et al.* 2009).

VII.- CONCLUSIONES

VII.- Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que efectivamente existe una gran heterogeneidad en los sistemas de ploidía de las especies de *Paspalum* aquí estudiadas. En el caso de *P. buckleyanum*, *P. denticulatum*, *P. rufum* y *P. unispicatum* se identificaron diferentes citotipos, desde diploides hasta hexaploides, los cuales se encuentran constituyendo poblaciones puras, formadas por individuos con un mismo nivel de ploidía y/o poblaciones mixtas, en donde coexisten plantas con diferentes números cromosómicos. Sin embargo en *P. nicorae* y *P. lividum*, la única raza encontrada en la naturaleza es la tetraploide, por lo que las poblaciones son totalmente homogéneas. Probablemente existan o hayan existido poblaciones de citotipo $2x$, pero las mismas no fueron detectadas en los muestreos que se realizaron para estas especies.

Con respecto al análisis del sistema reproductivo de las especies que se estudiaron en este trabajo, podemos decir que estos concuerdan con el modelo postulado para los complejos agámicos de *Paspalum* donde los citotipos diploides se reproducen por sexualidad y los poliploides se reproducen por apomixis. Entre las especies analizadas, el nivel tetraploide es el más frecuentemente encontrado y la reproducción apomíctica de los individuos $4x$ no es obligada, sino que los mismos conservan en mayor o menor grado, la capacidad de generar progenies por la vía sexual. Si bien el potencial para la sexualidad alcanzó valores de hasta un 30%, ninguno de los tetraploides analizados fue 100% sexual, por lo que aún resta conocer cuáles son los mecanismos por los que la sexualidad total no se encuentra en las poblaciones tetraploides naturales del género *Paspalum*.

Todas las razas poliploides apomícticas que fueron analizadas tienen la facultad de producir semillas y en algunos casos hasta plántulas $2n + n$ (híbrido

B_{III}). Este tipo de progenie se origina por una falla en la partenogénesis de la ovocélula no reducida de un saco embrionario apospórico. En consecuencia, se produce la fecundación de la misma, provocando un aumento en el nivel de ploidía. No obstante, estos poliploides no se encuentran en las poblaciones naturales de la mayoría de las especies, seguramente por presentar algún tipo de desventaja adaptativa frente a los citotipos ya establecidos en dichas poblaciones.

Cabe destacar que la técnica de citometría de flujo resultó ser una herramienta valiosa para el estudio del nivel de ploidía y del sistema reproductivo en las poblaciones naturales, ya que permitió analizar en total 1351 individuos y 2570 semillas maduras.

En cuanto al estudio de la variabilidad genética de las poblaciones, los resultados demostraron que los marcadores moleculares del tipo AFLP constituyen un sistema eficiente para determinar la diversidad genotípica y genética de las poblaciones naturales de *Paspalum*. Las poblaciones diploides de reproducción sexual y alógamas por autoincompatibilidad presentaron mayores niveles de variabilidad, resultados que están estrechamente vinculados al modo de reproducción de estos individuos. Entre las poblaciones constituidas por citotipos poliploides y apomícticos existe un amplio rango de variabilidad genética: desde poblaciones constituidas por un único genotipo, hasta poblaciones multiclonales donde la mayoría de los individuos representan genotipos diferentes. En las poblaciones uniclonales, la falta de variabilidad podría ser consecuencia de un origen reciente de dichas poblaciones, en las que los eventos generadores de variación tales como la sexualidad residual y las mutaciones están ausentes o se dan en una baja frecuencia que impide la detección. En cambio, las poblaciones multiclonales con los mayores porcentajes de diversidad podrían tener un origen más antiguo, por lo que es posible detectar en ellas los efectos de los procesos responsables de generar

variabilidad en las poblaciones apomícticas. Por otra parte, entre los citotipos tetraploides apomícticos que coexisten con razas diploides sexuales, la variabilidad genética es mayor que en aquellas poblaciones aisladas geográficamente de los diploides. El hallazgo de individuos triploides en estas poblaciones mixtas confirmaría una de las hipótesis de flujo génico. Es decir, que en algunas especies de *Paspalum* existe flujo génico entre diploides y tetraploides y que estos citotipos estarían formando una unidad evolutiva cohesiva en la cual el conjunto de genes es compartido por las razas que conforman el complejo agámico.

El análisis del contenido absoluto de ADN determinado para cada uno de los citotipos de las 6 especies de *Paspalum* mostró que las especies son heterogéneas y que en comparación con otras angiospermas presentaron tamaños de genomas muy pequeños a pequeños. En las especies con más de un citotipo, existió un incremento unidireccional en el contenido de ADN el cual fue además proporcional al aumento en el nivel de ploidía. La presencia de niveles significativos de variación dentro y entre las especies de *Paspalum* indica que la estimación del contenido de ADN puede ser útil para la caracterización de las especies y sus diferentes citotipos.

El conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis pone en evidencia la gran diversidad y dinámica existente entre los sistemas genéticos de los complejos agámicos del género *Paspalum*. Esta es la primera vez que se realiza el estudio de un gran número de individuos de una misma población y a su vez, de un gran número de poblaciones naturales, las que además corresponden a 6 especies diferentes.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Adams KL, Cronn R, Percifield R & Wendel JF (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions on the transcriptome and organ-specific silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4649-4654.
- Adams KL & Wendel JF (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends in Genetics* **21**: 539-543.
- Asker SE & Jerling L (1992) Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Babcock E & Stebbins G L JR (1938) The American species of *Crepis*: their interrelationships and distribution as affected by polyploidy and apomixis. Carnegie Institution Washington Publication Number 504.
- Bashaw EC, Hovin AW & Holt EC (1970) Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. Norman MJT (ed.), *Proceed International Grassland Congress*, 11th, Surfers Paradise, QLD, Australia. 13–23 Apr. 1970. St. Lucia: University of Queensland Press. 245–248.
- Bashaw EC, Hussey MA & Hignight KW (1992) Hybridization ($n+n$ and $2n+n$) of facultative apomictic species in the *Pennisetum* agamic complex. *International Journal of Plant Science* **153**: 466-470.
- Battaglia E (1963) Apomixis. Maheshwari P (ed.), Recent advances in the embryology of angiosperms. Indian Society of Plant Morphologists, New Delhi, India, pp. 221-264.
- Bayer RJ (1990) Patterns of clonal diversity in the *Anntenaria rosea* (Asteraceae) polyploid agamic complex. *American Journal of Botany* **77**: 1313-1319.
- Beaman JH (1957) The systematic and evolution of *Townsendia* (Compositae). *Contributions of the Gray Herbarium of Harvard University* **183**: 1-151.
- Bennetzen J & Kellogg EA (1997) Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? *The Plant Cell* **9**: 1509-1514
- Berthaud J (2001) Apomixis and the management of genetic diversity. Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T (eds.), *The flowering of apomixis: From mechanisms to*

- genetic engineering*. México, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR) pp. 8-23.
- Bierzychudek P (1985) Patterns in plant parthenogenesis. *Experientia* **41**: 1255-1264.
- Birky CW (1996) Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics* **144**: 427-437.
- Braun A (1857) Über Parthenogenesis bei Pflanze. *Abhandlungen der Königlich Böhmisches Gesellschaft der Wissenschaften* **1856**: 311-346.
- Bretagnolle F & Lumaret R (1995) Bilateral polyploidization in *Dactylis glomerata* L. subsp. *Lusitanica*—occurrence, morphological and genetic characteristics of first polyploids. *Euphytica* **84**: 197-207.
- Bretagnolle F & Thompson JD (1995) Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* **129**: 1-22.
- Bretagnolle F & Thompson JD (1996) An experimental study of ecological differences in winter growth between sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. *Journal of Ecology* **84**: 343-351.
- Burkart A (1969) Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Colección Científica, Instituto de Tecnología Agropecuaria 62: 551 pp.
- Burson BL (1975) Cytology of some apomictic *Paspalum* species. *Crop Science* **15**: 229-232.
- Burson BL (1983) Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. Proceedings of the XIV International Grassland Congress. Kentucky, USA pp. 170-173.
- Burson BL (1989) Phylogenetic of apomictic *Paspalum dilatatum*. Proceedings of the XVI International Grassland Congress. Nice, France pp. 413-414.
- Burson BL (1997) Apomixis and sexuality in some *Paspalum* species. *Crop Science* **34**: 1347-1351.

