



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

**Transferencia génica desde especies tetraploides
apomícticas hacia híbridos tetraploides sexuales de
origen experimental en el grupo *Plicatula* de *Paspalum***

Lic. Patricia E. Novo

Tesis para optar al título de Doctor de la UNNE “Área de Recursos Naturales”

**Director
Dr. Camilo L. Quarín**

**Co-Director
Dr. Francisco Espinoza**

Ciudad de Corrientes, República Argentina

Transferencia génica desde especies tetraploides apomícticas hacia híbridos tetraploides sexuales de origen experimental en el grupo Plicatula de *Paspalum*

Patricia E. Novo

Licenciada en Cs. Biológicas FACENA-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-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE), bajo la dirección del Dr. Camilo L. Quarín y el Dr. Francisco Espinoza.

Dr. Camilo L. Quarín.....

Dr. Francisco Espinoza.....

Lic. Patricia E. Novo.....

Fecha de defensa.....

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Camilo L. Quarín, por haber aceptado dirigirme, por hacerlo con mucha paciencia, dedicación y voluntad durante la realización de esta tesis. Por transmitirme constantemente sus conocimientos.

A mi Codirector, el Dr. Francisco Espinoza, por sus consejos y estimulación durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de la cátedra de Genética y Forrajicultura de la FCA-UNNE: Ing. Agr. Alex Zilli, Dra. Andrea Brugnoli, Dr. Carlos Acuña, Dr. Eric Martínez, Ing. Agr. Florencia Galdeano, Ing. Agr. Florencia Marcón, Lic. Irene Caponio, Ing. Agr. María de las Mercedes Hidalgo, Ing. Agr. Mara Schedler, Dr. Mario Urbani, Dra. María Sartor, Dra. Patricia Aguilera, Dra. Silvana Ferrari, Lic. Verena Reuteman por su compañerismo, por sus consejos y por compartir momentos gratos.

Al Dr. Mario Urbani “El Profe” por introducirme al mundo de los *Paspalum*. Por sus sugerencias, por su ayuda y por su predisposición.

A la Ing. Agr. Florencia Galdeano “Mi segunda Mamá”, por su enorme predisposición y apoyo continuo e incondicional.

A la Dra. María Sartor, por su paciencia para enseñarme a trabajar en el laboratorio e interpretar los resultados desde el primer día.

A la Dra. Andrea Brugnoli, por su amistad, por escucharme, por sus sugerencias y por su apoyo.

A mis compañeros y amigos Ing. Agr. Alex Zilli y la Ing. Agr. Mara Schedler por brindarme su amistad, por su apoyo y por contenerme siempre.

A la Lic. Irene Caponio y a la Ing. Agr. María de las Mercedes Hidalgo, por brindarme su cariño, por mimarme.

Al Sr. Edmundo Barrios, por su buena predisposición y colaboración en las actividades de campo.

A mis amigos por estar siempre apoyándome.

A mi familia, que siempre de una u otra manera estuvieron presente.

Al Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica por darme la posibilidad económica de realizar esta tesis.

Al Instituto de Botánica del Nordeste y Facultad de Ciencias Agrarias-
UNNE por permitirme desarrollar las actividades correspondientes a esta tesis.

Parte de los resultados descriptos en la presente tesis fueron previamente dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas.

Publicaciones:

1. **Novo P.E.**, Espinoza F., Quarin C. L. (2013). The apomictic tetraploid cytotype of *Paspalum chaseanum* and its cytogenetic relationship with *P. plicatulum* (Poaceae): implications for taxonomy and gene exchanges. Australian Journal of Botany, **61**, 538-543. Australian Journal of Botany 61(7) 538-543 <http://dx.doi.org/10.1071/BT13194>.
2. **Novo P.E.**, Valls J.F, Galdeano F, Honfi A.I., Espinoza F., Quarin C. L. (2015). Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. Scientia Agricola. En prensa.

Reuniones Científicas:

1. **Novo P.E.**, F. Espinoza, C.L. Quarin (2012). Híbridos interespecíficos entre *Paspalum plicatulum* y *P. chaseanum*, dos gramíneas forrajeras autóctonas. XLII Congreso Argentino de Genética. Del 28 al 31 de octubre, Rosario, Argentina. Participante expositor
2. **Novo P.E.**, M. Urbani, F. Espinoza, C.L. Quarin (2012). Plicatula group of *Paspalum*: generalized gene transfer from apomictic genotypes into a sexual population. III Ciclo de seminarios sobre el avance en la caracterización genética y molecular de la apomixis en gramíneas forrajeras". Del 25 al 27 de octubre, Rosario, Argentina. Participante expositor.
3. **Novo P.E.**, F. Espinoza, C.L. Quarin (2013). Progenie de un cruzamiento sexual × apomítico entre dos especies del grupo Plicatula de *Paspalum*. XLII Congreso Argentino de Genética. III Reunión Regional SAG-NOA. Del 27 al 30 de octubre, Salta, Argentina. Participante expositor.
4. **Novo P.E.**, C. L. Quarin, C.A. Acuña, F. Espinoza (2014). Distancia genética entre especies del grupo Plicatula de *Paspalum* y fertilidad en

la descendencia. XLIII Congreso Argentino de Genética. Del 19 al 22 de octubre, San Carlos de Bariloche, Argentina. Participante expositor.

5. **Novo P.E.**, F. Espinoza, M.E. Sartor, F. Galdeano, P.M. Aguilera, M.H. Urbani, C.A. Acuña, C.L. Quarín (2014). Breeding species of the plicatula group of *Paspalum* through intra-and interspecific hybridization and selection: the way sexual. IV Ciclo de seminarios sobre el avance en la caracterización genética y molecular de la apomixis en gramíneas forrajeras. Del 25 al 27 de noviembre, Bahía Blanca, Argentina. Participante expositor.
6. **Novo P.E.**, F. Espinoza, C.L. Quarín (2015). Híbridos F₁ interespecíficos entre dos especies tetraploides del grupo Plicatula del género *Paspalum*. XLIV Congreso Argentino de Genética. Del 13 al 16 de septiembre, Mar del Plata, Argentina. Participante expositor.
7. **Novo P.E.**, F. Espinoza, C.L. Quarín (2015). Interspecific Tri-hybrid among tetraploid species of the Plicatula group of *Paspalum*. 5th International Symposium of Forage Breeding. Del 19 al 21 de octubre, Buenos Aires, Argentina. Participante expositor.
8. **Novo P.E.**, P.M. Aguilera, M.E. Sartor, F. Galdeano, E. Weihmüller, S.C. Pessino, C.L. Quarín, J.P.A. Ortiz, F. Espinoza (2015). Synthesis of new plant material and development of molecular tools for improving species of the Plicatula group of *Paspalum*. 11th International Congress of Plant Molecular Biology. Del 25 al 30 de octubre, Foz de Iguazú, Brasil. Participante expositor.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1. El género <i>Paspalum</i>	11
2. Sistemas reproductivos.....	14
2.1. Reproducción sexual.....	15
2.2. Reproducción apomíctica.....	16
2. 2. 1. Importancia de la apomixis en el mejoramiento genético.....	20
3. El Grupo Plicatula.....	21
3. 1. Estudios citogenéticos y reproductivos.....	23
II. HIPÓTESIS.....	26
III. OBJETIVOS.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Material vegetal.....	28
2. Cruzamientos y obtención de las progenies.....	31
3. Determinación del origen de los descendientes.....	32
4. Características fenotípicas de los descendientes.....	34
5. Estudios de la meiosis.....	35
6. Estudios de fertilidad.....	35
7. Determinación del modo reproductivo.....	36
8. Población sintética de reproducción sexual.....	36
8.1. Selección de híbridos F ₁ sexuales y policruzamientos.....	36
8.2. Policruzamiento.....	38
8.3. Formación de una población sintética 4x sexual.....	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
V.1. Análisis de las progenies.....	40

1. Generación de progenies.....	40
2. Origen híbrido de los descendientes logrados	44
3. Características fenotípicas de los híbridos	46
4. Modo reproductivo de los híbridos F ₁	52
V.2. Relaciones citogenéticas entre las especies del Grupo Plicatula	55
1. Análisis de la meiosis	55
2. Análisis de fertilidad	66
V.3. Población sintética tetraploide sexual dentro del Grupo Plicatula.....	70
1. Híbridos F ₁ sexuales seleccionados para policruzamiento	70
2. Población sintética tetraploide sexual.....	74
VI. CONCLUSIONES	78
VII. BIBLIOGRAFÍA	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución geográfica y ecológica de las especies que se utilizaron en esta tesis.....	23
Tabla 2. Genotipos 4xA y 4xS del grupo Plicatula de <i>Paspalum</i> pertenecientes a la colección viva del IBONE, utilizados en esta tesis.....	29
Tabla 3. Programa de ciclado utilizado en las amplificaciones de RAPD.....	34
Tabla 4. Familias híbridas de genotipos 4xS × 4xA de <i>Paspalum</i> que fueron incluidos para formar la población sintética sexual.....	38
Tabla 5. Cruzamientos realizados, número de espiguillas polinizadas, porcentaje de espiguillas llenas, número y porcentaje de F ₁ obtenidas de cada cruzamiento entre <i>P. plicatulum</i> (4PT, 7PT) × 21 genotipos, incluyendo 11 especies además de <i>P. plicatulum</i> , todas tetraploides (2n = 40), pertenecientes al grupo Plicatula.....	41
Tabla 6. Pruebas de progenie para determinar el origen híbrido de una muestra de individuos pertenecientes a 12 familias originadas por cruzamientos entre <i>P. plicatulum</i> 4PT ó 7PT × 12 genotipos tetraploides apomícticos, incluyendo 2 pertenecientes a la misma especie (<i>P. plicatulum</i>) y otros 10 correspondientes a 7 especies diferentes, también del grupo Plicatula.....	45
Tabla 7. Características morfológicas de la madre autotetraploide sexual de <i>P. plicatulum</i> 4PT, de 13 progenitores tetraploides apomícticos y de algunos de sus respectivos híbridos.....	49
Tabla 8. Determinación del modo reproductivo de híbridos logrados en 14 combinaciones de cruzamientos de <i>P. plicatulum</i> tetraploide sexual (genotipos 4PT y 7PT) × genotipos silvestres, tetraploides y apomícticos que involucran 8 especies diferentes del Grupo Plicatula.....	54
Tabla 9. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de <i>P. plicatulum</i> (4PT), <i>P. chaseanum</i> (ST13894) y en tres híbridos interespecíficos entre ambas especies.....	56
Tabla 10. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de <i>P. plicatulum</i> , <i>P. nicorae</i> PI508821 y en híbridos interespecíficos entre ambas especies.....	57

Tabla 11. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de <i>P. plicatum</i> , <i>P. oteroi</i> (A&V1332) y en híbridos interespecíficos entre ambas especies.....	59
Tabla 12. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de <i>P. plicatum</i> , <i>P. plicatum</i> Hojs388 y en híbridos interespecíficos entre ambas especies.	60
Tabla 13. Fertilidad en híbridos de 13 cruzamientos entre 4PT o 7PT × genotipos tetraploides apomícticos, en condiciones de autopolinización y polinización libre.	67
Tabla 14. Cruzamientos dialélicos y sus dialélicos recíprocos entre híbridos F ₁ sexuales.....	71
Tabla 15. Híbridos sexuales seleccionados para el policruzamiento y el número de réplicas correspondiente.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parentales femeninos de <i>P. plicatum</i> 4xS	28
Figura 2. Algunos de los parentales 4xA masculinos.....	29
Figura 3. Familias híbridas obtenidas en distintos cruzamientos.	42
Figura 4. Productos de amplificación de los parentales 4PT, <i>P. chaseanum</i> ST13894 y la progenie F ₁ generados por el cebador BC756.	46
Figura 5. Espiguillas de <i>P. plicatum</i> 4PT, <i>P. chaseanum</i> ST13894 y tres híbridos interespecíficos entre ambas especies.....	48
Figura 6. Histogramas de citometría de flujo generados a partir de semillas de híbridos intra e interespecíficos.....	53
Figura 7. Asociaciones de cromosomas meióticos en <i>P. chaseanum</i> y en un híbrido interespecífico de <i>P. plicatum</i> 4PT × <i>P. chaseanum</i>	57
Figura 8. Asociaciones de cromosomas meióticos en en híbridos interespecíficos de <i>P. plicatum</i> 4PT × <i>P. nicorae</i>	58
Figura 9. Asociaciones de cromosomas meióticos en Metafase de <i>P. oteroi</i> y en un híbrido interespecífico de <i>P. plicatum</i> 4PT × <i>P. oteroi</i>	59
Figura 10. Híbridos sexuales seleccionados y sus respectivas réplicas utilizados para la población de policruzamiento.....	72
Figura 11. Población de policruzamiento ubicada en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.....	74
Figura 12. Población sintética tetraploide sexual ubicada en el campo experimental en la localidad de Riachuelo, Corrientes	74

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

°C: grados Celsius

cm: centímetros

dNTP`s: desoxinucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

F₁: primera generación en un cruzamiento

FCSS: análisis de contenido de ADN en semillas por citometría de flujo

g: gramos

M: molar

ml: mililitro

mM: milimolar

ng: nanogramos (1×10^{-9} g)

ng/μl: nanogramos por microlitro

nm: nanómetros (1×10^{-9} m)

NaCl: cloruro de sodio

PCR: reacción en cadena de la polimerasa de ADN

pH: potencial de hidrógeno, es una medida de acidez o alcalinidad de una solución

PM: peso molecular

RAPDs: polimorfismos por amplificación al azar del ADN

rpm: revoluciones por minuto

TAE: Tris-ácido acético-EDTA

Taq polimerasa: enzima polimerizante del ADN, obtenida de *Thermus aquaticus* Brock y Freeze

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tris: N-Tris-(hidroximetil)-aminoetano

U/μl: unidades por microlitro

μg: microgramos (1×10^{-6} g)

μg/μl: microgramos por microlitro

μl: microlitro ($1 \times 10^{-6}l$)

μM: micromolar ($1 \times 10^{-6}M$)

V: voltios

v/v: volumen en volumen

RESUMEN

Paspalum pertenece a la familia *Poaceae*, subfamilia *Panicoideae*, tribu *Paspaleae*, subtribu *Paspalinae*. Comprende aproximadamente 400 especies casi exclusivamente de origen americano. Este género presenta una gran diversidad que le permite adaptarse a diferentes ambientes y posee diversas estrategias reproductivas (clonación, apomixis y sexualidad). Una gran proporción de las especies constituyen complejos agámicos donde el mismo taxón contiene citotipos diploides (2x) sexuales y poliploides apomícticos; los poliploides generalmente son tetraploides (4x). El grupo subgenérico *Plicatula* contiene unas 30 especies, todas integrantes importantes de las pasturas naturales sudamericanas. Para varias de ellas solo se conocen razas 4x apomícticas (4xA) y por lo tanto el mejoramiento genético está extremadamente restringido, ya que no existen en poblaciones naturales plantas 4x sexuales (4xS) que puedan usarse de madres en cruzamientos con 4xA. De acuerdo a estudios previos, es posible que los citotipos 4xA de todas estas especies sean autotetraploides, y más aún, es posible que exista un buen grado de homología entre los juegos cromosómicos básicos de todas ellas. A partir de semillas de un 2x de *P. plicatulum* ya se ha conseguido duplicar con colchicina su dotación cromosómica para producir dos genotipos 4xS (4PT y 7PT). El objetivo planteado en esta tesis fue crear familias híbridas usando de madre a estas plantas 4PT y 7PT y como padres a varias especies 4xA del grupo *Plicatula*. El objetivo final fue formar una población de híbridos en la cual contener la mayor cantidad de combinaciones génicas posibles que provengan de los padres apomícticos, pero no los factores que determinan la reproducción apomíctica; es decir, una población sintética de reproducción sexual. Esta población debía surgir de policruzamientos entre híbridos de reproducción sexual pertenecientes a la mayor cantidad posible de familias híbridas. Para eso se realizaron 21 cruzamientos (18 interespecíficos y 3 intraespecíficos), de los cuales fueron efectivos 15, dando lugar a 238 individuos. La obtención de estos híbridos fue progresiva durante casi todos los años que duró la realización de la tesis, aunque algunos ya habían sido logrados con anterioridad, varios se lograron en los dos primeros años, y el resto en los años subsiguientes. El desarrollo cronológico, y lógico, del desarrollo para llegar al

objetivo final debía ser: cruzamientos, siembra de semillas logradas y obtención de híbridos, corroborar que las plantas logradas eran híbridos, clasificar los híbridos por sistema reproductivo (sexual o apomíctico), comprobar si eran fértiles (si producían semillas), grado de auto-fecundación (autogamia) o fecundación abierta (alogamia), seleccionar por producción de semillas y por vigor (visual) los mejores híbridos sexuales F_1 ; clonar por división de matas a los híbridos selectos y formar la población de policruzamiento, aislar la población de posible polen extraño, controlar el policruzamiento y cosechar semillas y con esas semillas formar la población sexual sintética. Paralelamente, estudiar el apareamiento cromosómico de las especies 4xA que actuaron como padres y de sus respectivos híbridos. La madre 4PT es totalmente autoincompatible y 7PT lo es en gran medida. Por lo tanto, en los cruzamientos 4PT se polinizó sin castrar y 7PT fue castrada en cámara con niebla artificial antes de ser polinizada. No obstante, se tomaron 95 descendientes representativos de las 12 familias para estimar si realmente los 238 individuos surgieron de hibridaciones. Por medio de marcadores moleculares RAPDs específicos de los parentales masculinos en la descendencia se confirmó el origen híbrido de todos los 95 individuos analizados y se consideró que todos los descendientes se produjeron por hibridación. Además, esto se vio sustentado por el hecho de que todos ellos mostraron características fenotípicas semejantes a sus parentales masculinos, o intermedias entre ambos padres. Por citometría de flujo se determinó el modo reproductivo, en donde se analizaron 14 familias, en 11 se pudo determinar que hubo segregación para el modo reproductivo, observándose individuos sexuales y apomícticos (apomícticos obligados o facultativos). En los tres casos restantes no se pudo determinar si existía segregación, pero en estos casos el número de híbridos analizado fue pequeño. Mediante el análisis de las asociaciones cromosómicas en diacinesis y metafase I se pudo ver que *P. chaseanum* y *P. oteroi*, son de origen autotetraploide mientras que *P. nicorae* sería probablemente una especie alotetraploide segmentaria con dos genomas parcialmente homólogos. Estas afirmaciones se ven apoyadas por el apareamiento de los cromosomas en sus respectivos híbridos interespecíficos con la planta autotetraploide de *P. plicatulum*. Además, los resultados sugieren que *P. chaseanum* comparte en gran medida el mismo genoma básico del

autotetraploide inducido 4PT de *P. plicatum*, mientras que la homología del genoma de 4PT con el genoma aportado por el también autotetraploide *P. oteroi* debe ser parcial porque en general buena parte de los cromosomas de los híbridos forman bivalentes. Algo parecido sucede con *P. nicorae*, donde debe existir algún grado de homología entre los genomas parcialmente homólogos que aporta esta especie y el genoma de 4PT cuando se forman los híbridos. En general las asociaciones cromosómicas observadas en las progenies 4PT × *P. oteroi* y 4PT × *P. nicorae* fueron regulares considerando el alto porcentaje de cromosomas asociados como bivalentes y un buen grado de regularidad en la distribución de los cromosomas en anafase I. Esto explicaría la buena fertilidad manifestada en la mayoría de los híbridos. Por otro lado las asociaciones cromosómicas en la meiosis de Hojs388, un tetraploide silvestre apomítico de *P. plicatum*, sugieren primariamente que el mismo tiene un origen alotetraploide. Sin embargo, en sus híbridos intraespecíficos obtenidos con 4PT *P. plicatum*, las asociaciones sugieren que debe haber un grado bastante importante de homeología entre los dos genomas que aporta Hojs388. Es decir, este tetraploide silvestre de *P. plicatum* se pudo haber originado por hibridación entre especies con genomas parcialmente homólogos. Y posteriormente debe haber habido un proceso de diploidización. Considerando que el objetivo final fue formar una población sintética de reproducción sexual, esta se formó a partir de una población de policruzamiento, la que estuvo formada por 50 híbridos F₁ sexuales, correspondientes a 9 familias híbridas. Los híbridos seleccionados por vigor y fertilidad fueron replicados ampliando a 132 individuos que fueron transplantados a campo. Se realizó simultáneamente la cosecha de todas las plantas de la parcela obteniéndose aproximadamente 50 gramos de semillas provenientes de la población de policruzamiento, una proporción de éstas fue sembrada obteniéndose 540 plantas que constituyeron la población sintética tetraploide sexual. La cual, se caracteriza por una amplia variabilidad fenotípica y se supone que tiene una amplia variabilidad genética heredada de seis especies silvestres apomíticas (*P. chaseanum*, *P. guenoaraum*, *P. lenticulare*, *P. nicorae*, *P. oteroi* y *P. plicatum*). Esta población constituye la base para el programa de mejoramiento genético recientemente iniciado en la FCA-UNNE, la cual incluye especies del grupo Plicatula.

I. INTRODUCCIÓN

1. El género *Paspalum*

El género *Paspalum* pertenece a la familia *Poaceae*, subfamilia *Panicoideae*, y tradicionalmente se consideró que pertenecía a la tribu *Paniceae*. Sin embargo, Morrone et al. (2012) basados en estudios filogenéticos recientes proponen que *Paspalum* pertenece a una nueva tribu llamada *Paspaleae*, subtribu *Paspalinae*, la que consta de unas 310 especies. Según Chase (1929), el género comprende aproximadamente 400 especies casi exclusivamente de origen americano, distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales a templadas de las Américas, con unas pocas especies que habitan en el viejo mundo (Clayton & Renvoize, 1986; Watson & Dallwitz, 1992). El género presenta su mayor diversidad en Sudamérica y es particularmente abundante en Brasil. Se lo puede encontrar desde las montañas andinas hasta las arenas costeras del Atlántico y del Pacífico; también se encuentran desde las zonas tropicales hasta el norte de Estados Unidos o la región norte de la Patagonia en el sur de la Argentina. Ciertas especies habitan la puna en la cordillera andina, otras en el interior de las selvas subtropicales o tropicales, los pantanos de las cuencas de los grandes ríos sudamericanos, terrenos bajos y salobres o sabanas con el más variado tipo de suelo o régimen hídrico (Quarin & Norrmann, 1987). La diversidad que presenta para adaptarse a diferentes ambientes está sustentada en la variedad de estrategias reproductivas observada en las diferentes especies del género (Quarin, 1992), la cual ha tenido una gran influencia en la evolución del género (Bashaw et al., 1970).

En relación al número cromosómico, la mayoría de las especies presentan un número básico de cromosomas de $x=10$ (Quarin, 1992). Sin embargo, hay casos excepcionales de especies que presentan $x=6$ (Quarin, 1974) y $x=9$ (Davidse & Pohl, 1974). Considerando el amplio registro de recuentos cromosómicos ya existentes, y que el juego básico de $x=10$ es casi universal, las especies se pueden agrupar en taxones que son diploides ($2n=2x=20$), en poliploides de distintos niveles (mayoritariamente tetraploides, $2n=4x=40$), pero también en taxones multiploides donde para una misma especie existen más de un nivel de ploidía (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013).