- Burson BL & Bennett HW (1970) Cytology, method of reproduction, and fertility of Brunswickgrass, *Paspalum nicorae* Parodi. *Crop Science* **10**: 184-187.
- Burson BL & Bennett HW (1971) Chromosome numbers, microsporogenesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum* species. *Crop Science* **11**: 292-294.
- Burton GW (1948) The method of reproduction in common bahia grass, *Paspalum notatum*. *Journal of the American Society of Agronomy* **40**: 443-452.
- Burton GW & Forbes Jr (1960) The genetics and manipulation of obligate apomixis in Common bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge). En: Proceedings of the XVI International Grassland Congress. Oxford, Gran Bretaña pp. 66-71.
- Burton GW & Hanna WW (1986) Bahiagrass tetraploids produced by making (apomictic tetraploid x diploid) x diploid hybrids. *Crop Science* **26**:1254-1256
- Cabrera AL (1994) Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: Kugler, W. (ed.), *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*, 2º ed., **2** (1), 85 pp.
- Cáceres ME, Pupilli F, Quarin CL & Arcioni S (1999) Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica* **110**: 161-167.
- Campbell CS, Alice LA & Wright WA (1999) Comparisons of within-population genetic variation in sexual and agamosperous *Amelanchier* (Rosaceae) using RAPD markers. *Plant Systematic and Evolution* **215**: 157-167.
- Carino DA & Daehler CC (1999) Genetic variation in an apomictic grass, *Heteropogon contortus*, in the Hawaiian Islands. *Molecular Ecology* **8**: 2127-2132.
- Chapman HM, Parh D & Oraguzie N (2000) Genetic structure and colonising success of a clonal weedy species, *Pilosella officinarum* (Asteraceae). *Heredity* **84**: 401-409.
- Chase A (1929) The North American species of *Paspalum*. *Contributions from the United States National Herbarium* Vol. 28: Part 1.
- Clayton WD & Renvoize SA (1986) Genera Graminum. *Grasses of the World*. Kew Bulletin Addit. Ser. XIII, London.

- Combes D (1975) Polymorphisme et modes de reproduction dans la section des *Maximae* du genre *Panicum* (Graminées) en Afrique. Mémoires ORSTOM (Paris) **77**: 1-100.
- Combes D & Pernès J (1970) Variations dans les nombres chromosomiques de *Panicum maximum* en relation avec le mode de reproduction. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences*, **270**: 782-785.
- Cosendai AC & Hörandl E (2010) Cytotype stability, facultative apomixis and geographical parthenogenesis in *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). *Annals of Botany* **105**: 457-470.
- Crane CF (2001) Classification of apomictic mechanisms. Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T (eds.), *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR) pp. 24-43.
- Darlington CD (1939) The evolution of genetic systems. Cambridge, UK: Cambridge University Press, London.
- Daurelio LD, Espinoza F, Quarin CL & Pessino SC (2004) Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematic and Evolution* **244**: 189-199.
- Davidse G & Pohl RW (1972) Chromosome numbers and notes on some Central American grasses. *Canadian Journal of Botany* **50**: 273-283.
- Davidse G & Pohl RW (1974) Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on tropical American grasses (Gramineae). *Canadian Journal of Botany* **52**: 317-328.
- Dellaporta SL, Wood J & Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19-21.
- Denham SS, Morrone O & Zuloaga FO (2010) Estudios en el género *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae): *Paspalum denticulatum* y especies afines. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **97**: 11-33.

- den Nijs JCM & Menken SBJ (1996) Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. En: Hind DJN & Beentje HJ (eds.) *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994*. Royal Botanic Gardens, Kew pp. 665-677.
- Dermen H (1931) Polyploidy in *Petunia*. *American Journal of Botany* **18**:250-61.
- De Wet JM (1968) Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. *Evolution* **22**: 394 -397.
- De Wet JM (1980) Origins of Polyploids. En: Grant WF (ed.) *Plant biosystematics*, Academic Press, Toronto, New York pp 3-15.
- De Wet JM & Harlan JR (1970) Apomixis, polyploidy and speciation in *Dichanthium*. *Evolution* **24**: 270-277.
- De Wet J M & Stalker HT (1974) Gametophytic apomixis and evolution in plants. *Taxon* **23**:689-697.
- Doležel J & Bartoš J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* **98**: 99-110.
- Dujardin M & Hanna WW (1988) Cytology and breeding behavior of a partially fertile triploid pearl millet. *Journal of Heredity* **79**: 216-18.
- Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Feldman M (2009) Genome size in natural and synthetic autopolyploids and in a natural segmental allopolyploid of several Triticeae species. *Genome* **52**(3): 275-85.
- Elliot FC (1958) *Plant Breeding and Cytogenetics*, McGraw Hill Book Company, Inc. pp.136-178.
- Ellstrand NC & Roose ML (1987) Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**: 123-131.
- Endler JA (1977) *Geographic variation, speciation and clines*. Princeton University Press, Nueva Jersey 246 pp.

- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM & Quarín CL (2006) Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematic and Evolution* **258**: 147-159.
- Federov A (1969) Chromosome numbers in flowering plants. Academy of Sciences of the U.S.S.R., Leningrad, Russia.
- Felber F (1991) Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: effect of relative fitness of the cytotype. *Journal of Evolutionary Biology* **4**: 195-207.
- Forbes I Jr & Burton GW (1961) Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Science* **1**: 402-406.
- Fowler NL & Levin DA (1984) Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. *The American Naturalist* **124**: 703-711.
- Gornall RJ (1999) Population genetic structure in agamosperous plants. En: Hollingsworth PM, Bateman RM & Gornall RJ (eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, Londres pp. 118-138.
- Gould FW (1958) Chromosome numbers in southwestern grasses. *American Journal of Botany* **45**:757-767.
- Gould FW (1968) Chromosome numbers of Texas grasses. *Canadian Journal of Botany* **47**: 315-325.
- Grant V (1971) Plant speciation. Columbia University Press, New York.
- Grant V (1981) Polyploidy. Columbia University Press, New York pp. 283-352.
- Greilhuber J, Lysák M, Doležel J, Bennett MD (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size', and 'C value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* **95**: 255-260.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, González de León D & Savidan Y (1998) Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity* **80**: 33-39.

- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E & Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics* **17**: 597-604.
- Grossniklaus U (2001). From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. En: Savidan Y, Carman JG & Dresselhaus T (eds.) *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR) pp. 186-211.
- Gustafsson A (1943) The genesis of the European blackberry flora. *Lunds Universitets Årsskrift* **39**: 1-200.
- Hamrick JL & Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. En: *Plant populations: Genetics breeding and genetic resources*. Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL & Weir BS (eds.), Sinauer, Sunderland, MA pp. 43-63.
- Hanna WW & Bashaw EC (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science* **27**: 1136-1139.
- Hanna WW & Burton GW (1986) Cytogenetics and breeding behavior of an apomictic triploid in bahiagrass. *Journal of Heredity* **77**: 457-459.
- Harlan JR, Brooks MH, Borgaonkar DS & De Wet JMJ (1964) Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Botanical Gazette* **125**: 41-46.
- Harlan JR & De Wet JMJ (1975) On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *The Botanical Review* **41**: 361-389.
- Hegarty MJ & Hiscock SJ (2005) Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist* **165**: 411-423.
- Heilborn O (1934) On the origin and preservation of polyploidy. *Hereditas* **19**: 233-242.
- Heslop-Harrison JS & Schwarzacher T (1996) Genomic southern and in situ hybridization for plant genome analysis. En: Jauhar PP (ed.) *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida pp. 163-179.
- Hickman JC (1993) *The Jepson Manual: Higher plants of California*. University of California Press. Berkeley, California.

- Hijmans RJ, Guarino L, Bussin KC, Mathur P, Cruz M, Barrantes I, Rojas E (2004) DIVA-GIS, sistema de información geográfica para el análisis de datos de distribución de especies, <http://www.diva-gis.org>.
- Hojsgaard D, Honfi AI, Rua G, Daviña J (2009) Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**: 533-545.
- Hollingshead L (1930). Cytological investigations of hybrids and hybrid derivatives of *Crepis capillaris* and *Crepis tectorum*. University of California. Publisher. *Agricultural Science* **6**: 55-94.
- Holm S & Ghatnekar L (1996) Apomixis and sexuality in hexaploid *Potentilla argentea*. *Hereditas* **125**: 53-60.
- Honfi AI (2003) Citoembriología de poliploides impares en el género *Paspalum* L. (Panicoideae: Gramineae). Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Córoba.
- Hörandl E (2004) Comparative analysis of genetic divergence among sexual ancestors of apomictic complexes using isozyme data. *International Journal of Plant Science* **165**: 615-622.
- Hörandl E (2006) The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytologist* **171**: 525-538.
- Hörandl E, Dobeš C & Lambrou M (1997) Chromosomen- und Pollenuntersuchungen an österreichischen Arten des apomiktischen *Ranunculus auricomus*-Komplexes. *Botanica Helvetica* **107**: 195-209.
- Hörandl E & Greilhuber J (2002) Diploid and autotetraploide sexuals and their relationship to apomicts in the *Ranunculus cassubicus* group: insights from DNA content and isozyme variation. *Plant Systematics and Evolution* **234**: 85-100.
- Hörandl E, Greilhuber J & Dobeš C (2000) Isozyme variation within the apomictic *Ranunculus auricomus* complex: evidence for a sexual progenitor species in southeastern Austria. *Plant Biology* **2**: 1-10.

- Hörandl E & Gutermann W (1998) Der *Ranunculus auricomus*-Komplex in Österreich 1. Methodik; Gruppierung der mitteleuropäischen Sippen. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **120**: 1-44.
- Hörandl E, Jakubowsky G & Dobes C (2001). Isozyme and morphological diversity within apomictic and sexual taxa of the *Ranunculus auricomus* complex. *Plant Systematics and Evolution* **226**: 165-185.
- Hörandl E & Paun O (2007) Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials and ecology. Hörandl E, Grossniklaus U, Van Dijk PJ, Sharbel T (eds.) *Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives*. ARG-Gantner Ruggell; Liechtenstein pp. 169-174.
- Hornsey KG (1973) The occurrence of hexaploid plants among autotetraploide populations of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), and the production of tetraploid progeny using a diploid pollinator. *Caryologia* **26**: 225–28.
- Houliston GJ & Chapman HM (2004) Reproductive strategy and population variability in the facultative apomict *Hieracium pilosella* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **91**: 37-44.
- Huff DR, Peakall R & Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetic* **86**: 927-934.
- Husband BC (2000) Constraints on polyploid evolution: a test of the minority cytotype exclusion principle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**: 217-223
- Husband BC & Schemske DW (1997) The effect of inbreeding in diploid and tetraploid populations of *Epilobium angustifolium* (Onagraceae): implications for the genetic basis of inbreeding depression. *Evolution* **51**: 737-746
- InfoStat (2002) InfoStat versión 1.1. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Société Vaudoise des Sciences Naturelles. Bulletin* **44**: 223–270.