Por eso la poliploidía en este género es una característica no solo importante sino también muy particular ya que existe diversidad intraespecífica de niveles de ploidía. Una gran proporción de especies pueden considerarse multiploides puesto que el mismo taxón contiene citotipos de varios niveles de ploidía, generalmente desde diploides (2x) de reproducción sexual a poliploides apomícticos. A medida que se realizan estudios citológicos, mayor resulta ser la proporción de especies multiploides, porque aparecen nuevas colecciones con números cromosómicos diferentes a los ya reportados para las mismas especies. Usualmente, estos multiploides tienen un citotipo 2x y otro tetraploide (4x), pero también triploides (3x) (plantas ocasionales), y aún mayores (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013). En algunas especies multiploides no se han detectado individuos diploides y solo se conocen poliploides intraespecíficos, incluso con niveles muy altos como en *P. floridanum* Michx. con registros de 120 y 160 cromosomas (Burton, 1940; Brown, 1950).

Dentro del género *Paspalum* se llevaron a cabo varios estudios para tratar de discernir los procesos que dieron origen a los poliploides (Quarin & Hanna, 1980; Quarin & Norrmann, 1987; Quarin et al., 1984; 1989; 1996; 2001). Aunque no son frecuentes, dentro del género se encontraron especies alopoliploides de reproducción apomíctica tales como el citotipo pentaploide de: *P. dilatatum* Poir. (Bashaw & Holt, 1958; Bashaw & Forbes, 1958), o la especie tetraploide *P. pauciciliatum* (Parodi) Herter (Smith, 1948 =*P. dilatatum* var. *pauciciliatum* Parodi). Sin embargo, algunos autores se basaron en trabajos citogenéticos para considerar que la mayoría de los 4x apomícticos de *Paspalum* podrían ser de origen autoploide (Forbes & Burton, 1961; Norrmann et al., 1989; Quarin, 1992; Quarin et al., 1998). La autopoliploidía fue confirmada en *Paspalum simplex* Morong. (Pupilli et al., 1997), y en *P. notatum* Flügge (Stein et al., 2004) en base a la herencia tetrasómica de marcadores moleculares. Dentro del género, muchas de las especies apomícticas son parte de complejos poliploides cuyos citotipos diploides son de reproducción sexual, alógamos por autoincompatibilidad y presentan asociaciones cromosómicas bivalentes. Sin embargo, en los poliploides coespecíficos (la gran mayoría tetraploides) son de reproducción apomíctica,seudógamas y generalmente forman asociaciones multivalentes (mayormente cuadrivalentes) en la meiosis.

La constitución genética de los gametos producidos por un autopoliploide va a depender de la presencia de multivalentes en la meiosis y de la posterior segregación en anafase I, de manera que las segregaciones fenotípicas y genotípicas serán diferentes a las conocidas segregaciones mendelianas de los organismos diploides; este comportamiento genético que es común en los autoploides se conoce como herencia polisómica, y como herencia tetrasómica para los autotetraploide (Lacadena, 1988).

En los alopoliploides, las asociaciones de los cromosomas en la meiosis dependen de la ausencia o del grado de homología que presenten los genomas de las especies que dieron origen al alopoliploide. Durante la meiosis se formaran bivalentes en los cromosomas homólogos, dando lugar a una segregación genética igual a la de los diploides, lo que se conoce como herencia disómica (Lacadena, 1988). Sin embargo; la segregación de los cromosomas en los autotetraploide depende del número y posición de los entrecruzamientos que ocurran en los multivalentes, de la distancia del locus considerado y el centrómero, del tipo de coorientación, etc. (Lacadena, 1988). En las especies autopoliploides inducidas ocurre un cambio gradual que lleva de la formación de sinapsis de tipo multivalente a una de tipo bivalente (Gilles & Randolph, 1951). Estos autores en base a sus estudios en maíz, autotetraploide, observaron los apareamientos cromosómicos durante 10 años y concluyeron que las asociaciones cromosómicas multivalentes, característica de la mayoría de los autopoliploides de origen reciente no necesariamente persisten indefinidamente en las generaciones siguientes. En los autopoliploides, tanto naturales como inducidos, hay una tendencia de adquirir gradual o rápidamente las características citológicas de un diploide (Swaminathan & Sulbha, 1959). Si esto ocurre, existe la posibilidad de que muchos poliploides naturales que muestran regularmente configuraciones bivalentes se hayan originado como autopoliploides. Actualmente, se sabe que esta variación en la formación de configuraciones multivalentes se atribuye a la influencia de procesos de diploidización o al control genético del apareamiento cromosómico. A pesar de su importancia, poco se sabe acerca de los mecanismos de diploidización en autopoliploides; excepto por el reciente estudio de Hollister et al. (2012).

El gran número de especies que lo componen, la amplia distribución geográfica que presentan y las características en cuanto a calidad de forraje, hacen que el género sea uno de los más importantes y promisorios para el desarrollo de cultivares forrajeros adaptados a las regiones cálidas y templadas de América, siendo particularmente abundantes en Brasil, este de Bolivia, Paraguay y nordeste de Argentina (Burton, 1974). Sin embargo, sólo unas pocas especies han sido llevadas a cultivo, mediante selección de biotipos superiores tomados directamente de la naturaleza. Se cuenta con cultivares de *P. guenoarum* Arechav. en Paraguay, *P. plicatulum* Michx. en Australia, *P. notatum* en Estados Unidos de Norteamérica (USA) y de *P. atratum* Swallen en Brasil, USA, Argentina y Tailandia. *Paspalum notatum* y *P. dilatatum* Poir son económicamente las especies más importantes empleadas como forrajeras, principalmente en el Sur de USA (Acuña et al., 2009). El género también incluye taxones empleados en la alimentación humana u otros usos populares. Como ejemplo se puede mencionar a *P. scrobiculatum* L. “Kodo Millet”, una especie que desde la antigüedad fue domesticada y ampliamente cultivada como cereal en la India, donde también se cosechan sus granos de plantas silvestres al igual que en África occidental (de Wet et al., 1983). Hay especies de uso ornamental, mientras que *P. rufum* Nees es una especie cuyas hojas se utilizan para hacer esteras en la fabricación de sillas u otros muebles artesanales.

Teniendo en cuenta el elevado número y a la amplia variabilidad de las especies que lo componen, el género ha sido dividido en subgéneros y varios grupos informales en base a caracteres morfológicos, principalmente de las inflorescencias y de las espiguillas (Zuloaga & Morrone, 2005). Las características sobresalientes de los grupos taxonómicos correspondientes a Sudamérica fueron publicadas por Zuloaga & Morrone (2005).

2. *Sistemas reproductivos*

Las angiospermas presentan una gran variabilidad de estructuras y procesos reproductivos. La mayoría se reproduce por procesos sexuales generando gametos a través de la meiosis, los cuales se fusionan para dar lugar al desarrollo del embrión y del endospermo mediante un sistema denominado doble fecundación. Sin embargo, la reproducción sexual no es la

única vía reproductiva que poseen las angiospermas ya que algunas han evolucionado hacia una forma alternativa como es la apomixis (Tucker & Koltunow, 2009).

2.1. Reproducción sexual

La variación genética está asociada a la reproducción sexual, pero esta también implica gasto de tiempo y energía (Asker & Jerling, 1992). La recombinación genética es una de las principales características de la reproducción sexual. Este tipo de reproducción en las Angiospermas involucra la alternancia de una generación esporofítica ($2n$) y una generación gametofítica (n). La planta es la generación esporofítica ($2n$) y en sus estructuras reproductivas especializadas, las flores, ocurre la esporogénesis cuyo proceso principal es la meiosis que aporta recombinación genética y reducción del número cromosómico, dando lugar al desarrollo de las megasporas (femeninas) y microsporas (masculinas) haploides (n). La alternancia de generaciones es una característica con importantes implicancias en la formación de los gametos y en la embriogénesis (Walbot, 1996). Estas esporas, mediante divisiones mitóticas, desarrollan el megagametofito (saco embrionario) y el microgametofito (grano de polen), estructuras que contienen a la ovocélula (gameto femenino) y a las células espermáticas (gametos masculinos), respectivamente. Los detalles de la formación de esporas (esporogénesis) y la formación de gametos (gametogénesis), tanto en la parte femenina como en la masculina, son los siguientes:

Las megasporas se generan como resultado de un proceso llamado megasporogénesis, el cual se lleva a cabo en una célula especializada del óvulo, la célula madre de las megaspora (CMM), en la cual ocurre la división meiótica que genera cuatro células hijas haploides (megásporas). En general, tres de estas degeneran y la restante es la megaspora funcional. A partir de esta megáspora, mediante tres divisiones mitóticas sucesivas, la megagametogénesis da origen a un saco embrionario o megagametofito que contiene al gameto femenino. En la mayoría de las angiospermas el saco embrionario está constituido por siete células y ocho núcleos: una ovocélula u oófera que es el gameto femenino, dos sinérgidas, una célula central binucleada, y tres antípodas hacia la chalaza. A esta clase de saco embrionario

también se lo llama monospórico o de tipo “Polygonum” por originarse de una sola megaspóra y por haber sido descrito primeramente por Strasburger para la dicotiledónea *Polygonum divaricatum* L. (Maheshwari, 1950). Este tipo de saco embrionario está presente en más del 70% de las angiospermas y ocurre de manera exclusiva en el 53% de las familias estudiadas (Carman, 1997). Sin embargo, se han reportado otros tipos de sacos embrionarios, caracterizados por estar compuestos de un número mayor o menor de células, y con niveles de ploidía aberrante en alguno de sus núcleos. Las diferencias en el número de células pueden ser el resultado de la pérdida de una o ambas sinérgidas, o de una reducción o aumento en el número de antípodas (Maheshwari, 1950).

La microsporogénesis ocurre en células especializadas, los microsporocitos o células madre de las micrósporas que se encuentran en los microsporangios, y estos en las anteras. La división meiótica de cada microsporocito origina 4 micrósporas haploides. A continuación el proceso de microgametogénesis, que incluye divisiones mitóticas, da lugar a los granos de polen o microgametofitos. La primera mitosis origina, dentro del grano de polen, una célula vegetativa y otra generativa. La célula vegetativa dirige el desarrollo del tubo polínico a través del pistilo, durante el proceso de polinización-fecundación. La célula generativa, se divide por mitosis una vez más para dar origen a dos gametos masculinos, los cuales llevan a cabo la doble fecundación que es característica de la mayoría de las angiospermas (Maheshwari, 1950).

La doble fecundación se produce cuando el microgametofito deposita dos gametos masculinos haploides dentro del megagametofito a través del tubo polínico que penetra el óvulo. Un gameto (n) fecunda a la ovocélula (n) y forman el cigoto ($n+n=2n$) a partir del cual se desarrolla el embrión; el otro gameto del tubo polínico (n) fecunda a la célula central binucleada ($n+n$) y originan el endospermo [$(n+n)+n=3n$]. La unión de un gameto femenino con uno masculino para formar el cigoto, nuevamente implica recombinación génica en el origen de un nuevo individuo.

2.2. Reproducción apomítica

La apomixis es un sistema de reproducción asexual por medio de semillas que genera progenies cuyos individuos son genéticamente idénticos a la planta

madre (Nogler, 1984). El término apomixis deriva del griego “*apo*” que significa falta o ausencia y “*mixis*” que significa unión o mezcla. Por lo tanto, apomixis hace referencia a la falta de unión de los gametos femeninos y masculinos característica de la reproducción sexual. Este sistema de reproducción fue descrito por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* (Js. Sm.) Müll. Arg. por J. Smith cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica, llevado desde Asia a los Kew Gardens de Richmond cerca de Londres, que se encontraba creciendo en forma aislada, floreció y produjo semillas en abundancia. Este hecho puso a la apomixis en evidencia y permitió el estudio de este tipo particular de reproducción (Savidan, 2000). Rosenberg (1908) fue quien, a través de estudios citológicos en *Hieracium* L., observó que la apomixis ocurre en angiospermas.

Involuntariamente los primeros experimentos con plantas apomícticas fueron realizados por Gregor Mendel, quien estudió las cruces entre especies del género *Hieracium* con el fin de confirmar los resultados obtenidos en sus trabajos de herencia en la arveja (*Pisum sativum* L.). Mendel describió la situación que en sus experimentos con *Hieracium* obtenía progenies F_1 segregantes (no uniformes) y numerosas F_2 no segregantes (uniformes) y atribuyó erróneamente la falta de segregación observada en estas poblaciones a una “frecuente autopolinización” (Savidan, 2000). La apomixis ha sido observada en al menos 400 especies de plantas pertenecientes a 35 familias diferentes, siendo frecuentemente encontrada en *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* y *Rutaceae* (Hanna & Bashaw, 1987). Se postula que la apomixis ha evolucionado como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de desarrollo en ovario (Koltunow, 1993; Grossniklaus, 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 contiene exactamente el mismo genotipo que la planta que lo origina. La apomixis presenta formas diferentes y parece haber surgido varias veces en forma independiente durante la evolución (Grimanelli et al., 2001).

Tipos de apomixis

La reproducción apomíctica involucra la no reducción cromosómica típica de la meiosis y el desarrollo del embrión por partenogénesis, es decir, sin fecundación (sin unión de la ovocélula con un gameto masculino). De acuerdo a cómo y dónde se forma el embrión, la apomixis puede clasificarse en gametofítica y esporofítica o embrionía adventicia (Nogler, 1984).

Apomixis gametofítica

En la apomixis gametofítica, se forma un saco embrionario en el cual los núcleos celulares que lo componen no son reducidos ($2n$) (Asker & Jerling, 1992). De acuerdo con el origen de la célula que genera al saco embrionario y el embrión, la apomixis gametofítica se subdivide en dos grupos: diplosporía y aposporía.

a) Diplosporía: los sacos embrionarios se generan a partir de la célula madre de la megaspora (CMM). Existen diferentes tipos de diplosporía, siendo los más conocidos los tipo *Antennaria* y *Taraxacum*. En el tipo *Antennaria* la CMM desarrolla directamente un saco embrionario sin formación de la pared celular luego de la primera división celular (Gustafsson, 1947), de manera que la CMM pasa a megáspora y gradualmente da origen al gametofito con un número cromosómico no reducido. En el tipo *Taraxacum* la CMM inicia el proceso de división meiótica, pero por consecuencia de la falta de apareamiento normal de los cromosomas, no se produce la migración de los mismos a los polos, entonces se forma un núcleo de restitución con el número somático de cromosomas. A consecuencia de esto, se altera la primera división meiótica. La segunda división ocurre normalmente, pero da como resultado una díade no reducida. Luego se producen tres mitosis consecutivas para formar un saco embrionario con ocho núcleos semejante al tipo *Polygonum* (Nogler, 1984). Además existen otros dos tipos de diplosporía meiótica, tipo *Ixeris* y tipo *Allium*, pero son menos frecuentes que el tipo *Taraxacum* (Nogler, 1984; Savidan, 2000).

b) Aposporía: los sacos embrionarios no reducidos son generados por mitosis a partir de células somáticas del óvulo, generalmente provenientes de la nucela. El saco embrionario, en general, no tiene antípodas y queda formado por una ovocélula, dos sinérgidas, y una gran célula central que, en

muchos casos, es uninucleada (Nogler, 1984; Savidan, 2000). Sin embargo, en *Paspalum* la célula central es binucleada (Burson & Bennett, 1970; 1971; Quarin et al., 1996; Espinoza et al., 2001).

Los sacos embrionarios apospóricos tienen una constitución diferente y muy variable tanto entre taxones como así también en algunos casos dentro de un mismo taxón. Es posible encontrar distintas morfologías: tipo *Hieracium* (Rosenberg, 1908; 1930), tipo *Panicum* (Warmke, 1954), además de algunas variantes típicas del género *Paspalum* (Quarin & Burson, 1991).

La aposporia es muy frecuente en el género *Paspalum*, y los sacos embrionarios que se encuentran en muchas de sus especies inician su desarrollo en células nucelares mediante una primera mitosis de forma bipolar. Cuando maduran se caracterizan por tener entre 4 y 5 núcleos, los cuales corresponden a la ovocélula, una o dos sinérgidas y una gran célula central con dos núcleos polares (Quarin & Burson, 1991).

A diferencia de la diplosporia, en las plantas apospóricas es común que se desarrollen más de un saco embrionario apospórico en un mismo óvulo y también pueden coexistir en el mismo óvulo sacos embrionarios meióticos y sacos embrionarios apospóricos (Grossniklauss, 2001; Naumova & Vielle-Calzada, 2001).

Apomixis esporofítica o embrionía adventicia

En la apomixis esporofítica los embriones se originan directamente a partir de una célula del esporofito (una célula somática del óvulo), generalmente del tejido nucelar o del tegumentario (Naumova, 1993; Koltunow et al., 1995). Generalmente se forman embriones múltiples (esporofíticos) que comparten el ovario junto con el embrión de origen sexual y que utilizan su endospermo para desarrollarse. Las células nucelares destinadas a formar embriones se diferencian morfológicamente de las otras células normales por tener un núcleo grande y un citoplasma denso. Se desconocen los mecanismos fisiológicos y el momento en el cual se determina el destino de estas células para que se transformen en células iniciales embrionarias (Koltunow, 1993). Entre las especies de importancia económica que presentan este tipo de apomixis se encuentran los cítricos, los cuales representan un sistema modelo para estudiar

este tipo de apomixis, el mango (*Mangifera indica* L.) y las orquídeas (Naumova, 1992; Koltunow, 1993).

2. 2. 1. Importancia de la apomixis en el mejoramiento genético

La apomixis había sido considerada como un callejón sin salida de la evolución (Darlington, 1939). Pero se ha comprobado que la apomixis representa una herramienta valiosa para la selección de individuos ampliamente adaptados a diferentes condiciones ambientales y como promotora de la perpetuación y dominancia de (los) genotipo(s) híbrido(s) de mayor aptitud a dichas condiciones (Quero Carrillo et al., 2010). Este modo reproductivo está presente en más de 400 especies de angiospermas, y es característico de unas pocas especies relevantes para la agricultura, entre ellas, especies forrajeras (Spillane et al., 2001).

El uso de la apomixis como una herramienta en el mejoramiento para la obtención de cultivares superiores se puede realizar a través de la selección de los mejores biotipos de las especies que tengan el carácter o por un mecanismo que permita superar la barrera de la apomixis para poder realizar cruzamientos controlados y una posterior selección. Existen muchas especies apomícticas que fueron domesticadas y que se cultivan actualmente (Asker & Jerling, 1992). Entre ellas es importante destacar a un grupo de gramíneas forrajeras, tales como *Panicum máximum* Jacq., *Poa pratensis* L., *Brachiaria decumbens* Stapf, *Brachiaria brizantha* Hochst ex A. Rich., *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick., *Eragrostis cúrvula* (Scharder) Nees, *Cenchrus ciliaris* L., *Paspalum notatum* Flüggé, *Paspalum dilatatum* Poir y *Paspalum atratum* Swallen. Entre los enfoques prometedores para aumentar significativamente la productividad de los cultivos, la transferencia de la reproducción clonal a través de semillas o apomixis representaría un enorme beneficio para la agricultura (Vielle-Calzada et al., 1996).

Teniendo en cuenta la ausencia en la naturaleza de genotipos sexuales, que sean co-específicos y del mismo nivel de ploidía que los que se reproducen por apomixis, los cruzamientos no son posibles en estas especies. En el género *Paspalum*, la mayoría de las especies apomícticas son tetraploides y generalmente poseen la contrapartida co-específica diploide sexual (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013) y entonces el mejorador, al no poder

realizar cruzamientos, no puede juntar en un individuo o en una población, la combinación o combinaciones génicas más adecuadas para lograr una mejor calidad o producción. En realidad, hace ya casi cinco décadas que se ideó una manera de contrarrestar esta dificultad. Mediante el tratamiento con colchicina se duplicaron los cromosomas de citotipos diploides para obtener plantas tetraploides sexuales (Forbes & Burton, 1961). Puesto que los citotipos naturales apomícticos producen gametos masculinos haploides, resulta factible cruzar las plantas 4x sexuales inducidas con polen de 4x apomícticos de la misma especie. La experiencia indica que los híbridos obtenidos son fértiles y segregan, ya en F_1 , para el sistema reproductivo. Es decir, en la F_1 aparecen individuos sexuales y otros apomícticos, en proporciones variables y no siempre fáciles de explicar de acuerdo con las leyes de Mendel (Burton & Forbes, 1960; Martínez et al., 2001; Cáceres et al., 1999; Aguilera et al., 2015). No obstante, es posible reunir en una F_1 alguna característica agronómica destacable, o vigor híbrido, con el carácter apomixis (Hanna & Bashaw, 1987). De esa manera, es factible conseguir en una sola generación una combinación genética superior y a la vez que esta combinación sea estable por su carácter apomíctico. Sin embargo, producir plantas autotetraploides a partir de plantas diploides sexuales no es tarea fácil. Por lo menos ha sido una tarea muy poco efectiva, ya que sólo se han conseguido auto-tetraploides inducidos en tres especies: *P. notatum* (Forbes & Burton, 1961; Quarin et al., 2001; Acuña et al., 2009); en *P. simplex* (Cáceres et al., 1999) y en *P. plicatulum* (Sartor et al., 2009). Más aún, no todas las plantas 4x obtenidas eran de reproducción sexual ya que en algún caso, al inducirse la duplicación cromosómica, algunos neotetraploides resultaron ser apomícticos facultativos (Quarin et al., 2001).

3. El Grupo *Plicatula*

Ante la falta de revisión taxonómica completa del género *Paspalum*, se aceptan las categorías taxonómicas subgenéricas propuestas y seguidas por Chase (1929) en su revisión del género para América del Norte y en su obra inconclusa e inédita (Chase, inédito). No tienen identidad formal y la autora denomina “grupos” a estas categorías subgenéricas. Dentro de estos grupos se encuentra al “Grupo *Plicatula*”.

El Grupo *Plicatula* contiene alrededor de 30 especies morfológicamente afines a *P. plicatulum*, la especie primeramente descrita entre las del grupo (Chase, inédito). El grupo se caracteriza por poseer el antecio de color pardo-negruzco brillante y lemma estéril con corrugaciones o pliegues transversales (en latín, *plicatulum* significa plegado). Las diferentes especies se reconocen por la morfología de las espiguillas; sin embargo la delimitación de los taxones se dificulta por la marcada variabilidad de los caracteres vegetativos y reproductivos (Zuloaga & Morrone, 2005).