- Jarret RL, Ozias-Atkins P, Phatak S, Nadimpalli R, Duncan R & Hiliard S (1995) DNA contents in *Paspalum spp.* determined by flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution* **42**: 237–242.
- Johnsson H (1940) Cytological studies of diploid and triploid *Populus tremula* and of crosses between them. *Hereditas* **26**: 321–5.1
- Jones RE & Bamford R (1942) Chromosome number in the progeny of triploid gladiolus with special reference to the contribution of the triploid. *American Journal of Botany* **29**: 807–13.
- Keeler KH & Davis GA (1999) Comparison of common cytotypes of *Andropogon gerardii* (Andropogoneae, Poaceae). *American Journal of Botany* **86**: 974-979.
- Keeler KH, Kwankin B, Barnes PW & Galbraith DW (1987) Polyploid polymorphism in *Andropogon gerardii*. *Genome* **29**: 374-379.
- Kihara H & Ono T (1926) Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex*-Arten. *Zeitschr. Zellforsch.u.mikr Anatomie* **4**: 475-481.
- Kirk H, Choi YH, Kim HK, Verpoorte R & van der Meijden E (2005) Comparing metabolomes: the chemical consequences of hybridization in plants. *New Phytologist* **167**: 613–622.
- Kirschner J & Štěpánek J (1996) Modes of speciation and evolution of the sections in *Taraxacum*. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **31**: 415–426.
- Koltunow AM (1993) Apomixis: embryo sac and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* **5**: 1425–1437.
- Leblanc O, Grimanelli D, González de León D & Savidan Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 1198-1203.
- Leitch IJ & Bennett MD (2004) Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 651-663.
- Leitch IJ, Chase MW & Bennett MD (1998) Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* **82**: 85–94.

- Levin DA (1983) Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist* **122**: 1-25.
- Lewis WH (1980) Polyploidy: biological relevance. Plenum Press, New York.
- Loxdale H & Lushai G (2003) Rapid changes in clonal lines: the death of a "sacred cow". *Biological Journal of the Linnean Society* **79**: 3-16.
- Lushai G, Loxdale HD & Allen JA (2003) The dynamic clonal genome and its adaptive potential. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**: 193-200.
- Lyman J & Ellstrand N (1984) Clonal diversity in the apomictic, *Taraxacum officinale*. *Heredity* **53**:1-10.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Espinoza F, Quarín CL & Pessino SC (2005) A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Science* **169** 211–220.
- Martelotto LG, Stein J, Ortiz JPA, Espinoza F, Quarín CL & Pessino SC (2007) Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. *Plant Science* **172**: 970–977.
- Martínez EJ, Hopp E, Stein J, Ortiz JPA & Quarín CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding* **12** (4): 319-327.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL & Ortiz JPA (2001) Inheritance of apospory in *Paspalum notatum*. *Hereditas* **135**: 19-25.
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**: 421-423.
- Matzk F, Meister A & Schubert I (2000) An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal* **21**: 97-108.
- Menken SBJ, Smit E & Den Nijs HJCM (1995) Genetical structure in plants: Genetical flow between diploid sexual and triploid asexual dandelion (*Taraxacum* section *Rudelaria*). *Evolution* **49**:1108-1118.

- Mes THM, Kuperus P, Kirschner J, Štěpánek J, Štorchová H, Oosterveld P & den Nijs JCM (2002) Detection of genetically divergent clone mates in apomictic dandelions. *Molecular Ecology* **11**: 253-265.
- Mok DWS & Peloquin SJ (1975) The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity* **35**: 295-302
- Moraes Fernandes MIB De, Barreto I, Salzano FM & Sacchet AMOF (1974) Cytological and evolutionary relationships in Brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). *Caryologia* **27**:455-465.
- Moreno-Pérez E, García-Velázquez A & Avendaño-Arrazate CH (2009) Estudio citológico en poblaciones diploides y poliploides del género *Tripsacum*. *Interciencia* **34**: 791-795.
- Morrone O, Escobar A & Zuloaga FO (2006) Chromosome studies in American Panicoideae (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **93**: 647–657.
- Nakajima K, Komatsu T, Mochizuki N & Suzuki S (1979) Isolation of diploid and tetraploid sexual plants in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Japanese Journal of Breeding* **29**: 228–238.
- Naumova TN (1990) Family *Trilliaceae*. En: Yakolev MS & Batygina TB (eds.), *Comparative embryology of flowering plants* (Butomaceae-Lemnaceae). Leningrad: Naukla, (in Russian) pp.151-159.
- Ndikumana J (1985) Etude de l'hybridation entre espèces apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria*. Ph.D. Thesis, University of Louvain.
- Newell CA & De Wet JM (1974) Morphological and cytological variability in *Tripsacum dactiloides* (Gramineae). *American Journal of Botany* **61**:652-664.
- Nieto-Lopez RM, Casanova C & Soler C (2000) Analysis of the genetic diversity of wild, Spanish populations of the species *Elymus caninus* (L.) Linnaeus and *Elymus hispanicus* (Boiss.) Talavera by PCR-based markers and endosperm proteins. *Agronomie* **20**: 893–905.
- Nogler GA (1975) Genetics of apospory in *Ranunculus auricomus*. IV. Embryology of F₃ and F₄ backcross offspring. *Phytomorphology* **25**: 485-490.

- Nogler GA (1984a) Gametophytic apomixis. En: Johri BM (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin pp. 475-518.
- Nogler GA (1984b) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusions. *Botanica Helvetica* 94: 411-422.
- Nogler GA (1995) Genetics of apomixis in *Ranunculus auricomus*. VI. Epilogue. *Botanica Helvetica* **105**: 111-115.
- Norrmann GA, Bovo OA & Quarin CL (1994) Post-zygotic seed abortion in sexual diploid X apomictic tetraploid intraspecific *Paspalum* crosses. *Australian Journal of Botany* **42**:449-456.
- Norrmann GA, Quarin CL & Burson BL (1989) Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* **80**:24-28.
- Norrmann G, Quarin C & Keeler K (1997) Evolutionary implications of meiotic chromosome behavior, reproductive biology and hybridization in 6x and 9x cytotypes of Big Bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman, Poaceae). *American Journal of Botany* **84** (2): 201-207.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143-1155.
- Orians CM (2000) The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant-herbivore interactions. *American Journal of Botany* **87**: 1749-1756.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD & Quarin CL (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 850-856.
- Otto S (2003) The advantages of segregation and the evolution of sex. *Genetics* **164**: 1099-1118.

- Ownbey M (1950) Natural hybridization and amphiploidy in the genus *Tragopogon*. *American Journal of Botany* **37**: 487–499.
- Pagliarini MS, Carraro LR, Freitas PM, Adamowski EV, Batista LAR, Valls JFM (2001) Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. *Hereditas* **135**:27-34.
- Palacios C & Gonzalez-Candelas F (1997) Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) *Molecular Ecology* **6**: 1107-1121.
- Paun O, Greilhuber J, Temsch E & Hörandl E (2006a) Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). *Molecular Ecology* **15**:897–910.
- Paun O & Hörandl E (2006) Evolution of hypervariable microsatellites in apomictic polyploid lineages of *Ranunculus carpaticola*: directional bias at dinucleotide loci. *Genetics* **174**: 387-398.
- Paun O, Stuessy TF & Hörandl E (2006b) The role of hybridization, polyploidization and glaciation in the origin and evolution of the apomictic *Ranunculus cassubicus* complex. *New Phytologist* **171**:223–236.
- Peakall R & Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.
- Pernès J (1975) Organization évolution d'un groupe agamique: la section des Maximae du genre. *Panicum* (Graminées). ORSTOM, Paris, pp. 1–106.
- Pernès J, Combes D & Rene-Chaume R (1970). Différenciation des populations naturelles du *Panicum maximum* Jacq. en Cote d'Ivoire par acquisition de modifications transmissibles, les unes par graines apomictiques, d'autres par multiplication végétative. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences Serie D* **270**:1992-1995.
- Phalen A von der (1986) Evaluation of genetic variability of some native forage plants. *Boletín Genético del Instituto de Fitotecnica, Castelar, Buenos Aires* **14**:1-6.