Las especies incluidas en el grupo *Plicatula* que habitan en América del Sur según Zuloaga y Morrone (2005) son las siguientes: *P. atratum* Swallen, *P. chaseanum* Parodi, *P. compressifolium* Swallen, *P. convexum* Humb. & Bompl. ex Flüggé, *P. geminiflorum* Steud, *P. guenoarum* Arech, *P. glaucescens* Hack, *P. limbatum* Henrard, *P. macranthecium* Parodi, *P. melanospermum* Desv. ex Poir, *P. modestum* Mez, *P. nicorae* Parodi, *P. palustre* Mez, *P. plicatulum*, *P. scrobiculatum* L, *P. wrightii* Hitchc. & Chase. En cambio Chase (1939) en su manuscrito inédito incluye además a las siguientes especies dentro del grupo *Plicatula*: *P. amazonicum* Trin, *P. arenarium* Arech., *P. boscianum* Flüggé, *P. centrale* Chase, *P. crustarium* Chase, *P. collinum* Chase, *P. ellipsoidalis* Chase, *P. foveolatum* Steud, *P. goyanum* Chase, *P. hydrophilum* Henr, *P. lacustre* Chase, *P. leptachne* Chase, *P. otembense* Leon, *P. palustrine*, *P. plicatulum* Michx. var. *longipilum* Hack., *P. plicatulum polystachyum* Munro Inés, *P. pontanale* Chase, *P. pubifolium* Presl, *P. riparium* Nees, *P. rojasii* Hack, *P. subrotundum* (Doell) Chase, *P. texanum* Swallen, *P. turgidum* Chase, *P. urbanianum* Ekman, *P. yaguaronense* Henr.

El centro geográfico de variación del grupo *Plicatula* se encuentra en el centro y oeste de Brasil, y el este de Bolivia y Paraguay (Quarin et al., 1997). Las diferentes especies presentan una amplia distribución ecológica, abarcando desde suelos arenosos, rocosos, campos abiertos, secos, inundados, márgenes de arroyos y esteros, algunas especies forman embalsados en cursos de agua o en bordes de arroyos y ríos. En la Tabla 1 figura la distribución geográfica y el tipo de ambiente que habitan las especies del grupo que se utilizaron para llevar a cabo esta tesis.

Tabla 1. Distribución geográfica y ecológica de las especies que se utilizaron en esta tesis.

Especies	Distribución geográfica	Distribución ecológica
<i>P. chaseanum</i> Parodi	Argentina, Bolivia y Paraguay.	Campos o sabanas abiertas, sobre suelos arenosos.
<i>P. compressifolium</i> Swallen	Noreste de Argentina, Bolivia, centro y sur de Brasil y región oriental de Paraguay.	Terrenos bajos y húmedos.
<i>P. guenoarum</i> Arechav.	Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay.	Suelos húmedos, rocosos o flojos. Bordes de arroyos, ríos, bañados.
<i>P. lenticulare</i> Kunth	Argentina, Bolivia, Brasil y Venezuela.	Suelos arcillosos, húmedos, rocosos.
<i>P. macedoi</i> Swallen	Bolivia y Brasil.	Suelos inundables, terrenos bajos y en márgenes de arroyos.
<i>P. modestum</i> Mez	Argentina, Paraguay, Sur de Brasil y Uruguay.	Suelos bajos, inundables, esteros, pantanos y bordes de arroyos.
<i>P. nicorae</i> Parodi	Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay.	Suelos bajos, preferentemente suelos flojos y arenosos.
<i>P. oteroi</i> Swallen	Argentina y Brasil (Mato Grosso do Sul y San Pablo).	Suelos arenosos, suelos inundables.
<i>P. palustre</i> Mez	Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay.	Sabanas inundables, campos bajos y húmedos. Forma embalsados en cursos de agua o en bordes de arroyos y ríos.
<i>P. plicatum</i> Michx.	Argentina, Brasil, Estados Unidos y Uruguay.	Sabanas, campos secos o bajos, preferentemente sobre suelos arenosos y arcillosos, húmedos y en bordes de caminos, vías férreas y suelos modificados.
<i>P. rojasii</i> Hackel	Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay.	Suelos arenosos, húmedos. Tolerante a anegamientos.
<i>P. wrightii</i> Hitchc. & Chase	Argentina, Brasil, Cuba, EEUU, Guyanas, México, Uruguay y Venezuela.	Suelos bajos y en márgenes de arroyos. Frecuentemente asociado a plantaciones de arroz.

3. 1. Estudios citogenéticos y reproductivos

Al igual que en el género *Paspalum*, las especies de este grupo son mayormente poliploides y el citotipo 4x es el predominante (Ortiz et al., 2013). El modo de reproducción se halla fuertemente vinculado al nivel de ploidía.

La mayoría de las especies son 4xA, pero para algunas de esas especies se han identificado citotipos 2x de reproducción sexual, como por ejemplo: *P. plicatulum* (Espinoza & Quarin, 1997), *P. wrightii* Hitchc. & Chase (Martínez & Quarin, 1999, sub *P. hydrophyllum* Henrard), *P. glaucescens* Hack. (Pritchard 1962, sub *P. yaguaronense* Henrard), *P. compressifolium* Swallen (Quarin et al., 1996), *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001; sin. *P. limbatum*). Para otras especies se conocen solamente plantas 4xA, como por ejemplo: *P. nicorae* Parodi (Burson & Bennett, 1970), *P. guenoarum* Arech. (Pritchard, 1970), *P. atratum* Swallen (Quarin et al., 1997), *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001) y *P. plicatulum* (Saura, 1941; Bashaw et al., 1970; Pritchard, 1970; Burson & Bennett, 1971). Varias de estas especies fueron introducidas al cultivo, tales como *P. nicorae*, *P. atratum* y *P. guenoarum* (Espinoza et al., 2001; Urbani & Quarin, 2002; Evers & Burson, 2004), las cuales fueron coleccionadas en la naturaleza y evaluadas por sus características de interés agronómico, para ser seleccionadas y luego propagarlas.

Teniendo en cuenta que los genotipos 4x son apomícticos y los genotipos 2x son sexuales, el mejoramiento genético basado en cruzamientos y recombinación génica no es posible porque la apomixis surge como un impedimento serio para la domesticación y el mejoramiento genético. Contar con plantas tetraploides sexuales es un requisito elemental para poder realizar estudios básicos de la apomixis y para poder iniciar con cualquier programa de mejoramiento genético. La obtención de plantas sexuales 4x depende de la duplicación de los cromosomas de una planta 2x.

Contar con plantas 2xS dentro del grupo *Plicatula* como *P. plicatulum* (Espinoza & Quarin, 1997), permitió mediante el uso de colchicina, la obtención de plantas tetraploides sexuales (Sartor et al., 2009). Esto actualmente permite usar a estas plantas 4xS como progenitores femeninos en cruzamientos intra e interespecíficos con especies 4xA del mismo grupo y así incorporar a estas especies dentro de un programa de mejoramiento genético. Si los cruzamientos son efectivos, las F₁ logradas resultan ser híbridas, con la presencia de plantas de reproducción apomíctica y sexual, y si las plantas sexuales son interfértiles, es posible armar un pool de plantas sexuales con una amplia variabilidad genética recibida desde plantas apomícticas utilizadas como parentales masculinos. Una de las vías para comprobar la interfertilidad es mediante

cruzamientos dialélicos con o sin recíprocos incluidos. El sistema de cruzamientos dialélicos fue definido como el conjunto de todos los cruzamientos posibles entre varios genotipos (Hayman, 1954). Vallejo & Estrada Salazar (2002) definen a los cruzamientos dialélicos como un sistema de apareamiento en donde p progenitores se cruzan entre sí para producir un número determinado de progenies aplicando la fórmula $p(p-1)$ cuando se incluyen cruzamientos recíprocos y $p(p-1)/2$ cuando no se incluyen a los recíprocos. Para estos autores, el número de progenitores que se pueden incluir en los cruzamientos dialélicos es una de las principales limitaciones. La mayoría de los trabajos que involucran cruzamientos dialélicos, utilizan 10 progenitores o menos, teniendo en cuenta que se hace difícil manipular muchos cruzamientos (Vallejo & Estrada Salazar, 2002); además otro inconveniente que se presenta es el diseño experimental y el espacio físico que se necesita (Vallejo, 1976). Es por eso que si se cuenta con un número elevado de progenitores, es conveniente tomar solo una muestra de los mismos. Estos individuos serían la base para dar lugar a una población de policruzamientos entre plantas sexuales. Allard (1964) define al policruzamiento como la polinización abierta que ocurre en un conjunto de genotipos (generalmente seleccionados), aislados de otros genotipos compatibles, y así asegurar el policruzamiento entre sí. En base al modelo genético para la herencia de la apomixis propuesto para diferentes especies de *Paspalum* (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Aguilera et al., 2015), y para otras gramíneas tropicales como *Megathyrsus maximus* (Jacq.) BK Simon & SWL Jacobs (Savidan, 1975) y *Brachiaria* sp. (Valle & Glenke, 1993) el cual considera que la aposporia estaría controlada por un gen dominante con herencia tetrasómica, es por eso que en cruzamientos entre plantas sexuales \times sexuales siempre dan progenies de reproducción sexual. Dentro de *Plicatula* se obtuvieron progenies de reproducción sexual cuando se cruzaron *P. plicatulum* \times *P. guenoarum* y también cuando se produjo la autofecundación de las plantas F_1 sexuales (Aguilera et al., 2015).

II. HIPÓTESIS

- Varias de las especies apomícticas del grupo *Plicatula* son de origen autotetraploide.
- Comparten el mismo juego o set básico de cromosomas, con posibles particularidades o diferencias estructurales.
- La homología entre los genomas de estas especies del grupo *Plicatula* es variable, y por lo tanto, el apareamiento cromosómico en la meiosis de los híbridos es posible.

De ser válida estas hipótesis deberían poder verificarse las siguientes:

Predicciones

- En las CMP de los híbridos interespecíficos o intraespecíficos esperamos encontrar mayor proporción de cromosomas formando asociaciones bivalentes o cuadrivalentes, dependiendo del menor o mayor grado de homología entre los genomas aportados por los parentales.
- Padres autotetraploides con genomas menos homólogos entre sí, darían híbridos en los que la meiosis tendría mayor proporción de cromosomas formando bivalentes, y por lo tanto, esperamos un buen grado de fertilidad en los híbridos.
- En padres con genomas más homólogos esperamos mayor cantidad de multivalentes (cuadrivalentes y trivalentes) en sus híbridos, y menor fertilidad debida a algunas irregularidades en la formación de gametas por desbalance cromosómico.
- Las dos plantas sexuales 4x logradas por Sartor et al., (2009) constituyen la clave para transferir genes desde citotipos 4x apomícticos a varias especies del grupo *Plicatula* del género *Paspalum*.
- Las poblaciones híbridas F₁ que se podrían formar cruzando los citotipos 4x de las distintas especies con las dos plantas 4x sexuales de *P. plicatulum*, serían poblaciones interfértiles, posibilitando el desarrollo de una población tetraploide sexual sintética.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Transferir genes de citotipos tetraploides apomícticos de distintas especies del grupo *Plicatula* hacia *P. plicatulum* para formar, mediante selección por sistema reproductivo y fertilidad, una población tetraploide sexual de amplia variabilidad genética. Se pretende que esta población sea la base para el mejoramiento genético de especies tetraploides apomícticas del grupo *Plicatula* de *Paspalum*.

Objetivos específicos

- Formar familias híbridas cruzando plantas sexuales 4x de *P. plicatulum* con polen de citotipos tetraploides apomícticos de otras especies del grupo *Plicatula*, en búsqueda de híbridos fértiles que segreguen para el carácter apomixis.
- Establecer las relaciones genómicas entre distintas especies 4x del grupo *Plicatula* y comprobar si todas ellas comparten el mismo set básico de cromosomas.
- Comprobar, mediante cruzamientos controlados dialélicos entre plantas de distintas familias híbridas, si a su vez son interfértiles, y de esta manera formar un pool de plantas sexuales tetraploides dentro del grupo *Plicatula*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se utilizaron plantas sexuales de origen experimental y plantas tetraploides ($2n=4x=40$) apomíticas naturales de especies pertenecientes al grupo Plicatula (Tabla 2). Las plantas tetraploides sexuales ($4xS$) (Figura 2) son autotetraploides, obtenidas por Sartor et al. (2009) por duplicación cromosómica mediante el tratamiento con colchicina de semillas de un genotipo diploide y sexual de *P. plicatulum*. Las plantas tetraploides apomíticas ($4xA$) (Figura 3) corresponden a 21 genotipos tetraploides ($2n=4x=40$) que representan a 12 especies diferentes coleccionadas en el área natural de su distribución. Estas plantas se encuentran creciendo en macetas dentro del invernáculo y/o en pequeñas parcelas en los predios de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (FCA-UNNE), Corrientes, Argentina. Las identificaciones y los lugares de colección de los materiales utilizados en este estudio están detallados en la Tabla 2.

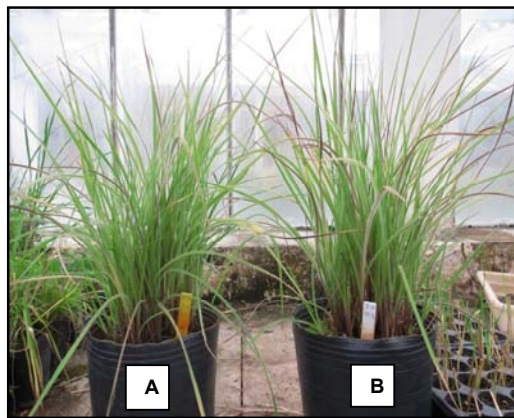


Figura 1. Parentales femeninos de *P. plicatulum* $4xS$ A) genotipo 7PT y B) genotipo 4PT.

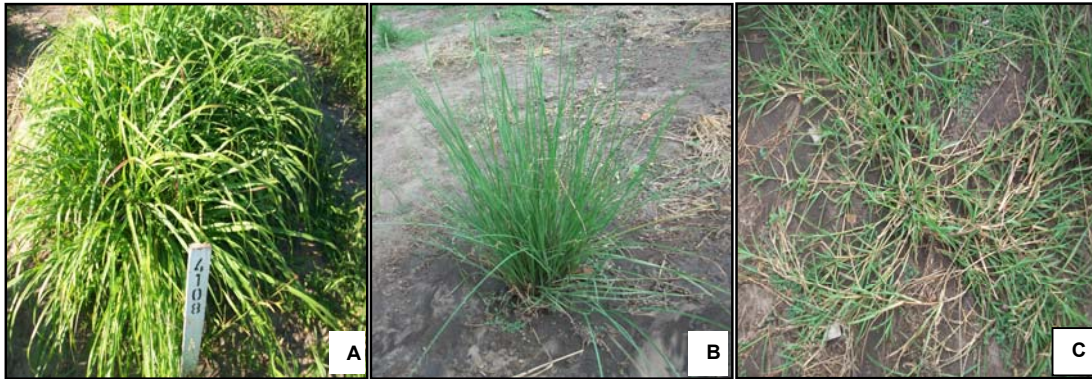


Figura 2. Algunos de los parentales 4xA masculinos: A) *P. guenoarum* Q4108 B) *P. nicorae* PI508821 C) *P. oteroi* A&V1332.

Tabla 2. Genotipos 4xA y 4xS del grupo Plicatula de *Paspalum* pertenecientes a la colección viva del IBONE, utilizados en esta tesis.

Especie	Identificación ¹	Modo de reproducción ²	Origen
<i>P. chaseanum</i>	ST13894	A	Bolivia, Dep. Sta.Cruz, Pcia. Cordillera, 98 km de Boyuibe, carretera transchaco (recibido de C.J.Saravia Toledo).
<i>P. compressifolium</i>	AK40811	A	Brasil, Paraná, Vila Velha.
<i>P. guenoarum</i>			
	Azulao	A	Brasil, Porto Alegre, recibido de la Facultad de Agronomía, Universidad Federal de Rio Grande do Sul (M.Dall'Agnol).
	Baio	A	Brasil, Porto Alegre, recibido de la Facultad de Agronomía, Universidad Federal de Rio Grande do Sul (M.Dall'Agnol).
	BO107	A	Paraguay, recibido del Margot Forde Forage Germplasm Centre, Nueva Zelanda.
	Q4108	A	Bolivia, Chuquisaca, Luis Calvo, semilla recibida del Centro de Investigación y Mejoramiento Bovino Criollo (CIMBOC).
<i>P. lenticulare</i> ³			
	V11893	A	Brasil, Mato Grosso do Sul, 16 km S de Ponta Porá. Recibido de CENARGEN-EMBRAPA. (J.F.M.Valls).
	BO190	A	Semillas recibidas del Forage Germplasm Centre, Nueva Zelanda, como Cultivar Bryan de

Materiales y Métodos

<i>P. plicatum</i> .			
<i>P. macedoi</i>	TK2323	A	Bolivia, Santa Cruz, 25 km, S de Concepción. (T. Killeen).
<i>P. modestum</i>	Hojs395	A	Argentina, Corrientes, Ituzaingó, ruta nacional 12, km 1258.
<i>P. nicorae</i>			
	CPI27707	A	Brasil, Río Grande do Sul, Santa María. Recibido de Australian Tropical Crops and Forages Collection.
	PI508821	A	Argentina, Entre Ríos, Arroyo Sauce, ruta nacional 14, S de Gualeguaychú. Recibido de B.L. Burson.
<i>P. oteroi</i>	A&V1332	A	Brasil, Carumbá, Fazenda Firme. Recibido de CENARGEN-EMBRAPA. (J.F.M.Valls).
<i>P. palustre</i>	AOB110	A	Argentina, Formosa, SSW de Ibarreta, km 13. Recibido de A.O.Bordón.
<i>P. plicatum</i>			
	Q4087	A	Argentina, Corrientes, Cruzú Cuatía.
	4PT	S	Argentina, Corrientes. Autotetraploide inducido por colchicina (Sartor et al., 2009).
	7PT	S	Argentina, Corrientes. Autotetraploide inducido por colchicina (Sartor et al., 2009).
	Hojs388	A	Argentina, Corrientes, San Cosme, km1066
	ML5	A	Uruguay, ruta 5, km 266. (M. Lavandera).
<i>P. rojasii</i>	AK40732	A	Brasil, Paraná, Vila Velha.
<i>P. wrightii</i>			
	Q4158	A	Argentina, Corrientes, 104 km E de Corrientes.
	U89	A	Argentina, Chaco, Departamento Maipú, 3,5 km N del acceso a Tres Isletas, ruta 95.
	U90	A	Argentina, Corrientes, Campus Deodoro Roca – UNNE.

¹Las identificaciones precedidas por las letras: AK, Hojs, Q y U corresponden a colecciones realizadas por investigadores del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) Antonio Krapovickas, Diego Hojsgaard, Camilo L. Quarin y Mario H. Urbani, respectivamente.

²A: apomixis; S: sexual

³El cultivar Bryan fue asignado como especie de *P. plicatum* Michx. Siguiendo el criterio de Oliveira & Valls (2008) identificamos este material como *P. lenticulare* Kunth.

2. Cruzamientos y obtención de las progenies

Se realizaron cruzamientos intra e interespecíficos, utilizándose siempre como parental femenino a las plantas sexuales 4PT y 7PT de *P. plicatum*. De los 21 genotipos masculinos seleccionados para realizar los cruzamientos, 20 se cruzaron con la planta 4PT y uno con la planta 7PT. Se usó preferentemente como madre a la planta 4PT por ser totalmente autoincompatible, y por lo tanto, no fue necesario hacer emasculación antes de hacer la polinización. Sin embargo, en aquellos cruzamientos que involucraron a la planta 7PT, se utilizó una cámara de niebla artificial para realizar la emasculación y evitar la autopolinización siguiendo el método de Burton (1948).

Ambas plantas sexuales se caracterizan por iniciar la antesis aproximadamente a las 11:00 hs y extenderse hasta alrededor de las 13:00 hs. Antes del inicio de la floración, las inflorescencias de las plantas madres fueron aisladas usando sobres de papel sulfito para evitar la contaminación con polen de genotipos extraños. A la mañana siguiente, dependiendo del inicio de la floración del genotipo masculino, se colectó el polen en sobres de papel sulfito, los mismos fueron conservados en el laboratorio hasta el momento de realizar la polinización. Luego de producirse la antesis de la planta madre, se espolvoreó el polen sobre los estigmas, y se aisló nuevamente a la inflorescencia. Este proceso se repitió durante 4 a 6 días hasta que la planta madre completara la antesis de todas las espiguillas de la inflorescencia. Las inflorescencias polinizadas permanecieron ensobradas durante aproximadamente 30 días hasta el momento de la cosecha. Luego de cosechadas, fueron secadas en estufa a 37°C durante 24 horas y luego manualmente se separaron las espiguillas y se clasificaron como llenas o vacías utilizando un soplador de semillas (Seedburo Equipment Company 1022W. Jackson Blvd. Chicago. IL 60607 1-800-284-5779). En los cruzamientos donde se obtuvieron cariopses, éstos fueron colocados en germinadores preparados en bandejas de plástico con suelo estéril en el mes de julio-agosto. Luego de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de terracota y/o plásticas para finalmente ser trasladadas al campo experimental de la FCA-UNNE.

3. Determinación del origen de los descendientes

Se corroboró el origen híbrido de las progenies utilizando marcadores dominantes (RAPDs= Random Amplified Polymorphic DNA) específicos del progenitor masculino, considerando que todos los descendientes que amplificaban algunos de esos marcadores, eran efectivamente de origen híbrido.

A) Extracción de ADN genómico

Se realizaron microextracciones de ADN genómico a partir de hojas jóvenes de las F_1 obtenidas y de sus respectivos parentales, siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983). Se cosecharon entre 0,2 y 0,4 gramos de hojas frescas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, las que posteriormente fueron molidas con un mortero y un pilón de porcelana enfriados con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml y se mantuvo en nitrógeno líquido hasta el momento de procesar la muestra. A cada tubo Eppendorf se le 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 1% PM 360.000], el cual fue previamente precalentado a 68°C y al que se le agregó 100 μ l de β - mercaptoetanol por cada 10 ml de "buffer". Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 68°C. Luego se añadieron 250 μ l de acetato de potasio 5M y se incubaron en hielo durante 1 hora. Los tubos Eppendorf se centrifugaron 10 minutos a 13000 rpm en centrifuga Eppendorf 5407 refrigerada a 4°C. Se tomaron 900 μ l del sobrenadante y se transfirieron a otro tubo Eppendorf de 2 ml, se agregaron 1100 μ l de isopropanol frío y se mantuvieron toda la noche a -20°C. Posteriormente estos tubos fueron centrifugados nuevamente durante 10 minutos a 1300 rpm a 4°C, se descartaron los sobrenadantes, se secaron los pellets a temperatura ambiente durante 30 minutos. Estos pellets se resuspendieron en 250 μ l de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8) y EDTA 1 mM (pH 8)] y se agitaron durante aproximadamente una hora para disolver los pellets. Luego se agregó a cada tubo un 1 μ l de ARNasa A (10mg/ml) y fueron mantenidos en agitación a 100 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cada una de las muestras fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1,5 ml, conteniendo el mismo volumen de una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo.

Los tubos fueron agitados por inversión durante algunos segundos y luego se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se transfirieron 150 µl de la fase superior a tubos Eppendorf limpios y se agregaron 0,5% v/v de NaCl 5M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó durante toda la noche a -20°C. Luego de la incubación se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartaron los sobrenadantes y los pellets fueron lavados con 1 ml de etanol al 70%. Las muestras nuevamente se centrifugaron 13000 rpm 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y los pellets fueron secados en estufa a 37°C. Una vez secos se disolvieron en 25 µl agua ultrapura estéril.

B) Calidad y concentración de ADN

La concentración del ADN de cada una de las muestras fue estimada mediante el uso de un espectrofotómetro (SmartSpec 3000 de BioRad) mediante mediciones de absorbancia a 260 nm (Sambrook et al., 1989). Una vez determinada la concentración, se realizaron las diluciones correspondientes para estandarizar la concentración en 300 ng/µl. La calidad del ADN se chequeó 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 1µl de cada muestra con “buffer” de siembra 1X (azul de bromofenol 0,25 %, xilen-cianol 0,25% y glicerol 30%). La electroforesis fue realizada a 40V durante aproximadamente 2 horas. Luego fueron teñidas con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) por 30 minutos aproximadamente y visualizadas con ayuda de un transluminador de luz ultravioleta (GelDoc Imaging System Ultraviolet Transluminator BioImaging Systems). Finalmente, todas las muestras de ADN fueron conservadas a -20 °C.

C) Estudio de RAPD

Las reacciones de amplificación de RAPD se realizaron siguiendo la técnica descrita por Williams et al. (1990). Para las amplificaciones por PCR inicialmente se realizó un “screening” usando ADN de los parentales utilizados en los cruzamientos que produjeron descendencia y cebadores (decámeros) al azar adquirido de la Universidad de British Columbia (Vancouver, BC, Canadá) a fin de seleccionar aquellos cebadores que amplificaron marcadores exclusivos del progenitor masculino.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 20 ng de ADN genómico, 15 μ M de cada dNTP's, 30 ng de cebador, 1 unidad de ADN polimerasa Go Taq (Promega) y 1X de "buffer" de la enzima. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra UNO, con el programa de ciclado indicado en la Tabla 3.

Una vez finalizada la amplificación, a cada tubo de reacción se agregaron 5 μ l de "buffer" de siembra (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25 % p/v). Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% p/v en TAE 1X. La electroforesis se realizó en cubas horizontales durante 4 hs a 60 A, luego se tiñeron los geles con bromuro de etidio (10 μ g/ml) y se observaron los fragmentos obtenidos en un transiluminador UV. A través de un digitalizador de imagen (GelDoc Imaging System Ultraviolet Transluminator BioImaging Systems) se documentaron los productos de amplificación.

Tabla 3. Programa de ciclado utilizado en las amplificaciones de RAPD.

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	93°C	2 minutos
	93°C	1 minuto
45	36°C	1 minuto
	72°C	2 minutos
1	72°C	5 minutos

4. Características fenotípicas de los descendientes

Se hizo la comparación de seis características fenotípicas de algunos individuos de las progenies con respecto a esas mismas características en sus progenitores, esta comparación se realizó con el objetivo de tener una idea general de las variaciones fenotípicas en las progenies en relación a sus respectivos progenitores masculinos y así ayudar a identificar el origen híbrido. Las características fenotípicas que fueron consideradas fueron las siguientes:

- Longitud del eje de la inflorescencia: tomada desde la inserción del racimo basal hasta la inserción del racimo apical (en cm).

- Número de racimos por inflorescencia.
- Longitud del racimo basal de la inflorescencia (en cm).
- Longitud del racimo apical de la inflorescencia (en cm).
- Ancho de la hoja inmediata inferior a la hoja bandera. La medida fue tomada en la mitad de la lámina (en cm).
- Longitud de la hoja inmediata inferior a la hoja bandera (en cm).

La caracterización fenotípica se realizó en cuatro individuos de cada progenie y en sus respectivos parentales, o en menor número si la progenie no alcanzaba a 4 individuos. En análisis se realizó en 3 inflorescencias por planta. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el programa InfoStat (Di Rienzo, 2002), realizando el Test de Tuckey al 5% de significancia para la comparación de medias de cada variable y además se calculó el desvío estándar.

5. Estudios de la meiosis

El análisis se realizó en 2 a 5 individuos por población F_1 y en sus respectivos parentales. Los preparados de meiosis se hicieron a partir de espiguillas tomadas de inflorescencias inmaduras, fijadas en solución 5:1 (v/v) de etanol absoluto:ácido láctico por 24 horas y luego fueron almacenadas en etanol al 70 % a 4°C. A partir del aplastado de anteras jóvenes en carmín acético al 2%, se hicieron preparados citológicos permanentes con una solución de terpentina de Venecia en los que se observaron células madres del polen (CMP). Los preparados permanentes fueron observados con un microscopio óptico de luz transmitida y eventualmente con contraste de fases para estudiar las asociaciones cromosómicas de las células en las fases de diacinesis y metafase I.

6. Estudios de fertilidad

Los análisis de fertilidad se realizaron en algunos individuos de las F_1 obtenidas y sus respectivos parentales considerando la proporción de espiguillas que formaron granos en condiciones de autopolinización y polinización libre.

La autopolinización se realizó ensobrando 2 o 3 inflorescencias de cada planta con sobres de papel sulfito, un día antes del inicio de la antesis, para prevenir

el ingreso de polen extraño y así obligar a las espiguillas a autopolinizarse. Estas permanecieron ensobradas hasta la maduración de las semillas (aproximadamente 30 días). En las polinizaciones libres las inflorescencias fueron ensobradas una vez finalizada la antesis de todas las espiguillas y permanecieron así hasta completar su maduración. Posteriormente, se colectaron los sobres, se cosecharon las semillas. Se separaron las espiguillas llenas de las vacías mediante un soplador de semillas como fué descrito en el punto 2.

7. Determinación del modo reproductivo

El modo reproductivo de cada F_1 fue determinado por citometría de flujo utilizando un citómetro Partec PAII (Ploidy Analyser II, Partec GmgH, Münster, Alemania) de acuerdo a la metodología descrita por Matzk et al. (2000).

Para cada planta, el análisis se realizó en grupos (“bulks”) de 2 a 5 cariopses, analizándose entre 3 y 65 cariopses por individuo. Los cariopses fueron finamente cortados con una hoja de afeitar en 0,5 ml de “buffer” para extracción nuclear, dejando incubar durante 2 minutos. La solución fue pasada por un filtro de 30 μm y transferida a un tubo en el cual se adicionó 1,5 ml del “buffer” de tinción fluorescente 4 α 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los “buffers” de extracción y tinción son parte de un kit comercial CyStain UV Precise P Partec, Münster, Germany. Las suspensiones fueron analizadas pasándolas a través de un citómetro de flujo, con el detector operando a 355 nm y los datos fueron analizados con el paquete de software de computación PA-II Partec FloMax.

8. Población sintética de reproducción sexual

8.1. Selección de híbridos F_1 sexuales y policruzamientos

Se consideraron los híbridos de reproducción sexual de 9 familias híbridas, las cuales incluían a 2 progenitores femeninos y a 9 progenitores masculinos, pertenecientes a 6 especies diferentes (Tabla 4).

Estimando visualmente el vigor y la capacidad de producir semillas de los híbridos se realizó una selección de los individuos más vigorosos pero teniendo en cuenta que también sean capaces de producir semillas. De estos se

eligieron uno a dos individuos de cada familia para realizar cruzamientos dialélicos inter-familia y así comprobar si estas familias eran interfértiles. Para ello, antes del inicio de la floración se ensobraron las inflorescencias. A la mañana siguiente, una vez finalizada la antesis, se intercambiaban los sobres entre los individuos que intervenían en un cruzamiento dialélico, sacudiéndolos al colocarlos de tal manera de asegurar la distribución del polen sobre la inflorescencia. El intercambio de sobres con polen se realizó diariamente durante aproximadamente 4 a 6 días, y luego se mantuvieron ensobradas durante 30 días para evitar la caída y pérdida de las semillas maduras. Para la cosecha se cortaron las inflorescencias y se colocaron en estufa a 37°C durante 24 horas. Se estableció la proporción de espiguillas que formaba cada híbrido y, siempre que fue posible, se comparó con la producción de semilla de ese mismo híbrido en autopolinización.

De los híbridos seleccionados se hicieron réplicas por división de matas, para poder distribuirlos en el espacio de tal manera que cada uno de ellos tenga chances de quedar ubicado cerca de todos los otros en la distribución dentro de la parcela. El número de híbridos por familia fue variable porque en algunos casos las familias estaban constituidas por pocos híbridos; en otros casos había familias que, aunque numerosas, los híbridos con desarrollo vigoroso eran escasos. La cantidad de réplicas de cada híbrido era inversamente proporcional al número de híbridos seleccionados de esa familia. De esa manera se trató de que todos los híbridos en la parcela tuviesen aproximadamente las mismas chances de inter cruzarse con todos los demás.

Tabla 4. Familias híbridas de genotipos 4xS × 4xA de *Paspalum* que fueron incluidos para formar la población sintética sexual.

Parentales ♀ 4x Sexuales		Parentales ♂ 4x Apomícticos
<i>P. plicatulum</i> 4PT	×	<i>P. chaseanum</i> ST13894
	×	<i>P. guenoarum</i> Azulao
	×	<i>P. guenoarum</i> Baio
	×	<i>P. guenoarum</i> Q4108
	×	<i>P. guenoarum</i> GR19
	×	<i>P. nicorae</i> PI508821
	×	<i>P. oteroi</i> A&V1332
	×	<i>P. plicatulum</i> Hojs388
<i>P. plicatulum</i> 7PT	×	<i>P. lenticulare</i> V11893

8.2. Policruzamiento

Se llama policruzamiento a la polinización abierta de un grupo de genotipos selectos, aislados de otros genotipos, para lograr exclusivamente el cruzamiento al azar entre esos genotipos selectos.

El inicio de la floración en la población de policruzamiento no fue uniforme en todos los individuos, entonces las primeras inflorescencias en aparecer fueron ensobradas con sobres de papel sulfito en las últimas horas del día, de manera que a la mañana siguiente una vez producida la antesis (8 a.m. aproximadamente) se intercambiaban al azar los sobres entre los distintos individuos que manifestaban floración temprana. Las inflorescencias se mantenían ensobradas y al día siguiente se repetía el intercambio de polen tratando que sucesivamente todos los individuos de floración temprana se crucen entre sí. Al finalizar la floración en todas estas inflorescencias, se las mantuvo ensobradas hasta la cosecha. Una vez que la floración fue uniforme en toda la población, no fue necesario ensobrar las inflorescencias y la polinización fue libre, considerando esa fecha como inicio del policruzamiento. A partir de entonces, y durante aproximadamente un mes, se evitó la floración de cualquier material del género *Paspalum* que creciera en las inmediaciones. Para eso se hicieron continuos cortes en el área para evitar cualquier contaminación con polen extraño y así asegurar la polinización exclusiva dentro de la población. Un poco más de un mes después de dar por iniciado el policruzamiento se cosecharon espiguillas maduras de todos los individuos. A

éstas se agregaron aquellas espiguillas logradas con intercambio de sobres sobre plantas de floración más precoz, de manera que no queden excluidos del policruzamiento los individuos de floración más precoz.

8.3. Formación de una población sintética 4x sexual

Las espiguillas recolectadas fueron separadas en llenas y vacías a través de un soplador de semillas como ya se describió. A fines del siguiente invierno una parte de las semillas llenas fueron puestas a germinar y las plántulas germinadas constituyeron la población sintética sexual. Las semillas remanentes se conservan en cámara fría y seca.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Análisis de las progenies

1. Generación de progenies

Se obtuvieron descendientes en 15 de las combinaciones realizadas. El porcentaje de espiguillas llenas fue variable, oscilando entre 0% y 51,5%. En 6 cruzamientos donde intervinieron como polinizadores *P. macedoi*, *P. modestum*, *P. palustre*, *P. plicatulum* (Q4087) y *P. wrightii* (Q4158 y U89) no se obtuvieron semillas (Tabla 5). De los cruzamientos que fueron efectivos se obtuvieron 238 individuos, los que fueron trasplantados a tierra en el campus de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNNE) Corrientes, Argentina (Figura 3). En el caso de *P. wrightii* se usaron tres genotipos diferentes como polinizadores y solamente se obtuvo un híbrido cuando se polinizó con el genotipo U90, pero ese individuo murió luego de ser llevado al campo.

Tabla 5. Cruzamientos realizados, número de espiguillas polinizadas, porcentaje de espiguillas llenas, número y porcentaje de F₁ obtenidas de cada cruzamiento entre *P. plicatum* (4PT, 7PT) × 21 genotipos, incluyendo 11 especies además de *P. plicatum*, todas tetraploides (2n = 40), pertenecientes al grupo Plicatula.

Cruzamientos	Espiguillas polinizadas (n°)	Espiguillas llenas (%)	F ₁ obtenidas (n°)	Cruzabilidad (%)
<i>P. plicatum</i> 4PT				
x <i>P. chaseanum</i> ST13894	254	11,8	27	10,6
x <i>P. compressifolium</i> AK40811	877	1,0	2	0,2
x <i>P. guenoarum</i> Azulao	572	32,0	45	7,9
x <i>P. guenoarum</i> Baio	367	19,6	59	16,1
x <i>P. guenoarum</i> BO107	94	6,4	4	4,2
x <i>P. guenoarum</i> Q4108	647	1,7	2	0,3
x <i>P. lenticulare</i> BO190	168	4,8	4	2,4
x <i>P. macedoi</i> TK2323	96	0,0	0	0,0
x <i>P. modestum</i> Hojs395	569	0,0	0	0,0
x <i>P. nicorae</i> CPI27707	992	1,1	3	0,3
x <i>P. nicorae</i> PI508821	147	13,1	15	10,2
x <i>P. oteroi</i> A&V1332	479	4,8	22	4,6
x <i>P. palustre</i> BOA110	115	0,0	0	0,0
x <i>P. plicatum</i> Hojs388	235	51,5	20	51,3
x <i>P. plicatum</i> ML5	360	3,6	13	3,6
x <i>P. plicatum</i> Q4087	449	0,0	0	0,0
x <i>P. rojasii</i> AK40732	816	2,8	17	2,1
x <i>P. wrightii</i> U89	137	0,0	0	0,0
x <i>P. wrightii</i> U90	382	1,3	1	0,3
x <i>P. wrightii</i> Q4158	271	0,0	0	0,0
<i>P. plicatum</i> 7PT				
x <i>P. lenticulare</i> V11893	131	3,1	4	3,0
Total	21	7962	238	



Figura 3. Familias híbridas obtenidas en distintos cruzamientos. A) 4PT × *P. nicorae* PI508821; 4PT × *P. plicatulum* Hojs388; 4PT × *P. oteroi* A&V1332; 4PT × *P. chaseanum* ST13894. B) 4PT × *P. guenoarum* Azulao.

Con excepción de los híbridos tetraploides ya logrados entre *P. plicatulum* y el cultivar “Rojas” de *P. guenoarum* (Aguilera et al., 2011; 2015), todas las combinaciones híbridas aquí logradas son originales, incluyendo cuatro nuevos genotipos de *P. guenoarum*, pertenecientes a cuatro colecciones provenientes de diferentes puntos geográficos. Se agregan, de esta manera, varias combinaciones de híbridos interespecíficos de *Paspalum* a los ya logrados por el mismo grupo de trabajo del IBONE. Las hibridaciones controladas entre diferentes especies de *Paspalum* ya tienen una larga historia. Involucran a un número grande de combinaciones interespecíficas, ya sean homoploides o heteroploides. La cruzabilidad interespecífica (capacidad entre dos especies parentales de dar descendencia viable) ha sido muy variable. Para tener una idea de cómo ha sido la cruzabilidad, se tomaron como muestra los datos de los cruzamientos interespecíficos y homoploides (ambos parentales con el mismo nivel de ploidía) realizados por el grupo del IBONE en la década del 80 y publicados hasta 1990 (Quarin & Burson, 1983; Quarin et al., 1984; Quarin & Norrmann, 1987; 1990; Caponio & Quarin, 1987; 1990). Se trata de 31 combinaciones de especies, incluyendo algunos cruzamientos recíprocos. En total se castraron y polinizaron aproximadamente 117000 espiguillas y se obtuvieron unos 370 híbridos interespecíficos, lo que implica una cruzabilidad general del 0,3%. Sin embargo; los valores fueron muy variables, entre 0% y 19%, y no están necesariamente correlacionados con el menor o mayor grado

de homología que puedan manifestar los cromosomas aportados al híbrido por los parentales. Por ejemplo, entre aquellas combinaciones que fueron efectivas y produjeron híbridos, la de menor cruzabilidad resultó la de dos diploides ($2n=20$), *P. haumanii* × *P. rufum* (0,017%), dos especies que comparten genomas en gran medida homólogos u homeólogos (8,4 bivalentes de promedio con una variación de 5 a 10 bivalentes por célula). La combinación de mayor cruzabilidad (19%) resultó ser la de dos tetraploides: *P. dilatatum* biotipo “Virasoro” × *P. urvillei*, especies estrechamente emparentadas que comparten la fórmula genómica IIJJ. Por su parte, la combinación *P. dilatatum* biotipo ‘Virasoro’ × *P. simplex*, especies tetraploides escasamente relacionadas genómicamente, tuvieron una cruzabilidad del 0,8%, exactamente la misma (0,8%) que la combinación entre *P. dilatatum* ssp. *flavescens* × *P. urvillei*, dos tetraploides que comparten la misma fórmula genómica IIJJ. Si tenemos en cuenta esta muestra de 31 combinaciones entre diferentes especies como indicativa para el género, podemos considerar que la cruzabilidad general entre especies del grupo *Plicatula* es casi 10 veces superior a la cruzabilidad general obtenida en el género cuando se cruzan especies del mismo nivel de ploidía. En efecto, si consideramos solamente los cruzamientos interespecíficos de los registrados en la Tabla 5, el total de espiguillas polinizadas fue de 7114 y los híbridos logrados fueron 205, lo que equivale a una cruzabilidad interespecífica general para estas especies del grupo *Plicatula* de 2,88%, ampliamente superior al 0,3% de las 31 combinaciones de cruzamientos tomados de la bibliografía como muestra representativa del género. La variación de la cruzabilidad interespecífica dentro del grupo *Plicatula*, según los cruzamientos realizados hasta ahora, va de 0% a 16%. De 18 combinaciones intentadas con *P. plicatulum* tetraploide sexual como madre, solo en cinco no se consiguieron híbridos. Eso sucedió cuando los dadores de polen fueron genotipos de *P. palustre*, *P. modestum*, *P. macedoi* y dos genotipos de *P. wrightii* (Q4158 y U89). En realidad, esto podría deberse a la escasa cantidad de espiguillas polinizadas en cada caso, con excepción de *P. plicatulum* 4PT × *P. modestum*, combinación en que se polinizaron 569 espiguillas. Estos resultados son alentadores porque contamos con una madre tetraploide, sexual y completamente autoestéril (*P. plicatulum* 4PT) que tiene buenos niveles de

cruzabilidad con muchas especies del grupo *Plicatula*. Estos niveles pueden permitir usar a este genotipo para pivotar cruzamientos interespecíficos dentro del grupo, e intentar de esa manera la transferencia génica como método de mejoramiento.

2. Origen híbrido de los descendientes logrados

Se muestrearon como representativas 12 de las 15 combinaciones de cruzamientos que dieron descendientes. A su vez, se tomaron en total 95 descendientes representativos de estas 12 familias, lo que representó el 40% del total de descendientes obtenidos (Tabla 6). Inicialmente se realizó un “screening” con los parentales con la finalidad de seleccionar los cebadores más adecuados para el análisis de cada progenie. Se utilizaron 40 cebadores, de los cuales fueron seleccionados entre 2 y 4 para cada familia. Estos cebadores se caracterizaron por presentar amplificaciones de bandas específicas para los progenitores masculinos, es decir, que estaban en el padre correspondiente pero ausentes en la madre (Tabla 6).

Tabla 6. Pruebas de progenie para determinar el origen híbrido de una muestra de individuos pertenecientes a 12 familias originadas por cruzamientos entre *P. plicatum* 4PT ó 7PT × 12 genotipos tetraploides apomícticos, incluyendo 2 pertenecientes a la misma especie (*P. plicatum*) y otros 10 correspondientes a 7 especies diferentes, también del grupo Plicatula.

Cruzamientos	Individuos F ₁ analizados (n°)	Primers seleccionados (n°)	Bandas amplificadas en los parentales (n°)	Marcadores específicos de los parentales masculinos (n°)
<i>P. plicatum</i> 4PT				
x <i>P. chaseanum</i> ST13894	24	3	18	7
x <i>P. compressifolium</i> AK40811	1	2	9	4
x <i>P. guenoarum</i> BO107	4	3	19	5
x <i>P. guenoarum</i> Q4108	1	2	19	3
x <i>P. lenticulare</i> BO190	4	2	15	4
x <i>P. nicorae</i> CPI27707	1	3	19	4
x <i>P. nicorae</i> PI508821	15	4	23	7
x <i>P. oteroi</i> A&V1332	12	4	24	10
x <i>P. plicatum</i> Hojs388	13	2	19	11
x <i>P. plicatum</i> ML5	7	2	12	3
x <i>P. rojasii</i> AK40732	12	3	15	6
<i>P. plicatum</i> 7PT				
x <i>P. lenticulare</i> V11893	1	2	8	3

La combinación de los cebadores en cada familia permitió confirmar el origen híbrido de los descendientes de cada progenie, debido a que todos los individuos presentaron bandas específicas de sus respectivos progenitores masculinos (Tabla 6). Por lo tanto, de aquí en adelante se consideran híbridos todos los descendientes de las distintas combinaciones de cruzamientos, sean estas intra o interespecíficas. En la Figura 4 se observan los productos de amplificación con el cebador BC756 de los descendientes del cruzamiento entre *P. plicatum* 4PT × *P. chaseanum*. De los 24 individuos analizados, 22 presentaron uno o los dos marcadores específicos del padre. Los dos individuos restantes fueron caracterizados como híbridos con otro cebador.

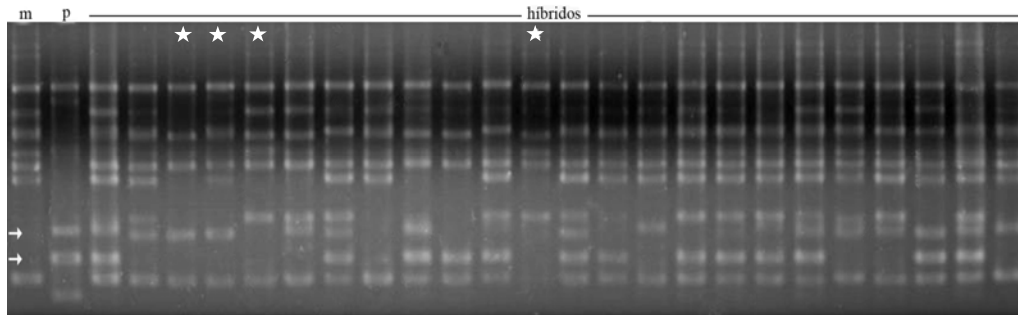


Figura 4. Productos de amplificación de los parentales *P. plicatulum* 4PT, *P. chaseanum* ST13894 y la progenie F₁ generados por el cebador BC756. Las flechas indican las bandas específicas del padre. m: madre ; p: padre. Las estrellas (☆) indican los híbridos no identificados con éste cebador.