- Pichot C, El Maâtaoui M, Raddi S & Raddi P (2001) Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* **412**: 39.
- Pielou EC (1969) An Introduction to Mathematical Ecology. Wiley-Interscience New York, NY.
- Powers L (1945) Fertilization without reduction in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) and a hypothesis as to the evolution of apomixis and polyploidy. *Genetics* **30**: 323-346.
- Powers L & Rollins RC (1945) Reproduction and pollination studies on guayule, *Parthenium argentatum* Gray and *P. incanum* H.B.K. *J. American Society of Agronomy* **37**: 96-112.
- Pupilli F, Cáceres ME, Quarín CL & S Arcioni (1997) Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* **40**: 822-828.
- Qu I & Vorsa N (1999) Desynapsis and spindle abnormalities leading to 2n pollen formation in *Vaccinium darrowi*. *Genome* **42**: 35-40
- Quarín CL (1974) Relaciones filogenéticas entre *Paspalum alnum* Chase y *P. hexastachyum* Parodi (Gramineae). *Bonplandia* **3**:115-127.
- Quarín CL (1977) Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina subtropical. *Hickenia* **1**:73-78.
- Quarín CL (1986) Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid and tetraploid plants of *Paspalum cromyrrhizon*. *Euphytica* **35**: 515-522.
- Quarín CL (1992) The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* **5**:8-15.
- Quarín CL & Burson BL (1991) Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* **56**:223-228.
- Quarín CL, Burson BL & Burton GW (1984) Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyrrhizon*. *Botanical Gazette* **145**:420-426.

- Quarin CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC & Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* **1**: 243-249.
- Quarin CL & Hanna WW (1980) Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* **20**:69-75.
- Quarin CL & Lombardo EP (1986) Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* **7**:101-107.
- Quarin CL & Norrmann GA (1987) Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. En: *Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica*, Bogotá, Colombia **3**:25-35.
- Quarin CL, Norrmann GA & Espinoza F (1998) Evidence for autopolyploidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Hereditas* **129**: 119-124.
- Quarin CL, Norrmann GA & Urbani MH (1989) Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsletter* **2**: 44-46.
- Quarin CL, Pozzobon MT, Valls JFM (1996) Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica* **90**: 345-349.
- Ramsey J & Schemske DW (1998) Pathways, Mechanisms and rates of polyploidy formation in flowering plants, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **29**: 467-501.
- Rebozzio RN, Sartor ME, Quarin CL & Espinoza F (2010) Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. *Biologia Plantarum* in press.
- Reeder JR (1967) Notes on Mexican grasses VI. Miscellaneous chromosome numbers. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **94**: 1-17.
- Reis CAO, Dall'Agnol M, Nabinger C, Schifino-Wittmann MT (2010) Morphological variation in *Paspalum nicorae* accessions. *Scientia Agricola* **67**: 143-150.

- Reis CAO, Schifino-Wittmann MT, Dall'Agnol M (2008) Cytogenetic characterization of a collection of *Paspalum nicorae* Parodi accessions. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **8**:212-218.
- Richards AJ (1970) Eutriploid facultative agamospermy in *Taraxacum*. *New Phytologist* **69**: 761–774.
- Richards AJ (2003) Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society. London B* **358**: 1085-1093.
- Rodriguez DJ (1996a) A model for the establishment of polyploidy in plants. *The American Naturalist* **147**: 33-46.
- Rodriguez DJ (1996b) A model for the establishment of polyploidy in plants: viable but infertile hybrids, iteroparity, and demographic stochasticity. *Journal of Theoretical Biology* **180**: 189-196.
- Roose ML & Gottlieb LD (1976) Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon*. *Evolution* **30**:818-830.
- Rosenberg O (1908) Cytological studies on the apogamy in *Hieracium*. *Svensk Botanisk Tidskrift* **28**: 143-170.
- Rosenberg O (1930) Apogamie und Parthenogenesis bei Pflanzen. Baur E, Hartmann M (eds.) *Handbuch Vererbungswiss II* (12). Borntraeger, Berlin.
- Rosengurtt B, Arrillaga de MB & Izaguirre A (1970) Gramíneas uruguayas. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay 490 pp.
- Rousi A (1956) Cytotaxonomy and reproduction in the apomictic *Ranunculus auricomus* group. *Annales Botanici Societatis Zoologicae-Botanicae Fennicae "Vanamo"* Helsinki, Finlandia **29**: 1–64.
- Salmon A, Ainouche LM & Wendel JF (2005) Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* **14**: 1163-1175.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