3. Características fenotípicas de los híbridos

Las pruebas de progenie realizadas con marcadores moleculares RAPDs permitieron comprobar que la madre utilizada (*P. plicatulum* 4PT) es fértil y completamente autoestéril. El mismo resultado se obtuvo mediante la castración de la planta 7PT. El análisis de características fenotípicas de los híbridos, comparándolas con las de los progenitores (Tabla 7) permite disponer de datos concretos que describen rasgos morfológicos que ayudan a identificar características paternas de la F₁ por lo tanto acertar su origen híbrido. El análisis es demostrativo y solo involucra a algunos individuos de las progenies. Se tomaron seis características de tipo cuantitativo, 4 relacionadas con los órganos reproductivos y dos con características foliares. Por otra parte, en algunos casos de combinaciones puntuales se hicieron observaciones sobre presencia o ausencia de alguna característica cualitativa.

En general se observó una gran variación fenotípica entre los miembros de cada progenie, y de éstos con los padres. Se presupone que en todos los casos deberían existir diferencias significativas entre algunas características de los individuos de cada progenie respecto a esas mismas características en la madre 4PT. Visualmente, los híbridos difieren de la madre por características que a veces tienen valores intermedios entre ambos padres y otras veces se asemejan al progenitor masculino. La valoración de las seis características analizadas está reflejada en la Tabla 7. En general, la muestra de híbridos analizados en cada familia presenta al menos alguna característica que los diferencia significativamente de la madre 4PT. Se encontró una excepción en

los híbridos 4PT × *P. lenticulare* BO190, donde ninguno de los 4 híbridos considerados se diferencia significativamente de la madre por ninguna de las seis características analizadas. Sin embargo, los 4 híbridos presentan valores intermedios entre los padres respecto a características como longitud de la inflorescencia o longitud del racimo basal. Además, las plantas híbridas son fácilmente diferenciables visualmente de la madre por su aspecto morfológico general. Otra excepción la constituye el cruzamiento 4PT × *P. nicorae* donde 3 de los 4 híbridos considerados no tienen ninguna de las 6 características elegidas significativamente diferentes a la planta madre. Sin embargo, aquí también se observaron algunos valores intermedios entre los parentales y el aspecto morfológico general de los híbridos que era fácilmente diferenciable a simple vista no con los de la madre sino que en muchos casos también eran diferentes al padre.

En algunos casos puntuales, se observaron características cualitativas que rápidamente confirmaban que toda la progenie de un cruzamiento era efectivamente de origen híbrido. Por ejemplo, todos los descendientes de *P. plicatulum* 4PT × *P. chaseanum* heredaron del padre la pilosidad en las espiguillas (Figura 5) (Novo et al., 2013), además de otras características. En otros casos fue interesante observar que alguna característica particular, como por ejemplo la presencia de tallos multinodos, estoloníferos, y ramificados de *P. oteroi* fue heredada de manera no uniforme por los híbridos *P. plicatulum* 4PT × *P. oteroi*. Algunos híbridos eran decumbentes y estoloníferos semejantes a *P. oteroi*, otros, si bien eran decumbentes, los tallos eran más cortos, con menor número de nudos y menos ramificados que el padre, y otros que tenían el porte erecto de la madre pero con alguna otra característica que los diferenciaba de ella. En varios de estos híbridos se observó una herencia transgresiva respecto a la longitud de la inflorescencia, con valores superiores a ambos padres.

Es probable que las características elegidas desde el inicio para analizar y comparar la variación fenotípica de los híbridos respecto a sus parentales no hayan sido las adecuadas para todas las combinaciones. Como la madre siempre, o casi siempre, fue el mismo genotipo, tal vez hubiese sido mejor decidir en cada combinación cuáles características serían las más adecuadas para comparar adecuadamente el fenotipo general de los padres con los

híbridos. Sin embargo, tampoco ese proceder hubiese asegurado una diferenciación de los híbridos con los parentales, particularmente con la madre. Por ejemplo, el color verde-azulado del follaje de *P. chaseanum* fue observado, aunque con distinta intensidad, en todos sus híbridos; sin embargo, todos los híbridos del padre *P. guenoarum* “Azulao” (cuya identificación se refiere al color verde-azulado de su follaje), presentaron follaje verde sin la tonalidad azulada típica del padre.

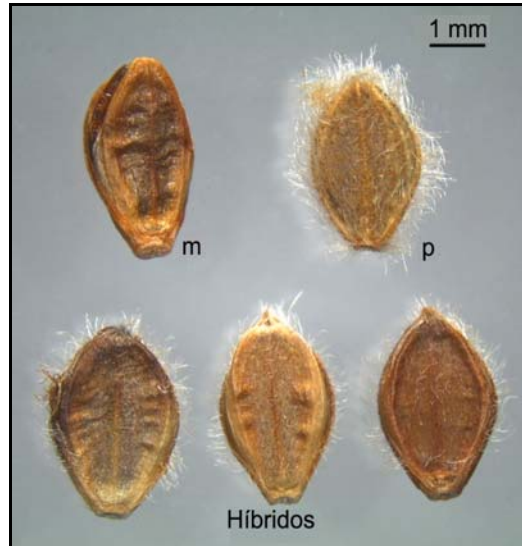


Figura 5. Espiguillas de los parentales *P. plicatulum* 4PT, *P. chaseanum* ST13894 y tres híbridos interespecíficos entre ambas especies. m: madre; p: padre. Las espiguillas de los híbridos muestran la pilosidad heredada del padre. La escala es válida para las cinco espiguillas.

En general, todas las F_1 presentan algunas características paternas que revelan su origen híbrido. Además de las características elegidas para comparar el fenotipo general de la madre con los híbridos, existen muchas otras que en una mera observación visual indican que hay influencia paterna. Una buena parte de las características fenotípicas de los descendientes de los 13 cruzamientos entre la planta madre tetraploide sexual de *P. plicatulum* 4PT y los parentales masculinos tetraploides apomícticos, denotan herencia biparental, sea porque tienen valores o formas intermedias o porque se asemejan más al parental masculino que a la madre.

Resultados y Discusión

Tabla 7. Características morfológicas de la madre autotetraploide sexual de *P. plicatum* 4PT, de 13 progenitores tetraploides apomícticos y de algunos de sus respectivos híbridos. Color fucsia indica presencia de diferencias significativas de los híbridos en comparación a la planta madre *P. plicatum* 4PT y el color azul indica ausencia de diferencias significativas de los híbridos en comparación a la planta madre *P. plicatum* 4PT. Los valores dentro de las columnas seguidos de letras indican el promedio de cada variable para cada individuo. DE: desvío estándar.

Especies o híbridos	Long. de la inflorescencia (cm)	DE	Nº de racimos	DE	Long del racimo basal (cm)	DE	Long. del racimo apical (cm)	DE	Ancho de la hoja (cm)	DE	Long. de la hoja (cm)	DE
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. chaseanum</i> ST13894	15,6b	1,6	10,7c	0,6	9,1a	1,6	6,1a	0,4	1,6b	0,1	29,3a	4,7
H6	21c	1,0	10,0c	1,0	17,5bc	2,2	6,1a	1,5	1,5b	0,2	37,1a	2,5
H13	15,0b	1,2	9,7c	2,1	16,2b	3,1	11,3a	2,8	1,4b	0,1	29,3a	6,9
H14	19,9c	0,6	6,3b	0,6	21,5c	1,3	11,3a	4,9	1,3b	0,1	38,0a	5,3
H25	19,1c	0,1	11,3b	0,6	16,9bc	0,4	7,5a	1,6	1,5b	0,1	41,0a	6,1
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. compressifolium</i> AK40811	10,2ab	1,7	4,3a	0,6	7,1a	0,8	2,2a	1,1	0,3a	0,1	14,3a	5,8
H1	12,9b	1,2	5,0a	1,7	11,7b	1,6	6,7b	0,1	0,8b	0,1	18,7ab	5,7
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. guenoarum</i> Azulao	18,4b	3,6	6,0b	1,0	10,8a	2,7	8,5a	0,7	0,9b	0,1	14,7a	3,0
H11	16,4b	1,3	4,3ab	0,6	16,6c	0,7	9,5a	2,0	0,7ab	0,2	15,8a	7,1
H24	14,9ab	3,0	4,3ab	0,6	15,2bc	1,3	11,0a	0,9	0,7ab	0,2	16,1a	5,7
H37	14,0ab	1,6	4,0a	0,0	12,3ab	0,4	9,7a	0,2	0,5ab	0,1	12,2a	4,6
H42	9,0a	3,6	3,0a	1,0	12,7ab	0,8	10,6a	1,9	0,5a	0,1	9,0a	4,5
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. guenoarum</i> Baio	20,5b	4,7	6,0a	3,0	17,2ab	2,6	11,5a	5,0	0,57a	0,1	14,0a	0,7
H35	15,6ab	3,4	4,0a	1,0	17,1ab	4,5	12,7a	4,0	0,57a	0,1	18,3ab	2,9
H42	20,2b	0,8	5,0a	0,0	18,5b	2,5	10,1a	2,0	0,60a	0,2	10,5a	6,6
H53	20,1b	2,8	6,0a	1,0	19,8b	2,0	10,6a	1,4	0,57a	0,2	15,5ab	10,8
H56	17,3b	3,7	5,7a	1,5	16,8ab	1,8	8,9a	1,1	0,28a	0,1	5,1a	3,8
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. guenoarum</i> BO107	17,1b	0,1	5,3a	0,6	15,1ab	0,9	8,5a	2,8	0,9a	0,1	23,8a	5,4
H1	15,0b	4,7	4,3a	1,5	19,3b	4,1	12,2a	3,7	0,8a	0,1	26,2a	6,2

Resultados y Discusión

H2	13,8a	0,1	4,0a	1,0	15,6ab	4,6	11,9a	4,2	0,8a	0,1	28,3a	0,6
H3	17,3b	1,8	5,7a	0,6	20,7b	0,4	10,1a	1,7	0,9a	0,1	32,5a	11,5
H4	16,0b	3,1	4,7a	0,6	16,0ab	3,1	11,3a	2,9	1,0a	0,2	39,6a	13,9
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. guenoarum</i> 4108	21,7c	2,5	6,7b	1,1	14,0b	1,8	11,1a	3,8	0,8ab	0,1	20,3a	2,8
H1	17,7b	0,5	5,3ab	0,6	12,7ab	0,2	9,9a	0,1	1,0b	0,1	39,0b	0,2
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. lenticulare</i> BO190	17,6a	0,8	4,7a	0,6	18,2b	2,1	9,1a	4,6	0,6a	0,1	20,4a	2,8
H1	16,7a	3,2	4,7a	0,6	16,3ab	1,1	9,8a	2,1	0,7a	0,2	18,6a	9,0
H2	11,6a	3,2	5,0a	1,7	13,4ab	0,9	7,3a	1,6	0,7a	0,1	19,7a	2,4
H3	12,1a	1,8	3,3a	0,6	16,6ab	3,4	11,7a	3,2	0,7a	0,1	24,1a	4,2
H4	13,7a	7,3	5,3a	3,2	15,9ab	3,6	9,9a	3,8	0,8a	0,1	23,7a	8,6
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. nicorae</i> CPI27707	5,6a	2,9	2,7a	0,7	5,8a	0,7	3,7a	1,0	0,3a	0,1	20,3a	3,7
H1	21,7b	2,5	6,7b	1,2	14,0b	1,8	11,1b	3,8	0,8b	0,2	39,3b	2,8
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. nicorae</i> PI508821	7,9a	1,3	3,7a	0,6	6,5a	0,1	4,5a	0,9	0,4a	0,1	29,1a	10,6
H4	11,1a	1,0	4,0a	0,0	10,4bc	0,2	8,0ab	1,7	0,5a	0,1	23,4a	10,6
H8	11,8a	1,3	7,0b	1,7	7,8ab	0,6	3,4a	0,3	0,7a	0,2	22,7a	10,7
H10	11,3a	2,8	4,7a	0,6	12,6c	2,1	7,6ab	3,1	0,6a	0,1	22,1a	4,6
H18	9,0a	0,9	3,0a	0,0	10,0bc	1,2	6,9ab	0,6	0,5a	0,1	22,5a	6,1
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. oteroi</i> A&V1332	6,1a	1,5	5,7b	1,7	4,4a	0,5	4,3a	1,2	0,8b	0,1	10,5a	1,2
H5	10,8bc	0,4	4,0ab	0,0	9,8b	0,8	6,4ab	0,1	0,5a	0,1	23,0abc	5,3
H8	12,7c	0,6	4,7ab	0,6	13,2b	1,0	9,2ab	3,6	1,0b	0,2	25,3bc	5,0
H13	12,2c	1,0	5,0ab	0,0	11,5b	1,1	8,9ab	1,9	0,9b	0,1	24,9bc	2,9
H15	10,8bc	1,0	3,7ab	0,6	10,7b	2,6	11,3b	1,7	0,9b	0,1	18,9ab	3,7
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. plicatulum</i> Hojs388	14,5b	2,6	10,3c	1,5	9,3a	0,8	2,8a	1,7	0,8abc	0,1	36,0a	8,3
H1	17,4b	0,5	6,7b	1,1	9,4a	0,5	6,6abc	2,3	0,8abc	0,1	36,1a	1,2
H4	13,8ab	3,2	5,0ab	0,0	12,4a	0,9	7,0abc	0,9	0,9c	0,1	33,6a	2,3
H6	17,3b	2,1	10,7c	0,6	11,0a	1,4	5,3ab	2,0	0,9bc	0,1	37,9a	10,3
H16	15,8b	3,4	6,0b	0,0	11,8a	2,1	5,3bc	0,5	0,6a	0,1	30,0a	4,0

Resultados y Discusión

4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. plicatum</i> ML5	7,7a	1,3	3,7a	0,6	7,6a	1,3	3,1a	0,1	0,5a	0,1	31,1a	2,2
H2	10,9b	0,2	4,3a	0,6	7,5a	1,1	4,3ab	0,6	0,6a	0,1	27,6a	2,1
H3	11,4b	0,3	4,3a	0,6	9,3ab	0,7	7,3bc	1,2	0,6a	0,0	26,0a	0,9
H4	11,3b	0,5	4,3a	0,6	10,9a	0,4	6,3b	1,1	0,5a	0,1	26,6a	1,2
H5	12,9b	1,7	4,0a	0,0	10,6b	0,6	5,2ab	0,2	0,6a	0,1	26,9a	0,8
4PT*	7,9a	1,0	3,3a	0,6	10,6a	1,3	10,4a	2,3	0,7a	0,1	32,7a	8,0
<i>P. rojasii</i> AK40732	5,6a	3,9	2,3b	0,6	11,7ab	1,8	10,6a	3,0	0,9ab	0,1	27,6ab	7,7
H1	13,7c	0,9	6,3b	2,1	18,0c	2,9	13,1a	0,6	1,3c	0,1	34,3b	4,4
H2	8,7abc	1,4	4,3ab	1,5	17,0c	2,4	12,2a	0,9	1,2bc	0,1	30,5ab	3,4
H3	12,0bc	1,8	6,3b	1,1	15,8bc	0,7	12,7a	1,1	0,9ab	0,1	26,4ab	4,3
H9	8,8abc	1,6	3,7ab	0,6	13,8abc	1,5	11,9a	0,9	0,8a	0,1	18,1a	4,1

*Aguilera et al., 2011

4. Modo reproductivo de los híbridos F_1

La determinación del modo reproductivo de los híbridos de 14 poblaciones F_1 se realizó utilizando la técnica de citometría de flujo. En muchos casos el número de híbridos analizados fue inferior al número de híbridos logrados para una determinada combinación. Eso se debió a diferentes causas como ser: la muerte de algunos híbridos antes de lograr juntar semillas; la esterilidad de algunos híbridos, la escasa producción de semillas de otros o por pérdidas por desgrane natural de las panojas. En promedio se utilizaron para el análisis entre 3 y 62 cariopses de cada individuo. Del total de 14 familias analizadas, en 11 se pudo determinar que hubo segregación para el modo reproductivo, observándose en la descendencia individuos de reproducción sexual y de reproducción apomíctica, ya sean apomícticos obligados o apomícticos facultativos. Los individuos sexuales mostraron una relación embrión/endospermo de contenido relativo de ADN de 2C:3C; indicando que el embrión $2n$ se originó a partir de una ovocélula reducida (n) que fue fecundada por un núcleo espermático reducido (n), y el endospermo $3n$ se originó en un segundo evento de fecundación que involucró a los dos núcleos polares reducidos ($n + n$) y el otro núcleo espermático (n) del tubo polínico (Tabla 8, Figura 6 A). Sin embargo los individuos apomícticos obligados originados a partir de sacos apospóricos, mostraron histogramas con una relación de contenido de ADN embrión/endospermo de 2C:5C, donde el embrión se origina por partenogénesis de una ovocélula no reducida de un saco embrionario apospórico ($2n + 0$) y el endospermo por pseudogamia, es decir, la fecundación de los dos núcleos polares no reducidos del mismo saco apospórico ($2n + 2n$) por un gameto masculino reducido (n) (Tabla 8, Figura 6 B). Los individuos fueron clasificados como apomícticos facultativos cuando presentaron histogramas con una relación embrión/endospermo de 2/3 para algunas semillas y de 2/5 para otras.

En dos de los tres casos restantes no se pudo determinar si existía segregación para el modo reproductivo puesto que solo se analizó un híbrido en cada una de estas combinaciones de cruzamientos: *P. plicatum* 4PT × *P. compressifolium* con un híbrido sexual y *P. plicatum* 4PT × *P. nicorae* CPI27707 con uno apomíctico. Finalmente, en *P. plicatum* 4PT × *P.*

plicatulum ML5 se analizaron 6 híbridos y todos se reproducen por apomixis, ya sea facultativa u obligada (Tabla 8). No obstante, debido al escaso número de individuos analizados no se puede afirmar que en esta combinación no pueda existir recombinación.

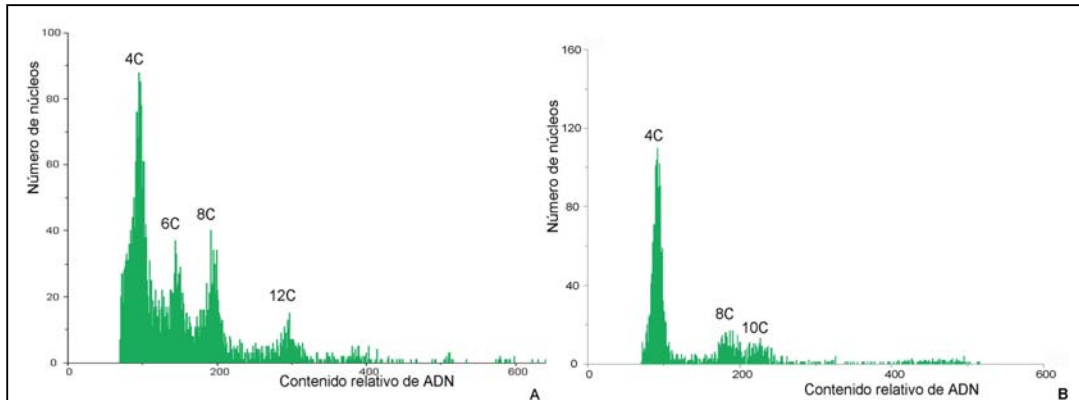


Figura 6. Histogramas de citometría de flujo generados a partir de semillas de híbridos intra e interespecíficos. A) Híbrido sexual mostrando un pico 4C más alto para el embrión y un pico 6C más pequeño para el endospermo. B) Híbrido apomíctico con una proporción de contenido relativo de ADN embrión:endospermo de 2C:5C. Ambos histogramas mostraron picos adicionales (8C, 12C y 10C) producidos por núcleos del embrión y del endospermo en estadio G_2 del ciclo celular.

Estudios previos indican que dentro del género *Paspalum*, cuando se cruza un individuo sexual con uno apomíctico, se produce segregación para el modo reproductivo entre los híbridos F_1 (Burton & Forbes, 1960; Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Aguilera et al., 2011; 2015). En todos esos casos los progenitores femeninos eran plantas sexuales, autopoliploides inducidos experimentalmente a partir de diploides, y los progenitores masculinos eran plantas silvestres, apomícticas, a las cuales se consideró autotetraploides teniendo en cuenta datos de apareamiento cromosómico en meiosis. Estas mismas condiciones serían las de los materiales que usamos en esta tesis: las madres sexuales 4PT y 7PT de *P. plicatulum* se originaron experimentalmente por autopoliploidía (Sartor et al., 2009) y los genotipos paternos que usamos son silvestres, apomícticos y muy posiblemente de origen autotetraploide (o aloploiploides segmentarios), de acuerdo a las configuraciones cromosómicas observadas en esos materiales y en los híbridos generados por ellos al usarlos como dadores de polen (ver sección V.2.).

Tabla 8. Determinación del modo reproductivo de híbridos logrados en 14 combinaciones de cruzamientos de *P. plicatum* tetraploide sexual (genotipos 4PT y 7PT) × genotipos silvestres, tetraploides y apomícticos que involucran 8 especies diferentes del Grupo Plicatula. Sex: sexuales; Ao: apomícticos obligados; Af: apomícticos facultativos.