- Sartor ME, Quarin CL & Espinoza F (2009) Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Science* **49**:1270–1276.
- Saura F (1948) Cariología de gramíneas en Argentina. *Revista Facultad de Agronomía y Veterinaria*, Instituto de Genética, Universidad de Buenos Aires **12**: 51-67.
- Savidan Y (1975) Héredité de l'apomixie. Contribution de l'étude de l'héredité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analyse des sacs embryonnaires). Cah. ORSTOM, ser. Biol. X **2**: 91-95.
- Savidan Y (2000) Apomixis: Genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* **18**: 13-86.
- Savidan Y & Pernès J (1982) Diploid-Tetraploid-Dihaploid cycles and evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution* **36**: 596-600.
- Sede S, Escobar A, Morrone O & Zuloaga FO (2010) Chromosome studies in American Paniceae (Poaceae, Panicoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **97**(1):128-138.
- Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarin CL, Ortiz JPA (2008) Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction* **21**: 205–215.
- Skalinska M (1946). Polyploidy in *Valeriana officinalis* Linn. in relation to its ecology and distribution. *Botanical Journal of the Linnean Society* **53**:159–86.
- Smith BW (1948) Hybridity and apomixis in the perennial grass, *Paspalum dilatatum*. *Genetics* **33**: 628-629.
- Smith J (1841) Notice of a plant which produces perfect seeds without any apparent action of pollen. *Transactions of the Linnean Society of London* **18**: 509–512.
- Snyder LA (1953) Breeding and evaluation of forage grasses. *Grass Cytology*. Report Fed Exp Sta Mayaguez, Puerto Rico pp. 18.
- Soltis PS & Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 7051-7057.
- Stebbins GL (1941) Apomixis in the angiosperms. *Botanical Review*. **7**: 507-542.

- Stebbins GL (1950) Variation and Evolution in plants. Columbia University Press, New York.
- Stebbins GL (1970) Adaptative radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307-326.
- Stebbins GL (1971) Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Publishers, Ltd: London.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarín CL & Ortiz JP (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flügge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* **20**:153–166.
- Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC & Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theoretical Applied Genetics* **109**: 186-191.
- Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Rosenbaumová R, Peckert T & Krahulec F (2007) Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. *Annals of Botany* **100**(6):1323-35.
- Thompson JD & Lumaret R (1992) The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology and Evolution* **7**: 302-307.
- Thompson WP (1931) Cytology and genetics of crosses between fourteen- and seven-chromosome species of wheat. *Genetics* **16**: 309–24.
- Tucker MR & Koltunow AMG (2009) Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. *Functional Plant Biology* **36**: 490–504.
- Turesson G (1929) Zur Natur und Begrenzung der Arteinheiten. *Hereditas*, Lund **12**: 323-34.

- Turner MF, Stephens JC, Anderson WW (1982) Homozigosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**: 203-207.
- Urbani MH (2004) Variabilidad genética en poblaciones diploides sexuales y tetraploides apomícticas de *Paspalum simplex*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Urbani MH, Quarín CL, Espinoza F, Penteadó MIO, Rodrigues IF (2002) Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Systematic and Evolution* **236**: 99-105.
- Usberti JA Jr & Jain SK (1978) Variation in *Panicum maximum*: a comparison of sexual and asexual populations. *Botanical Gazette* **139**:112-116.
- Vaio M, Mazzella C, Porro V, Speranza P, López-Carro B, Estramil E & Folle GA (2007) Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Systematic and Evolution* **265**: 109-121.
- Valle CB do, Gliénke C & Leguizamón GOC (1994). Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter* **7**: 42-43.
- Van der Hulst RGM, Mes THM, den Nijs JCM & Bachmann K (2000) Amplified fragment length polymorphism reveal that population structure of triploid dandelions (*Taraxacum officinale*) exhibits both clonality and recombination. *Molecular Ecology* **9**: 1-8.
- Van der Hulst RGM, Mes THM, Falque M, Stam P, den Nijs JCM & Bachmann K (2003) Genetic structure of a population sample of apomictic dandelions. *Heredity* **90**(4):326-35.
- Van Dijk P (2003) Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **358**: 1113-1121.

- Vos PR, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters, A, Pot J, Peleman J, Kuiper M & Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Warmke HE (1954) Apomixis in *Panicum maximum*. *American Journal of Botany* **41**: 5-11.
- Watson L & Dallwitz MJ (1992) *The Grass Genera of the World*. C.A.B. International, Wallingford.
- Werth CR, Guttman SI & Eshbaugh WH (1985) Electrophoretic evidence of reticulate evolution in the Appalachian *Asplenium* complex. *Systematic Botany* **10**: 184-192.
- Winkler H (1908). Über Parthenogenesis und Apogamie in Pflanzenreich. *Progressus rei botanicae* **2**:293-454.
- Woodell SRJ & Valentine DH (1961) Studies in British primulas. IX. Seed incompatibility in diploid-autotetraploid crosses. *New Phytologist* **60**: 282-94.
- Yahara T (1990) Evolution in agamosperous races in *Bohemeria* and *Eupatorium*. *Plant Species Biology* **5**: 183-196.
- Zohary D & Nur U (1959) Natural triploids in the orchard grass, *Dactylis glomerata* L., polyploid complex and their significance for gene flow from diploid to tetraploid levels. *Evolution* **13**: 311-317.
- Zuloaga FO & Morrone O (2005) Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **102**:1-297.