Cruzamientos	Híbridos F ₁ analizados (n°.)	Número de híbridos con reproducción:		
		Sex	Ao	Af
<i>P. plicatum</i> 4PT				
x <i>P. chaseanum</i> ST13894	19	13	0	6
x <i>P. compressifolium</i> 40811	1	1	0	0
x <i>P. guenoarum</i> Azulao	45	22	9	14
x <i>P. guenoarum</i> Baio	56	27	9	20
x <i>P. guenoarum</i> BO107	4	1	3	0
x <i>P. guenoarum</i> Q4108	2	1	0	1
x <i>P. lenticulare</i> BO190	4	2	1	1
x <i>P. nicorae</i> CPI27707	1	0	0	1
x <i>P. nicorae</i> PI508821	15	4	0	11
x <i>P. oteroi</i> A&V1332	11	9	1	1
x <i>P. plicatum</i> Hojs388	18	7	3	8
x <i>P. plicatum</i> ML5	6	0	1	5
x <i>P. rojasii</i> AK40732	7	5	1	1
<i>P. plicatum</i> 7PT				
x <i>P. lenticulare</i> V11893	4	1	0	3

En los trabajos más recientes con especies de *Paspalum* (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Aguilera et al., 2015) se propuso un modelo genético donde la aposporia estaría controlada por un gen dominante en un marco de herencia tetrasómica. Este modelo es muy semejante al que había sido propuesto por Savidan (1975) en trabajos experimentales con *Megathyrsus maximus* (Jacq.) BK Simon & SWL Jacobs y por Valle & Glenke (1993) en *Brachiaria* sp., donde los resultados coincidían con la proporción 1 híbrido sexual/1 híbrido apomíctico en la F₁ esperada en el modelo propuesto. Sin embargo, en *Paspalum notatum* (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004) y *P. plicatum* × *P. guenoarum* (Aguilera et al., 2015), se observó una mayor proporción de híbridos sexuales de lo que el modelo permite esperar en F₁. Esta menor proporción de híbridos apospóricos en la F₁ se atribuyó a la distorsión en la segregación debida al efecto pleiotrópico letal del gen

dominante, cuya penetrancia sería incompleta. Los resultados obtenidos en esta tesis avalarían un modelo monogénico con dominancia de la apomixis sobre la sexualidad, pero de ninguna manera son conclusivos, puesto que para eso se debería haber analizado un número mucho mayor de individuos en cada familia híbrida. Hay que considerar que la segregación de un genotipo heterocigoto en herencia disómica es 3:1 pero en herencia tetrasómica es de 35:1 lo que indica que cualquier estudio en autotetraploides requiere un número mucho mayor de individuos analizados. Las dos combinaciones donde se analizó un mayor número de híbridos fueron *P. plicatulum* × *P. guenoarum* “Azulao” y *P. plicatulum* × *P. guenoarum* “Baio” con un total de 45 y 56 híbridos, respectivamente. En ambos casos la segregación fue de aproximadamente un híbrido sexual por cada híbrido apomítico, y esto apoyaría el modelo de un gen dominante para la apomixis en herencia tetrasómica, propuesto originalmente por Savidan (1975) para la gramínea Panicoidea *Megathyrsus maximus*, donde el genotipo materno (sexual) sería aaaa y el paterno (apomítico) sería Aaaa. Esto debería ser refrendado por un análisis que involucre, para cada uno de los cruzamientos que se realizó, un número mucho mayor de híbridos F₁, de híbridos F₂ y de retrocruzas. De estos resultados surge esta hipótesis muy interesante que deberá ser puesta a prueba mediante la obtención de híbridos F₂ y de retrocruzas. Por lo tanto, los resultados obtenidos apoyan esta hipótesis muy interesante que, de todas maneras, deberá ser puesta a prueba mediante la obtención de híbridos F₂ y de retrocruzas.

V.2. Relaciones citogenéticas entre las especies del Grupo Plicatula

1. Análisis de la meiosis

Se hizo el estudio de la meiosis de los híbridos interespecíficos de *P. plicatulum* 4PT × *P. chaseanum*, *P. nicorae* y *P. oteroi*, y de híbridos intraespecífico de esa misma madre con el biotipo apomítico *P. plicatulum* Hojs388. Los demás híbridos interespecíficos no se analizaron ya sea porque son de logros más recientes, porque murieron antes de florecer, como el caso del único híbrido *P. plicatulum* 4PT × *P. wrightii*, o porque fueron analizados

anteriormente (Aguilera et al., 2011). Por lo tanto, el análisis de las asociaciones cromosómicas en diacinesis y metafase I de la meiosis se realizó solo en una muestra de las familias híbridas obtenidas. A su vez, se tomó una muestra de cada familia, consistente entre 2 y 5 individuos y sus respectivos parentales masculinos. El análisis de las asociaciones cromosómicas de la planta madre 4PT de *P. plicatulum* fue tomado de Sartor et al. (2009). A continuación se describen las familias analizadas.

P. plicatulum 4PT × *P. chaseanum* ST13894

En *P. chaseanum* se analizaron 23 CMP, en las cuales se observó un rango de 0-7 univalentes (I), 9-18 bivalentes (II), 0-3 trivalentes (III) y 0-5 cuadrivalentes (IV). Sin embargo la mayoría de los cromosomas se asociaron principalmente como bivalentes y cuadrivalentes (Tabla 9, Figura 7 A).

El comportamiento cromosómico de los tres híbridos *P. plicatulum* 4PT × *P. chaseanum*, analizado en 60 CMP (Tabla 9), mostró que la mayoría de los cromosomas se asociaron principalmente como bivalentes y cuadrivalentes; sin embargo, se observaron algunos univalentes o rara vez trivalentes. El promedio de las asociaciones cromosómicas observadas en los tres híbridos fue de 1,9 univalentes, 13,6 bivalentes, 0,3 trivalentes y 2,5 cuadrivalentes por CMP (Tabla 9, Figura. 7 B). En algunas CMP se observó hasta un máximo de seis cuadrivalentes.

Tabla 9. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de *P. plicatulum* (4PT), *P. chaseanum* (ST13894) y en tres híbridos interespecíficos entre ambas especies.

Progenitores-Híbridos	Nº de plantas	Nº de células	Promedio y rango por célula			
			I	II	III	IV
<i>P. plicatulum</i> (4PT)*	1	53	0,1 (0-1)	14,2 (8-18)	0,1 (0-1)	2,8 (1-7)
<i>P. chaseanum</i> (ST13894)	1	23	2,4 (0-7)	14,0 (9-18)	0,5 (0-3)	2,0 (0-5)
Híbridos	3	60	1,9 (0-6)	13,6 (7-20)	0,3 (0-2)	2,5 (0-6)

*Sartor et al., 2009

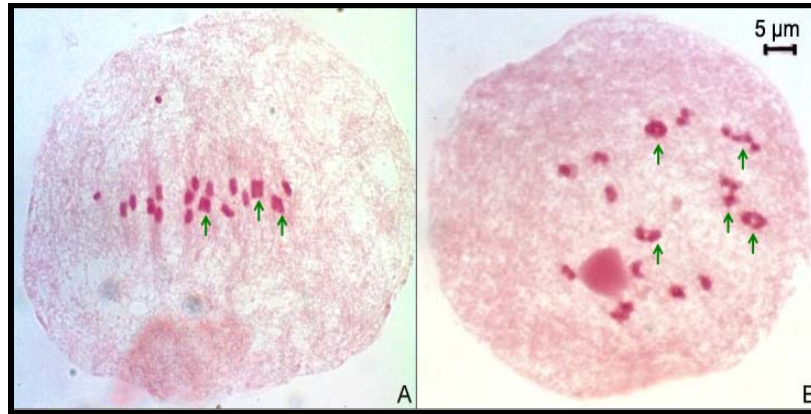


Figura 7. Asociaciones de cromosomas meióticos en Metafase I (A) del genotipo ST13894 de *P. chaseanum* y en Diacinesis (B) en un híbrido interespecífico de *P. plicatum* 4PT × *P. chaseanum* ST13894). Las flechas señalan los cuadrivalentes. La escala es válida para las dos figuras.

P. plicatum 4PT × *P. nicorae* PI508821:

Los cromosomas de *P. nicorae* PI508821 se asociaron principalmente como bivalentes y cuadrivalentes, con un promedio por célula de 15,5 bivalentes y 1,8 cuadrivalentes, y un rango de 7-20 y 0-5, respectivamente, pero también se observaron univalentes en un promedio de 1,5 y rango de 0 a 6 por célula, y no se registraron trivalentes (Tabla 10). En los cinco híbridos F_1 estudiados, las configuraciones cromosómicas mostraron univalentes, bivalentes, cuadrivalentes, y ocasionales trivalentes, y un mayor número de bivalentes y muy pocos cuadrivalentes en relación a ambos padres (Tabla 10, Figura 8 A, B). La anafase fue mayormente regular, con 20 cromosomas hacia cada polo y raramente con algún rezagado (Figura 8 C).

Tabla 10. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de *P. plicatum*, *P. nicorae* PI508821 y en híbridos interespecíficos entre ambas especies.

Progenitores-Híbridos	Nº de plantas	Nº de células	Promedio y rango por célula			
			I	II	III	IV
<i>P. plicatum</i> (4PT)*	1	53	0,1 (0-1)	14,2 (8-18)	0,1 (0-1)	2,8 (1-7)
<i>P. nicorae</i> (PI508821)	1	31	1,5 (0-6)	15,5 (7-20)	0,0 (0-0)	1,8 (0-5)
Híbridos	5	70	1,6 (0-6)	18,0 (13-20)	0,2 (0-3)	0,5 (0-3)

*Sartor et al., 2009

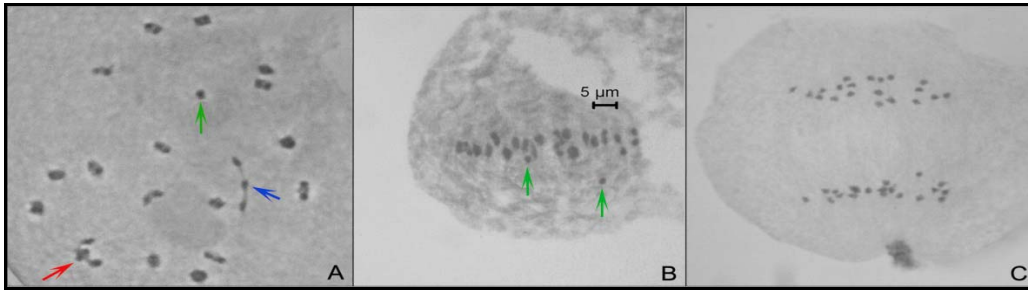


Figura 8. Asociaciones de cromosomas meióticos en Diacinesis (A), Metafase I (B), Anafase (C), en híbridos interespecíficos de *P. plicatulum* 4PT × *P. nicorae* PI508821. Las flechas verdes señalan los univalentes, las azules los trivalentes y la roja los cuadrivalentes. La escala es válida para las tres figuras.

P. plicatulum 4PT × *P. oteroi* A&V1332:

En *P. oteroi* se analizaron 54 CMP, en las que se observaron configuraciones cromosómicas de univalentes a cuadrivalentes, con una media de 1,3 univalentes; 12,9 bivalentes; 0,5 trivalentes; y 2,8 cuadrivalentes (Tabla 11, Figura 9 A). En los híbridos se analizaron 101 CMP, las cuales mostraron una media de 7 univalentes + 16,1 bivalentes + 0,4 trivalentes + 1,0 cuadrivalentes por célula (Tabla 11, Figura 9 B). Los cinco híbridos interespecíficos mostraron un promedio de asociaciones bivalentes superior a cualquiera de los padres. Aunque el número de bivalentes por CMP varió de 10 a 20, aproximadamente una célula de cada 10 tenía 20 bivalentes, mientras que en ninguno de los parentales se observaron CMP con 20 bivalentes. Además, el número relativamente alto de univalentes podría ser una consecuencia de la separación precoz de los bivalentes durante la metafase y no la falta de apareamiento cromosómico. En efecto, de acuerdo a lo observado, la mayoría de los cromosomas que no se aparearon formaron pares de univalentes, durante la primera metafase meiótica, uno en frente del otro en ambos lados de la placa ecuatorial de la CMP (Figura 9 B).

Tabla 11. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de *P. plicatum*, *P. oteroi* (A&V1332) y en híbridos interespecíficos entre ambas especies.

Progenitores-Híbridos	Nº de plantas	Nº de células	Promedio y rango por célula			
			I	II	III	IV
<i>P. plicatum</i> (4PT)*	1	53	0,1 (0-1)	14,2 (8-18)	0,1 (0-1)	2,8 (1-7)
<i>P. oteroi</i> (A&V1332)	1	54	1,3 (0-5)	12,9 (4-18)	0,5 (0-2)	2,8 (0-8)
Híbridos	5	101	2,7 (0-10)	16,1 (10-20)	0,4 (0-3)	1,0 (0-5)

*Sartor et al., 2009

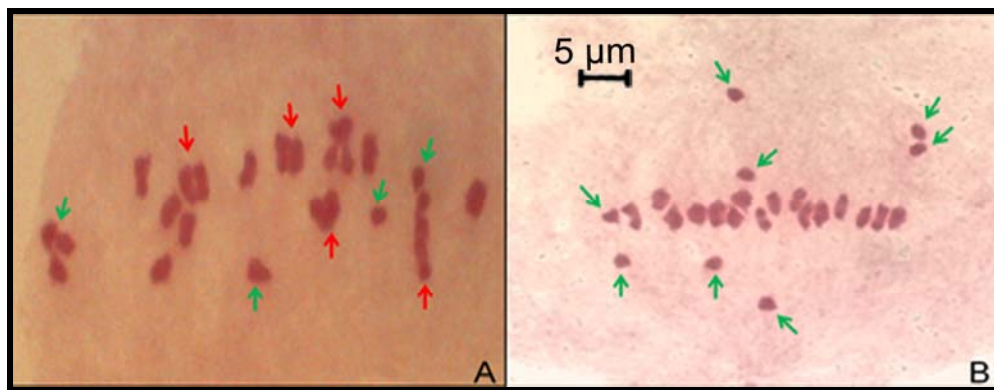


Figura 9. Asociaciones de cromosomas meióticos en Metafase I: (A) genotipo A&V1332 de *P. oteroi* con 4 I + 8 II + 5 IV, (B) híbrido interespecífico de *P. plicatum* 4PT × *P. oteroi* A&V1332 con 8 I + 16 II; excepto los dos univalentes en el extremo derecho de la fotografía, los otros 6 forman tres pares de univalentes enfrentados que podrían interpretarse como separación precoz de 3 bivalentes. Las flechas verdes señalan los univalentes y las rojas los cuadrivalentes. La escala es válida para las dos figuras

P. plicatulum 4PT × *P. plicatulum* Hojs388:

En *P. plicatulum* Hojs388 se analizaron 26 CMP, en la mayoría de las cuales los cromosomas se asociaron formando principalmente bivalentes, con una media de 19,5 y un rango de 17 a 20 por CMP; con algunos univalentes (promedio 0,7 y rango 0-6 por CMP) y ocasionalmente un cuadrivalente (media=0,1y rango 0-1 por CMP) (Tabla 12). En los híbridos, casi el 70% de los cromosomas se asociaron como bivalentes (promedio 13,6 por CMP) aunque en ninguna célula se observaron el máximo posible de 20 bivalentes ya que el rango observado fue de 9 a 18 por célula. Además, se observaron 5,0 univalentes de promedio con rango de 0 a 11, 0,8 trivalentes (rango entre 0 a 3, y una media de 1,4 y variación de 0 a 4 cuadrivalentes por célula (Tabla 12).

Tabla 12. Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de *P. plicatulum*, *P. plicatulum* Hojs388 y en híbridos interespecíficos entre ambas especies.

Progenitores-Híbridos	Nº de plantas	Nº de células	Promedio y rango por célula			
			I	II	III	IV
<i>P. plicatulum</i> (4PT)*	1	53	0,1 (0-1)	14,2 (8-18)	0,1 (0-1)	2,8 (1-7)
<i>P. plicatulum</i> (Hojs388)	1	26	0,7 (0-6)	19,5 (17-20)	0,0 (0-0)	0,1 (0-1)
Híbridos	5	35	5,0 (0-11)	13,6 (9-18)	0,8 (0-3)	1,4 (0-4)

*Sartor et al., 2009

Todos los híbridos aquí analizados, los tres interespecíficos *P. plicatulum* × *P. chaseanum*, *P. plicatulum* × *P. nicorae* y *P. plicatulum* × *P. oteroi*, más el intraespecífico *P. plicatulum* × *P. plicatulum*, tuvieron como madre común al genotipo 4PT de *P. plicatulum*, una planta tetraploide (2n=40) de reproducción sexual inducida al tratar con colchicina una semilla de una planta diploide sexual de esa especie (Sartor et al., 2009). Se trata por lo tanto de un genotipo autotetraploide. En general, los poliploides se pueden clasificar como autopoliploides, aloploiploides o aloploiploides segmentarios (Stebbins, 1947, 1950, 1970). Son autopoliploides cuando el complemento cromosómico consiste de más de dos copias completas del genoma de una sola especie, es decir, cuando contienen más de dos juegos haploides de cromosomas y todos

los juegos son homólogos entre sí (proviene de la misma especie ancestral). Son alopoliploides cuando tienen más de dos juegos haploides de cromosomas heredados de especies diferentes. Estas categorías son difícilmente absolutas debido a distintos eventos que pueden ocurrir durante el origen y la evolución de un poliploide. Por ejemplo, se dice que un alopoliploide es segmentario cuando hay homología parcial entre los juegos de cromosomas que se combinan en ese alopoliploide. También podemos hablar, y hay abundante bibliografía, sobre los procesos de diploidización que pueden llevar a que, en un poliploide que es autoploide por origen, los cromosomas se asocien en meiosis formando bivalentes en lugar de multivalentes. Sin embargo, las plantas 4PT y 7PT de *P. plicatulum* son sin dudas autotetraploides debido a sus orígenes. Generalmente para determinar si el origen de las diferentes especies poliploides es autopoliploide o alopoliploide se tiene en cuenta el número medio y el rango de asociaciones cromosómicas en la meiosis, especialmente de las asociaciones de multivalentes.

Las asociaciones cromosómicas de la planta 4PT autotetraploide fueron estudiadas por Sartor et al. (2009). Se observó un promedio de 0,1 univalentes, 14,2 bivalentes; 0,1 trivalentes y 2,8 cuadrivalentes por CMP, con un máximo de siete cuadrivalentes por célula. Es decir, en la meiosis de este auténtico autotetraploide la mayor parte de los cromosomas se asocian formando bivalentes (71% de los 40 cromosomas) y cuadrivalentes (28%), además de unos pocos trivalentes y univalentes. Si comparamos esto con los genotipos tetraploides apomícticos de *P. chaseanum*, *P. nicorae* y *P. oteroi* los valores son semejantes.

En *P. chaseanum* el 70% forma bivalentes y el 28% forma cuadrivalentes, prácticamente igual que en el autotetraploide 4PT y por lo tanto podríamos considerar al material ST13894 como perteneciente a un citotipo autopoliploide de *P. chaseanum* ya que existe también un citotipo diploide para la misma especie (Espinoza & Quarín, 1997).

En *P. nicorae* 77,5% son bivalentes y 19% cuadrivalentes, es decir, con menor proporción formando cuadrivalentes que en el autotetraploide 4PT, pero también puede ser considerada una especie autotetraploide, aunque tal vez con cierto grado de diploidización, o eventualmente como alotetraploide

segmentario originado por hibridación entre dos especies cuyos genomas eran parcialmente homólogos. Esta última hipótesis sería la más aceptable. En efecto, a pesar de ser una de las especies del género para la cual se han analizado citogenéticamente mayor cantidad de colecciones representativas de toda su distribución geográfica, en todos los casos resultó ser tetraploide ($2n=40$) y nunca se comunicó la existencia de plantas diploides. El primer reporte fue hecho por Saura (1948); también estudiaron esta especie Bashaw et al. (1970), Pagliarini et al. (2001); Sartor et al. (2011) y son especialmente destacables los estudios citológicos de Burson & Bennett (1970) y Reis et al. (2008) por la cantidad de colecciones diferentes en las que analizaron el apareamiento cromosómico en meiosis: 10 en el primer caso y 53 en el segundo. En estos dos estudios se menciona la existencia ocasional de 6 ó 7 cuadrivalentes pero en todos los casos el promedio está en torno a 2 cuadrivalentes por célula o algo inferior a 2. Por lo tanto, la información existente indica que hay una tendencia de los cromosomas a aparearse como bivalentes, ya sea porque es un autoploide en el que ha existido un proceso de diploidización, o más probablemente por tratarse de un aloploide segmentario surgido, no por autoploidía, sino por hibridación de especies que aportaron genomas parcialmente homólogos. Esto se fundamentaría en la inexistencia de un citotipo diploide en la especie, ya que en *Paspalum* las especies autotetraploides tienen un citotipo diploide co-específico (Ortiz et al., 2013).

En *P. oteroi* el 64,5% de los cromosomas se asocian en meiosis formando bivalentes, mientras que el 28% forma cuadrivalentes, es decir, hay el mismo porcentaje de cromosomas formando cuadrivalentes que en el autotetraploide 4PT de *P. plicatulum*, por lo que se puede considerar que *P. oteroi* es también una especie de origen autotetraploide. El porcentaje de univalentes observado es mayor que en 4PT y que las otras especies aquí consideradas, pero eso parece deberse a una separación precoz de los cromosomas que integran algunos bivalentes que a la falta de apareamiento durante la profase meiótica, ya que durante la anafase de la primera división meiótica normalmente segregan 20 cromosomas hacia cada polo. Los resultados del análisis de la meiosis de *P. oteroi* son muy semejantes a los observados por Pagliarini et al.

(2001) para esta especie. En *P. oteroi* se han analizado muy pocas colecciones a nivel citológico por lo que se desconoce si existe solo un nivel de ploidía (tetraploidía) para esta especie.

Estas afirmaciones son sustentadas por el apareamiento de los cromosomas en sus respectivos híbridos interespecíficos con la planta 4PT y confirmarían las hipótesis: 1) La mayoría de las especies apomícticas del grupo *Plicatula* estudiadas son de origen autotetraploide. 2) Comparten el mismo juego o set básico de cromosomas. 3) Dada la gran similitud cromosómica entre estas especies del grupo *Plicatula*, el apareamiento cromosómico en la meiosis de los híbridos es posible.

En líneas generales podemos afirmar que *P. oteroi* y el citotipo tetraploide de *P. chaseanum*, son de origen autotetraploide mientras que *P. nicorae* sería probablemente una especie alotetraploide segmentaria con dos genomas parcialmente homólogos, pero con un nivel de homología bastante importante porque en algunas colecciones se han observado, aunque ocasionalmente, hasta 6 y 7 cuadrivalentes por célula. Estas afirmaciones son sustentadas por el apareamiento de los cromosomas en sus respectivos híbridos interespecíficos con la planta 4PT.

Las asociaciones cromosómicas de los híbridos entre, *P. plicatulum* × *P. nicorae* y *P. plicatulum* × *P. oteroi*, nos permiten sugerir que estas especies comparten en gran medida el mismo genoma básico. Las asociaciones cromosómicas nos permiten sugerir que *P. plicatulum* y *P. chaseanum* comparten el mismo genoma básico. Las dos especies tienen básicamente el mismo genoma porque el promedio de las asociaciones cromosómicas, principalmente la formación de cuadrivalentes en los híbridos es muy semejante a la de ambas especies.

Sin embargo, la mayor proporción de univalentes observados en *P. chaseanum* y en sus híbridos interespecíficos en relación al autotetraploide 4PT de *P. plicatulum*, sugiere que se pudieron haber producido algunas modificaciones leves en algunos cromosomas después de la autoploidización. Esto podría hacer que ciertos cromosomas tengan mayores dificultades en el proceso de apareamiento para formar cuadrivalentes. De hecho se observó un mayor nivel de trivalentes (en

detrimento de cuadrivalentes) en *P. chaseanum* y en los híbridos respecto a la madre 4PT. Los cambios también podrían explicar la mayor proporción de univalentes (en detrimento de bivalentes y cuadrivalentes) tanto en *P. chaseanum* como en los híbridos respecto a 4PT. Asociaciones cromosómicas similares a lo observado en estos híbridos (*P. plicatum* × *P. chaseanum*) fueron reportadas por Aguilera et al (2011) para híbridos interespecíficos entre *P. plicatum* × *P. guenaorum*, indicando un origen autotetraploide para *P. guenaorum*. Esto sugiere en primer lugar que las dos especies: *P. guenaorum* y *P. chaseanum* son de origen autotetraploide y, en segundo lugar, que ambas comparten genomas homólogos, y que ese genoma a su vez es homólogo con el genoma del citotipo tetraploide inducido de *P. plicatum*.

Cuando analizamos las asociaciones cromosómicas de los híbridos de *P. plicatum* × *P. oteroi* y *P. plicatum* × *P. nicorae* observamos un mayor promedio de bivalentes que en sus respectivos parentales. El alto porcentaje de bivalentes de estos híbridos, sería debido a un alto grado de autosíndesis. Es decir, los cromosomas de los dos genomas aportados por la madre autotetraploide se aparean primariamente entre sí porque son homólogos, y los dos aportados por el padre también se aparean entre sí, por lo menos en el caso de *P. oteroi*, ya que se comporta como autotetraploide. Sin embargo, en los híbridos 4PT × *P. oteroi* solo el 10% de los cromosomas, en promedio, forma cuadrivalentes mientras que el 80% forma bivalentes. Esto indica que los cromosomas de los genomas aportados por 4PT son solo parcialmente homólogos con los de *P. oteroi*. El caso de 4PT × *P. nicorae* es similar, pero en ese caso, al ser *P. nicorae* una especie probablemente alotetraploide segmentaria, se espera un porcentaje aún mayor de cromosomas formando bivalentes, cosa que de hecho ocurre porque, en promedio, el 90% de los cromosomas forman bivalentes en los híbridos *P. plicatum* 4PT × *P. nicorae* y solo el 5% forma cuadrivalentes. De todas maneras, los resultados sugieren que existe algún grado de homología u homología parcial entre los genomas parcialmente homólogos aportados por *P. nicorae* y los cromosomas de los genomas homólogos que aporta el autotetraploide 4PT. La colección Hojs388 de *P. plicatum* es tetraploide y se reproduce por apomixis. Para esta especie existen reportes que dan cuenta de la existencia generalmente de plantas

tetraploides ($2n=40$) (Saura, 1941; Magoon & Marchanda, 1961; Gould 1968; Gould & Soderstrom, 1970; Bashaw et al., 1970; Pohl & Davidse 1971; Davidse & Pohl, 1972; 1974; Fernandes et al., 1974; Pagliarini et al., 2001) y de reproducción apomítica en plantas tetraploides (Pritchard, 1970; Burson & Bennett, 1971). Sin embargo, también se ha reportado un citotipo diploide para esta especie (Reeder, 1967; Fernandes et al., 1974; Davidse & Pohl, 1972; 1978; Honfi et al., 1990) y que el citotipo diploide es de reproducción sexual y alógamo por autoincompatibilidad (Espinoza & Quarin, 1997). Los autores mencionan la existencia de asociaciones cromosómicas multivalentes, particularmente cuadrivalentes, en la meiosis del citotipo tetraploide. Sin embargo, el promedio reportado es generalmente inferior a 1 cuadrivalentes/célula, con raras excepciones como por ejemplo con un valor general de 10 bivalentes y 5 cuadrivalentes mencionado por Bashaw et al. (1970). Excepto por datos como este, que indicaría un origen autoploide, la gran mayoría de los datos corresponden a asociaciones cromosómicas típicas de plantas aloploiploides segmentarios o autopoliploides diploidizados. En la planta Hojs388 se observó un alto porcentaje de bivalentes, con la presencia de algunos univalentes y eventualmente un cuadrivalente; lo que sugiere primariamente que este genotipo tiene un origen alotetraploide. En sus híbridos intraespecíficos obtenidos con la planta 4PT de *P. plicatulum*, también se observó un alto porcentaje de bivalentes ya que en promedio el 68% de los cromosomas forman bivalentes, con algunos univalentes, trivalentes y cuadrivalentes. En realidad, en los híbridos se forman menos multivalentes que en la madre pero bastante más que en el padre. En promedio, en la meiosis de la madre el 28,75% de los cromosomas forman multivalentes (trivalentes + cuadrivalentes) y en Hojs388 solo el 1% de los cromosomas se asocia formando cuadrivalentes (no se observaron trivalentes), mientras que, en promedio, en los híbridos los multivalentes formados (trivalentes + cuadrivalentes) involucran al 10% de los cromosomas. Estos resultados sugieren que, por un lado, en la meiosis de los híbridos hay autosíndesis no solo entre los cromosomas de los dos genomas homólogos de la madre autotetraploide 4PT, sino también entre varios cromosomas de los dos genomas aportados por Hojs388. Es decir, debe haber un grado bastante

importante de homeología (homología parcial) entre los dos genomas que aporta Hojs388 porque en algunas células de los híbridos se observaron hasta 18 II, de los cuales 10 se supone que se debe a autosíndesis entre cromosomas de la madre, pero los 8 restantes deben provenir del apareamiento entre cromosomas de los dos genomas aportados por Hojs388. Por otro lado, el hecho de que en promedio el 10% de los cromosomas de los híbridos se asocian formando cuatrivalentes indica que existe cierta homología entre las dos copias homólogas del genoma aportado por la madre autotetraploide y cromosomas de los dos genomas (homeólogos) aportados por el padre. Esto permite pensar que el tetraploide Hojs388 no debe haber surgido directamente por autoploidía de un citotipo diploide, como se supuso para el citotipo tetraploide de *P. chaseanum* o el tetraploide *P. guenoarum*, sino que en su origen debe existir algún tipo de hibridaciones, probablemente entre especies emparentadas. Por lo tanto, *P. plicatum* Hojs388, probablemente sea un alotetraploide o un autotetraploide diploidizado.

En general las asociaciones cromosómicas observadas en las progenies analizadas fueron regulares, observándose en la anafase generalmente 20 cromosomas en cada polo y raramente con la presencia de algunos rezagados y fragmentos cromosómicos. La regularidad manifestada en la mayoría de las asociaciones, se puede decir que estaría asociada a la fertilidad manifestada en la mayoría de los híbridos.

2. Análisis de fertilidad

El genotipo 4PT de *P. plicatum* se caracteriza por ser una planta totalmente autoincompatible y tiene una baja producción de semillas (25%) cuando se cruza con el genotipo 7PT de *P. plicatum*, ambos de origen experimental y autotetraploides (Sartor et al., 2009). Sin embargo el genotipo 7PT de *P. plicatum*, no es totalmente autoincompatible, ya que el mismo en condiciones de autopolinización produce semillas llenas (3,6%). Cuando se polinizó con polen del genotipo 4PT produjo 11,4% semillas llenas (Sartor et al., 2009).

La fertilidad de los híbridos intra e interespecíficos entre 4PT, 7PT × genotipos tetraploides apomícticos, fue variable tanto en condiciones de autopolinización como en polinización libre (Tabla 13). Se analizaron entre 1 y

11 individuos por familia, (entre 186 y 31069 espiguillas) en condiciones de autopolinización y polinización libre. En condiciones de autopolinización los porcentajes de espiguillas llenas fueron menores que en condiciones de polinización libre, excepto los híbridos entre 4PT × *P. guenoarum* BO107 que mostraron un porcentaje mayor en autopolinización (29,8%) que en polinización libre (15,0%). El porcentaje de semillas llenas en condiciones de autopolinización osciló entre 0,0% para el híbrido de 7PT × *P. lenticulare* V11893 y 29,8% para híbridos de 4PT × *P. guenoarum* BO107. En condiciones de polinización libre, el porcentaje de llenado varió entre 1,6% para el híbrido de 7PT × *P. lenticulare* V11893 y 40,1% para híbridos de 4PT × *P. plicatum* ML5.

Tabla 13. Fertilidad en híbridos de 13 cruzamientos entre 4PT o 7PT × genotipos tetraploides apomícticos, en condiciones de autopolinización y polinización libre.

Cruzamientos	Autopolinización			Polinización Libre	
	Híbridos analizados (n°)	Espiguillas analizadas (n°)	Espiguillas llenas (%)	Espiguillas analizadas (n°)	Espiguillas llenas (%)
<i>P. plicatum</i> 4PT					
x <i>P. chaseanum</i> ST13894	9	31069	1,0	38716	6,8
x <i>P. compressifolium</i> AK40811	1	710	8,5	1992	16,9
x <i>P. guenoarum</i> Azulao	7	1239	9,3	3980	20,7
x <i>P. guenoarum</i> Baio	6	1460	8,3	5308	17,0
x <i>P. guenoarum</i> BO107	3	1337	29,8	793	15,0
x <i>P. guenoarum</i> Q4108	1	767	0,4	2140	22,1
x <i>P. lenticulare</i> BO190	3	290	1,0	1775	6,3
x <i>P. nicorae</i> CPI27707	1	1009	7,4	850	21,2
x <i>P. nicorae</i> PI508821	11	4008	28,5	12717	31,5
x <i>P. oteroi</i> A&V1332	6	9666	1,7	11447	22,2
x <i>P. plicatum</i> Hojs388	7	4296	5,6	8374	12,7
x <i>P. plicatum</i> ML5	3	1255	6,9	1121	40,1
x <i>P. rojasii</i> AK40732	2	2941	2,0	5138	10,4
<i>P. plicatum</i> 7PT					
x <i>P. lenticulare</i> V11893	1	186	0,0	1047	1,6

Estudios previos en *Paspalum* indican que progenies híbridas obtenidas de cruzamientos interespecíficos (Quarin & Burson, 1983; Quarin et al., 1984; Quarin & Norrmann, 1987, 1990; Caponio & Quarin, 1987; 1990) resultaron ser

en su mayoría estériles y en los casos que fueron fértiles, la producción de semillas fue baja. Sin embargo la mayoría de los híbridos obtenidos en esta tesis en los cruzamientos intra e interespecíficos resultaron ser fértiles, situación similar sucedió en la progenie obtenida por Aguilera et al. (2011) en el cruzamiento entre *P. plicatulum* × *P. guenoarum*. Teniendo en cuenta que la mayoría de los híbridos sobrevivieron y produjeron semillas, contar con los mismos fue una ventaja, porque permitió medir su producción de semillas en condiciones de autopolinización y polinización libre. La fertilidad manifestada en la mayoría de los híbridos indica que es posible utilizarlos para realizar retrocruzas y nuevos cruzamientos. Además, si los individuos que tienen una buena producción de semillas en condiciones de polinización libre, baja o nula producción en autopolinización, y si son de reproducción sexual, serían de gran importancia, ya que los mismos se pueden usar como madres en futuros programas de mejoramiento genético, sin la necesidad de castración. Esta condición prácticamente no se dio, por lo menos en términos absolutos, ya que la gran mayoría de los híbridos mostró al menos cierto grado de fertilidad en autofecundación. Sin embargo, es evidente que en la mayoría de los casos se manifestó una mayor fertilidad en condiciones de polinización cruzada. Es probable que esto se deba a algún tipo de control genético de la incompatibilidad, (como el que existe en las madres, especialmente en 4PT) o bien a efectos deletéreos de la autogamia. Cuando se hizo la población de policruzamiento, al principio del trabajo de tesis, con el objetivo de crear una población sexual sintética, se tenía solo datos preliminares para afirmar que los distintos híbridos se iban a inter cruzar. Los datos que ahora tenemos indican que la gran mayoría de híbridos produce mayor cantidad de semillas cuando disponen libremente de polen de otros híbridos. La predicción que emerge de las hipótesis que propone que las poblaciones híbridas F_1 serían interfértiles, posibilitarían el desarrollo de una población tetraploide sexual sintética se cumple confirmando la hipótesis inicial de trabajo.

La enorme variación y la mezcla de características fenotípicas observadas en la población sintética indican que el policruzamiento se produjo y que es posible el intercambio de genes al cultivar consociados a los híbridos de distintas combinaciones entre diferentes especies del grupo *Plicatula*. Esto

abre un abanico muy grande de posibilidades para intentar distintas vías en el mejoramiento genético de estas especies. Si a esto le agregamos que el carácter apomixis se manifiesta como dominante y es posible usarlo para estabilizar genéticamente una población, las posibilidades son aún mayores.

V.3. Población sintética tetraploide sexual dentro del Grupo Plicatula

1. Híbridos F_1 sexuales seleccionados para policruzamiento

Dentro de 9 familias híbridas, fueron seleccionados 50 individuos sexuales que se caracterizaron por presentar mayor vigor y porque todos ellos eran fértiles, es decir, eran capaces de formar semillas aunque en porcentajes variables. Debido a las limitantes de tipo operativo que significó el manejo de cruzamientos dialélicos, con plantas en macetas, en invernadero, la necesidad de ensobrar las inflorescencias y distribuir el polen, además del hecho de tener que hacerlos en un solo ciclo de floración, solo 9 individuos de los 50 fueron utilizados para realizar los cruzamientos dialélicos y sus recíprocos (Tabla 14). Los 9 híbridos involucrados pertenecieron a los siguientes cruzamientos: A1, A37, A41 (4PT × *P. guenoarum* Azulao); B5, B44 (4PT × *P. guenoarum* Baio); H3 (4PT × *P. plicatulum* Hojs388); N10 (4PT × *P. nicorae*); O8 (4PT × *P. oteroi*); L1 (7PT × *P. lenticulare*). El total de cruzamientos dialélicos y sus respectivos recíprocos, al tomar 9 individuos es, teóricamente, de 72 combinaciones. Solo fue posible completar 8 combinaciones, las que con las combinaciones recíprocas sumaron 16 del total de 72. El porcentaje de espiguillas llenas en los diferentes cruzamientos dialélicos y en sus recíprocos fue muy variable, tanto entre distintas combinaciones como entre combinaciones recíprocas. En algunos casos la fertilidad fue baja independiente de la dirección del cruzamiento, como por ejemplo en A37 × A41 fue de 0,9% y en el recíproco fue 0,2%; en N10 × H3 la fertilidad fue importante con el 29.6% y en el recíproco también; sin embargo, en otros casos la fertilidad tuvo valores muy distintos dependiendo de cuál híbrido fue el que recibió el polen, como por ejemplo el híbrido B44 produjo 1,4% de espiguillas con grano cuando se polinizó con H3, mientras que H3 produjo 17,5% cuando recibió polen de B44.

Tabla 14. Cruzamientos dialélicos y sus dialélicos recíprocos entre híbridos F₁ sexuales.

Cruzamientos dialélicos			Cruzamientos dialélicos recíprocos		
Cruzamientos	Espiguillas analizadas (n°)	Espiguillas llenas (%)	Cruzamientos	Espiguillas analizadas (n°)	Espiguillas llenas (%)
A37 × A41	322	0,9	A41 × A37	864	0,2
L1 × O8	368	2,2	O8 × L1	200	0,0
B5 × A1	377	15,9	1 × B5	811	8,9
B44 × H3	955	1,4	H3 × B44	315	17,5
B44 × L1	2216	2,0	L1 × B44	595	2,9
N10 × A41	565	37,2	A41 × N10	122	20,5
N10 × O8	1051	18,3	O8 × N10	511	18,0
N10 × H3	936	29,6	H3 × N10	374	32,9

Los híbridos se identifican de la siguiente manera: Una letra mayúscula identifica al parental polinizador que dio origen al híbrido y el número que le sigue a la letra mayúscula identifica al número de orden de ese individuo en esa familia de híbridos. **A:** Azulao, **B:** Baio (*P. guenoarum*); **H:** Hoosgard (*P. plicatulum*); **L:** Lenticulare (*P. lenticulare*); **N:** Nicorae (*P. nicorae*); **O:** Oteroi (*P. oteroi*).

Por otra parte, se realizó simultáneamente una comparación entre la producción de semillas de cuatro híbridos involucrados en los cruzamientos dialélicos, con la proporción de espiguillas llenas de esos mismos híbridos en condiciones de autopolinización. Como la producción de varas floríferas en las plantas en macetas fue limitada, en varios híbridos no fue posible hacer autopolinización simultáneamente con los cruzamientos dialélicos recíprocos. En general, cuando la autopolinización fue posible, la producción de semillas fue bastante menor que cuando recibieron polen de otros híbridos. Concretamente, los híbridos O8 y L1 no produjeron semillas en autopolinización pero sí lo hicieron cuando recibieron polen de algún otro híbrido: el 18% de las espiguillas de O8 formaron grano cuando recibieron polen de N10 mientras que el 2,2 y 2,9% de las espiguillas de L1 formaron semillas al ser polinizadas con O8 y B44, respectivamente (Tabla 14). Por su parte, B44 tuvo una baja producción en autopolinización (1,4%) y también en dos combinaciones de polinización con otros híbridos: 1,4% con polen de H3 y 2,0% con polen de L1, respectivamente. El híbrido H3 produce 18,4% en autopolinización, mientras que en dos casos de polinización dio valores de 17,5 y 32,9%. Aunque fue grande la variabilidad observada para la producción de semillas en los diferentes cruzamientos dialélicos y sus recíprocos, en general esta producción fue mayor que la que cada híbrido obtuvo en autopolinización. Esto estaba indicando que había cierto grado de incompatibilidad en estos

híbridos. Además, y a pesar de que son pocos los cruzamientos dialélicos que se lograron realizar en una temporada, se pudo observar que la producción de un híbrido puede ser pequeña en alguna combinación de polinización pero ser mucho mayor cuando recibe polen de algún genotipo distinto. Estos resultados, y la necesidad de acortar los tiempos para lograr una población sexual sintética, nos llevaron a programar, en la siguiente temporada, el establecimiento de una población de inter cruzamiento de 50 plantas sexuales, provenientes de 9 combinaciones híbridas. De los 50 individuos seleccionados de las 9 familias híbridas, se realizaron réplicas ampliando a 132 individuos que constituyeron la población de policruzamiento (Figura 10, Tabla 15).



Figura 10. Híbridos sexuales seleccionados y sus respectivas réplicas utilizados para la población de policruzamiento.

Tabla 15. Híbridos sexuales seleccionados para el policruzamiento y el número de réplicas correspondiente

Cruzamientos	Híbridos sexuales Seleccionados (n°)	Réplicas (n°)	N° de F₁
<i>P. plicatum</i> 4PT			
x <i>P. chaseanum</i> ST13894	9	2	18
x <i>P. guenoarum</i> Azulao	11	2	22
x <i>P. guenoarum</i> Baio	11	2	22
x <i>P. guenoarum</i> GR19	11	2	22
x <i>P. guenoarum</i> Q4108	1	8	8
x <i>P. nicorae</i> PI508821	1	6	6
x <i>P. oteroi</i> A&V1332	1	10	10
x <i>P. plicatum</i> Hojs388	4	4	16
<i>P. plicatum</i> 7PT			
x <i>P. lenticulare</i> V11893	1	8	8
Total	50		132

Los 132 individuos fueron trasplantados al campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, a 1 metro de distancia entre planta en una parcela constituida por 12 líneas de 11 plantas cada una (Figura 11). La cosecha se realizó simultáneamente de todas las plantas de la parcela un mes después que se consideró que todas estaban en plena floración y se polinizaban libremente. A esto se agregó la cosecha de las plantas precoces que habían sido intercruzadas manualmente. Se cosecharon aproximadamente 50 gramos de semillas llenas provenientes de las 132 plantas.

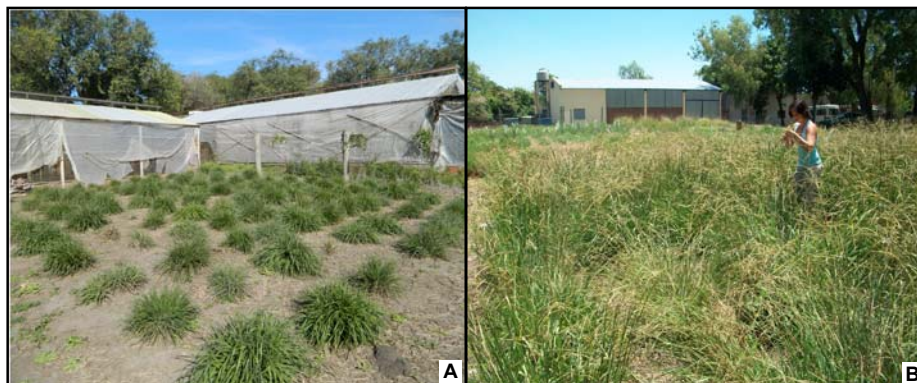


Figura 11. Población de policruzamiento ubicado en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Dos estados fenológicos A: crecimiento vegetativo B: plena floración.

2. Población sintética tetraploide sexual

De las espiguillas llenas obtenidas del policruzamiento, una parte fueron sembradas y se obtuvieron 540 plantas, que fueron inicialmente repicadas a macetas y mantenidas dentro del invernáculo. Posteriormente fueron trasladadas al campo experimental arrendado en el marco del convenio entre la Facultad de Ciencias Agrarias y la empresa PGG Wrightson Seeds en la localidad de Riachuelo, Corrientes. El trasplante se hizo a 1 metro de distancia entre plantas. Estas 540 plantas formaron la población sintética tetraploide sexual (Figura 12).

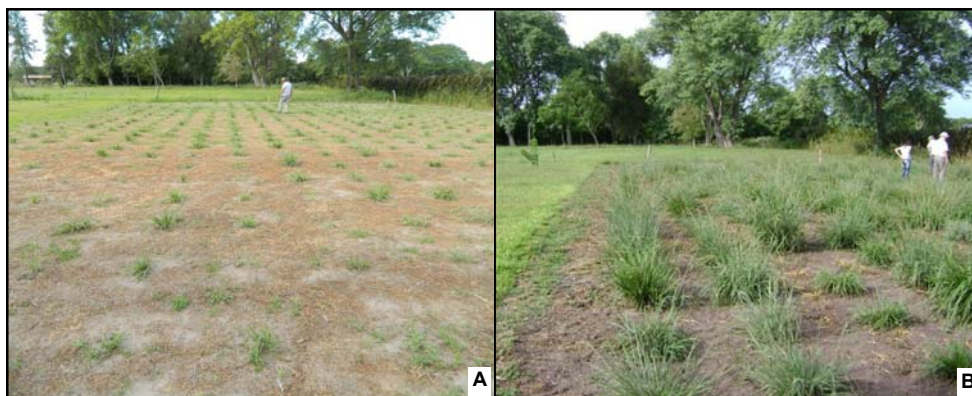


Figura 12. Población sintética tetraploide sexual ubicada en el campo experimental en la localidad de Riachuelo, Corrientes. Dos estados fenológicos A: crecimiento vegetativo B: inicio de la floración.

Los estudios de citometría de flujo permitieron identificar a los híbridos sexuales y apomícticos de las diferentes familias híbridas. La selección de

algunos híbridos sexuales vigorosos y fértiles (capaces de producir semillas), pertenecientes a varias progenies de distintas combinaciones híbridas constituyó la base para formar la población sintética sexual. Por otro lado, los resultados de los cruzamientos dialélicos y sus recíprocos realizados con algunos de estos híbridos sexuales comparados con la producción de semillas en autofecundación de algunos de ellos demostraron que son capaces de cruzarse libremente cuando florecen simultáneamente. Esto presupone cierta prevalencia por la alogamia, aunque no descarta la autogamia. Cuando se realiza el policruzamiento, el aislamiento de las plantas seleccionadas es fundamental para evitar la contaminación con polen extraño de otros genotipos. Es por eso que se mantuvieron cortadas las inflorescencias de las diferentes especies de *Paspalum* que se encontraban en las inmediaciones de nuestra población y así se aseguró que el policruzamiento sea exclusivamente entre las 132 plantas elegidas. El diagrama de la parcela de 132 plantas fue realizado tratando de que cada uno de los híbridos intervinientes estuviese cerca de la mayor cantidad posible de los otros híbridos.

El modelo genético de la herencia de la apomixis en diferentes especies de *Paspalum* (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Aguilera et al., 2015) y en otras Gramíneas Panicoideas como *Megathyrsus maximus* (Jacq.) BK Simon & SWL Jacobs (Savidan, 1975) y *Brachiaria* (Valle & Glenke, 1993) implica que al depender de un factor dominante, las plantas sexuales al autofecundarse, o al cruzarse entre sí, siempre dan descendientes sexuales. Por lo tanto, es de esperar que todos los descendientes de las semillas formadas por polinización abierta en la población de las 132 plantas vayan a producir plantas sexuales. Es cierto que en el policruzamiento intervinieron 50 híbridos originados entre *P. plicatulum* y otras cinco especies (*P. chaseanum*, *P. nicorae*, *P. oteroi* y *P. lenticulare*), además de un biotipo de *P. plicatulum* (Hojs388) que es diferente a la madre. Solo se conocen registros de estudios de herencia de la apomixis dentro de *Paspalum* en *P. plicatulum* × *P. guenoarum* (Aguilera et al., 2015) donde efectivamente los cruzamientos entre dos plantas sexuales siempre originan plantas sexuales. Los resultados acerca de la segregación para apomixis observada en las F₁ de los demás híbridos interespecíficos intervinientes en estos policruzamientos, y los resultados de los

estudios citogenéticos en esos híbridos hacen suponer que el modelo genético de herencia de la apomixis es básicamente el mismo que el descrito para *P. notatum*, (Martínez et al., 2001) para *P. plicatum* × *P. guenoarum*, (Aguilera et al., 2015), para *P. máximum* (Savidan 2000) y para *Brachiaria* sp (Valle & Glenke, 1993). En este modelo, la apomixis está controlada por un gen dominante en el marco de la herencia tetrasómica, independientemente de la acción colateral del mismo o de otro gen/es que pueda modificar la relación en la segregación. Siempre en ese modelo, las plantas sexuales dan descendientes sexuales. Por lo tanto, consideramos que las plantas obtenidas como producto del policruzamiento formaron una población sintética sexual. Por supuesto, esa población va a ser mantenida y utilizada en trabajos de avance en el uso de intercambio génico para el mejoramiento genético que involucre a distintas especies del grupo Plicatula. Uno de los objetivos futuros será seleccionar, a partir de esta población sexual sintética, un pequeño grupo de individuos que serán utilizados como madres en cruzamientos con plantas apomícticas. A ese pequeño grupo de plantas sexuales selectas habrá que analizarlas para corroborar que mantienen su condición de reproducción cien por ciento sexual.

Se presupone que la población sintética sexual que hemos obtenido tiene una amplia variabilidad genética, y de hecho se caracteriza por una amplia variación fenotípica. Esta variabilidad genética seguramente se debe al aporte de genes provenientes de cinco especies tetraploides apomícticas diferentes (*P. guenoarum*, *P. nicorae*, *P. chaseanum*, *P. oteroi* y *P. lenticulare*) y de un biotipo de *P. plicatum* (Hojs388) también apomíctico. El origen de esta población indica que en ella se encuentran genes de todas esas especies apomícticas, excepto el/los genes que determinan la apomixis. Al ser los individuos que la integran interfértiles, o al ser posibles de ser usados como madres en cruzamientos futuros, por ser sexuales, se considera que ahora está abierta la posibilidad de transmitir genes que provienen de plantas apomícticas, y aún más, de intercambiar entre plantas sexuales muchos genes que provienen de plantas apomícticas, sin transmitir los factores que determinan la apomixis, si así uno lo quisiera. Además constituye una nueva vía para el mejoramiento genético de especies del grupo Plicatula e implica que ahora se

puede contar con nuevas plantas tetraploides sexuales, las cuales son portadoras de genes de varias especies silvestres tetraploides y apomícticas.

Los citotipos tetraploides silvestres de todas estas especies son invariablemente apomícticos ya que para ninguna de ellas se encontró nunca una planta tetraploide que sea totalmente de reproducción sexual. Eso complicó siempre el mejoramiento genético de estas especies forrajeras. La selección de unas pocas plantas en la población sintética sexual que se ha logrado formará la base del mejoramiento genético en especies del grupo Plicatula de *Paspalum*. Estas plantas constituirán las madres en futuros cruzamientos entre plantas sexuales por plantas apomícticas dentro del grupo Plicatula.

Por otro lado, teniendo en cuenta que se obtuvieron híbridos en 15 familias, y que para esta población sintética solo intervinieron híbridos de 9 familias híbridas, sería posible la incorporación de estos nuevos híbridos y así se ampliaría la variabilidad genética en la población sintética tetraploide sexual. Además podría ser mejorada utilizando una selección recurrente recíproca de hermanos completos interpoblacionales, la cual se considera para la obtención de híbridos porque acumula los efectos aditivos y de dominancia (Borém et al., 2008). El uso de selección recurrente basada en aptitud combinatoria permitiría mejorar genéticamente la población sintética sexual. En *Brachiaria*, Miles, (2007) propuso una modificación para esta técnica, donde utiliza una sola población sexual y un “tester” apomíctico. Propone que la selección de las plantas sexuales se realice a partir del comportamiento de la progenie resultante del cruzamiento prueba donde interviene como parental masculino un genotipo apomíctico. Las posibilidades que esta población abre para el mejoramiento genético de especies del grupo Plicatula de *Paspalum* son ahora infinitamente superiores a lo que era anteriormente.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvieron híbridos interespecíficos a nivel tetraploide entre *P. plicatum* y 7 especies apomícticas diferentes del grupo *Plicatula*, además de híbridos intraespecíficos con genotipos tetraploides silvestres y apomícticos. Esto a partir de 21 combinaciones de cruzamientos, involucrando 11 especies diferentes (7962 espiguillas polinizadas). En 3 de las 4 combinaciones en las que no se lograron híbridos, el número de espiguillas polinizadas fue inferior al número promedio realizado por especie. Con excepción de un caso donde el único híbrido logrado no se pudo analizar (*P. plicatum* × *P. wrightii*) todos los híbridos intra o interespecíficos fueron fértiles y en diferentes grados. Por lo tanto, es posible producir híbridos fértiles con vistas a la transferencia de genes entre especies del grupo *Plicatula* a nivel tetraploide, entre plantas sexuales y apomícticas. El genotipo 4PT tetraploide, de reproducción sexual, inducido por colchicina, es totalmente autoincompatible y toda su descendencia, intra-interespecífica, siempre fue de origen híbrido. Constituye por lo tanto un material ideal para iniciar cualquier programa de mejoramiento por cruzamientos y transferencia génica, ya que no necesita ser castrado antes de polinizar.

La técnica de citometría de flujo resultó ser una herramienta valiosa para la determinación del modo reproductivo de las F_1 obtenidas. En 11 de 12 familias se pudo determinar que existe segregación en F_1 para el modo reproductivo, observándose híbridos sexuales e híbridos apomícticos. En la restante combinación híbrida, *P. plicatum* 4PT × *P. plicatum* ML5, tetraploide silvestres apomíctico, se analizaron 6 híbridos y todos se reproducen por apomixis. No obstante debido al escaso número de individuos analizados no se puede afirmar que en esta combinación no pueda existir recombinación. Esto indica que en este tipo de cruzamientos $4xS \times 4xA$, siempre existirá la posibilidad de fijar una determinada combinación génica si la misma se combina con apomixis.

Conociendo las configuraciones cromosómicas en meiosis de la madre autotetraploide 4PT *P. plicatum*, las observadas en los parentales masculinos y las respectivas progenies nos permitieron inferir dos cosas: el probable modo de origen de las especies poliploides ($4xA$), y también ver si existe algún grado

de homología entre los cromosomas de las especies parentales con el genoma de autotetraploide 4PT *P. plicatulum*. En términos generales, *P. oteroi* y *P. chaseanum*, son de origen autotetraploide mientras que *P. nicorae* sería probablemente un allotetraploide segmentario con dos genomas parcialmente homólogos. El apareamiento de los cromosomas de los diferentes híbridos, intra e interespecíficos sustentan la hipótesis de que estas especies comparten formas de un genoma básico ancestral que actualmente manifiestan distintos grados de homología entre sí y con el genoma de *P. plicatulum*.

La fertilidad de los híbridos en autopolinización, medida como porcentaje de espiguillas que forman grano, salvo excepciones, es escasa. Sin embargo, la proporción de granos formados aumenta en polinización libre cuando muchos y diferentes híbridos florecen simultáneamente en un mismo lugar. Esto es alentador si se piensa en un programa para ampliar la base genética y manipular transferencia génica para objetivos de mejoramiento.

Queda instalada una población sintética tetraploide sexual, caracterizada por una amplia variabilidad fenotípica. También se supone que tiene una amplia variabilidad genética por haberse originado en un policruzamiento. La población de origen estuvo integrada por 50 híbridos F₁ sexuales, correspondientes a 5 combinaciones interespecíficas con especies 4xA y una intraespecífica con un genotipo 4xA silvestre. La semilla se produjo en polinización libre (autopolinización y polinización cruzada). Algunos híbridos analizados inicialmente habían demostrado preferencia por la polinización cruzada, y además ésta fue favorecida manualmente. Sin dudas, la población sintética en conjunto posee una gran variabilidad genética heredada de representantes silvestres apomícticos de seis especies (*P. guenoaraum*, *P. chaseanum*, *P. oteroi*, *P. nicorae*, *P. plicatulum* y *P. lenticulare*), excepto el o los factores genéticos que determinan la apomixis, ya que todas son de reproducción sexual, un carácter recesivo respecto a apomixis.

Los individuos de la población sintética son de reproducción sexual y contienen genes heredados de diferentes especies apomícticas. Es una base extraordinaria para el programa de mejoramiento genético recientemente iniciado en la FCA-UNNE, programa que involucra a especies del grupo Plicatula de *Paspalum*. Es extraordinaria porque es sexual y corresponde a un

grupo taxonómico cuyas especies 4x silvestres son todas apomícticas; porque siendo sexual posee genes heredados de varias especies apomícticas; porque la afinidad genética de los genomas involucrados, la fertilidad y la factibilidad de posteriores intercruzamientos, permitirán el manejo de hibridaciones y transferencia génica tradicional como métodos de mejoramiento.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera PM, Sartor ME, Galdeano F, Espinoza F & Quarín CL. 2011. Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. *Crop Sci* 51:1544-1550.
- Aguilera PM, Galdeano F, Quarín CL, Ortiz JPA & Espinoza F. 2015. Inheritance of aposporous apomixis in interspecific hybrids derived from sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *Paspalum guenoarum*. *Crop Sci* 55:1-10.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE & Hanna WW. 2009. Bahiagrass tetraploid germplasm: reproductive and agronomic characterization of segregating progeny. *Crop Sci* 49:581-588.
- Allard RW. 1964. Principles of plant breeding. John Wiley & Sons, New York.
- Asker SE & Jerling L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Bashaw EC & Forbes I. 1958. Chromosome numbers and microsporogenesis in Dallisgrass: *Paspalum dilatatum* Poir. *Agron J* 50:441-445.
- Bashaw EC & Holt EC. 1958. Megasporogenesis, embryo sac development and embryogenesis in dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. *Agron J* 50:753-756.
- Bashaw EC, Hovin AW & Holt EC. 1970. Apomixis its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Norman MJT Ed. Proceed 11th Intl Grassl Congr Surfers, Paradise, Queensland University of Queensland Press, St Lucia. pp 245-248.
- Borém, A, Condori M & Miranda GV. 2008. Mejoramiento de Plantas. Universidad Federal de Vicosa, MG, Brasil. p. 265.
- Brown WV. 1950. A cytological study of some Texas gramineae. *Bull Torrey Bot Club* 77:63-76.
- Burson BL & Bennett HW. 1970. Cytology, method of reproduction and fertility of Brunswickgrass, *Paspalum nicorae* Parodi. *Crop Sci* 10:184-187.
- Burson BL & Bennett HW. 1971. Meiotic and reproductive behavior of some introduced *Paspalum* species. *J Mississippi Acad Sci* 17:5-8.
- Burton GW. 1940. A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *J Agric Res* 60:193-198.

- Burton GW. 1948. The method of reproduction in common Bahiagrass, *Paspalum notatum*. J Amer Soc Agron 40:443-452.
- Burton GW. 1974. Recurrent restricted phenotypic selection increases forage yields of Pensacola Bahiagrass. Crop Sci 14:83-835.
- Burton GW & Forbes I. 1960. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé). Proc 8th Int Grassland Cong, Reading, England, 11-21 Jul 1960. pp 66-71.
- Cáceres ME, Pupilli F, Quarín CL & Arcioni S. 1999. Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. Euphytica 110:161-167.
- Caponio I & Quarín CL. 1987. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. Kurtziana 19:35-45.
- Caponio I & Quarín CL. 1990. Intra- and interspecific hybridization between Dallisgrass and Vaseygrass. Crop Sci 30:362-364.
- Carman JG. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony (review). Biol J Linn Soc 61:51-94.
- Chase A. 1929. The North American species of *Paspalum*. Contr U S Natl Herb 28:1-310.
- Chase A. 1929. Manuscrito inédito. Hitchcock & Chase Library, Smithsonian Institution, Washington DC.
- Chase A. 1939. *Paspalum* of South America. Unpublished manuscript. Hitchcock and Chase Library, Botany Department, Smithsonian Institution, Washington DC.
- Clayton WD & Renvoize SA. 1986. Genera Graminum. Grasses of the World. Kew Bulletin Addit. Ser. XIII, London.
- Davidse G & Pohl RW. 1972. Chromosome numbers and notes on some Central American grasses. Can J Bot 50:273-283.
- Davidse G & Pohl RW. 1974. Chromosome numbers meiotic behavior and notes on tropical American grasses (Gramineae). Can J Bot 52:317-328.
- Davidse G & Pohl RW. 1978. Chromosome numbers of tropical American grasses (Gramineae). Ann Missouri Bot Gard 65:637-649.

- Darlington CD. 1939. The evolution of genetic systems. Cambridge, UK: Cambridge University Press, London.
- Dellaporta SL, Wood J & Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- De Wet JMJ, Brink DE, Prasada Rao KE & Mengesha MH. 1983. Diversity in Kodo millet, *Paspalum scrobiculatum*. *Economic Bot.* 37:159-163.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M & Robledo CW. InfoStat versión 2002. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Espinoza F & Quarín CL. 1997. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. *Aust J Bot* 45:871-877.
- Espinoza F, Urbani MH, Martínez EJ & Quarín CL. 2001. The breeding system of three *Paspalum* species. *Tropical Grassl* 35:211-217.
- Evers GW & Burson BL. 2004. Dallisgrass and other *Paspalum* species. In: Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (Eds.). Warm season (C4) grasses. *Agron Monogr* 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. pp 681-713.
- Fernandes MIBM, Barreto IL, Salzano FM & Sacchet MCF. 1974. Cytological and evolutionary relationships in Brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). *Caryologia* 27:455-465.
- Forbes I & Burton GW. 1961. Induction of tetraploidy and a rapid field method of detecting induced tetraploidy in Pensacola bahiagrass. *Crop Sci* 1:383-383.
- Gilles A & Randolph LF. 1951. Reduction of quadrivalent frequency in autotetraploid maize during a period of 10 years. *Am J Bot* 38:12-17.
- Gould FW. 1968. Chromosome numbers of Texas grasses. *Can J Bot* 46:1315-1325.
- Gould FW & Soderstrom TRS. 1970. Chromosome numbers of some Mexican and Colombian grasses. *Can J Bot* 48:1633-1639.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E & Grossniklaus U. 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends Genet* 17:597-604.
- Grossniklaus U. 2001. From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering* (Savidan Y et al., Eds.), CIMMYT, México.

- Gustafsson A. 1947. Apomixis in higher plants. II. The causal aspect of apomixes. *Lund Univ Arsskr NF Ad 2* 43: 69-179.
- Hanna WW & Bashaw EC. 1987. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci* 27:1136-1139.
- Hayman BI. 1954. The theory and analysis of variance of diallel crosses. *Genetics* 39:789-809.
- Honfi AI, Quarin CL & Valls JFM. 1990. Estudios citológicos en gramíneas sudamericanas. *Darwiniana* 30:87-94.
- Hollister JD, B Arnold, Svedin E, Xue K, Dilkes B & Bomblies K. 2012. Genetic adaptation associated with genome-doubling in autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *PLoS Genet* 8:1-10.
- Koltunow AM. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Pl Cell* 5:1425-1437.
- Koltunow AM, Bicknell RA & Chaudhury AM. 1995. Apomixis: Molecular Strategies for the Generation of Genetically Identical Seeds without Fertilization. *Plant Physiol* 108:1345-1352.
- Lacadena JR. 1988. *Genética*. 4ta Edición. Editorial Aagesa, España.
- Magoon ML & Marchanda PL. 1961. A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *Indian J Genet PI Breed* 21:212-221.
- Maheshwari P. 1950. An introduction of embryology in angiosperm. New York, McGraw-Hill. pp 476.
- Martínez EJ & Quarin CL. 1999. Citoembriología y comportamiento reproductivo de un citotipo diploide de *Paspalum hydrophyllum* y sus híbridos con *P. palustre* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana* 37:243-251.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarin CL & Ortiz JPA. 2001. Inheritance of apospory in Bahiagrass *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135:19-25.
- Matzk F, Meister A & Schubert I. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant J* 21:97-108.
- Miles J.W. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Sci* 47:238-249.
- Morrone O, Aagesen L, Scataglieni MA, Salariato DL, Denham SS, Chemisquy MA, Sede SM, Giussani LM, Kellogg EA & Zuloaga FO. 2012. Phylogeny of

- the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics* 28:333-356.
- Naumova TN. 1992. Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony. RC Press, Boca Raton, FL, 1931 USA.
- Naumova TN. 1993. Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony. Boca Raton, Fla. (USA); CRC Press.
- Naumova TN & Vielle Calzada JP. 2001. Ultrastructural analysis of apomictic development. In Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering, Savidan Y, Carman JG, & Dresselhaus T, eds (Mexico: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI). pp 44-63.
- Nogler GA. 1984. Gametophytic apomixis. In: Embryology of angiosperms. Johri BM Ed. Springer: Berlin, Heidelberg, New York. pp 475-518.
- Norrmann GA, Quarin CL & Burson BL. 1989. Cytogenetics and reproductive behaviour of different chromosome races in six *Paspalum* species. *J Hered* 80:24-28.
- Novo PE, Espinoza F & Quarin CL. 2013. An apomictic tetraploid *Paspalum chaseanum* cytotype and its cytogenetic relationship with *P. plicatulum* (Poaceae): taxonomic and genetic implications. *Aust J Bot* 61:538-543.
- Oliveira RC & Valls JFM. 2008. Taxonomia de *Paspalum* L., grupo Linearia (Gramineae - Paniceae) do Brasil. *Rev Bras Bot* 25:371-389.
- Ortiz, JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña CA, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME & Pupilli F. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Ann Bot* 112:767-787.
- Pagliarini MS, Carraro LR, Freitas PM, Adamowski EV, Batista LAR & Valls JFM. 2001. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. *Hereditas* 135:27-34.
- Pohl RW & Davidse G. 1971. Chromosome number of Costa Rica grasses. *Brittonia* 23:292-324.
- Pritchard AJ. 1962. The cytology and reproduction of *Paspalum yaguaronense* Henr. *Aust J Agric Res* 13:206-211.
- Pritchard AJ. 1970. Meiosis and embryo sac development in *Urochloa mosambicensis* and three *Paspalum* species. *Aust J Agric Res* 21:648-652.

- Pupilli F, Cáceres ME, Quarin CL & Arcioni S. 1997. Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40:822-828.
- Quero Carrillo AR, Enríquez Quiroz JF, Morales Nieto CR & Miranda Jiménez L. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. *Revisión Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. pp 25-42.
- Quarin CL. 1974. Relaciones citotaxonomicas entre *Paspalum alnum* Chase y *P. hexastachyum* Parodi (Gramineae). *Bonplandia* 3:115-127.
- Quarin, C. L. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5:8-15.
- Quarin CL & Burson BL. 1983. Cytogenetic relations among *Paspalum notatum* var. *saurae*, *P. pumilum*, *P. indecorum*, and *P. vaginatum*. *Bot Gaz* 144:433-438.
- Quarin CL & Burson BL. 1991. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 56:223-228.
- Quarin CL & Hanna WW. 1980. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci* 20:69-75.
- Quarin CL & Norrmann GA. 1987. Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromyorrhizon*. *Bot Gaz* 148:386-391.
- Quarin CL & Norrmann GA. 1990. Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. *Bot Gaz* 151:366-369.
- Quarin CL, Burson BL & Burton GW. 1984. Cytology of intra and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Bot Gaz* 145:20-426.
- Quarin CL, Norrmann GA & Espinoza F. 1998. Evidence for autopoliploidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Hereditas* 129:119-124.
- Quarin CL, Norrmann GA & Urbani MH. 1989. Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsletter* 1:28-29.
- Quarin CL, Pozzobon MT & Valls JFM. 1996. Cytology and reproductive behaviour of diploid tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica* 90:345-349.

- Quarin CL, Valls JFM & Urbani MH. 1997. Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum* a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grassl* 31:114-116.
- Quarin CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC & Bovo OA. 2001. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13:243-249.
- Reeder JR. 1967. Notes on Mexican grasses. VI. Miscellaneous chromosome numbers. *Bull Torrey Bot Club* 94:1-17.
- Reis CAO, Schifino-Wittmann MT & Dall'Agnol M. 2008. Cytogenetic characterization of a collection of *Paspalum nicorae* Parodi accessions. *Crop Breed Appl Biot* 8:212-218.
- Rosenberg O. 1908. Cytological studies on the apogamy in *Hieracium*. *Bot Tidsskr* 28:143-170.
- Rosenberg O. 1930. Apogamie und parthenogenesis bei pflanzen. *Handb Vererbl* 2.
- Sambrook J, Fritsh EF & Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2° ed. New York, Cold Spring Harbor.
- Sartor ME, Quarin CL & Espinoza F. 2009. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Sci* 49:1270-1276.
- Sartor ME, Quarin CL, Urbani MH & Espinoza F. 2011. Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Syst Evol* 293:31-41.
- Saura F. 1941. Cariología de algunas especies del género *Paspalum*. *Inst Génét Fac Agron Vet Univ Buenos Aires* 2:41-48.
- Saura F. 1948. Cariología de gramíneas en Argentina. *Revista Fac Agron Veterin* 12:51-67.
- Savidan Y. 1975. Héredité de l'apomixie. Contribution à l'étude de l'héredité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analyse des sacs embryonnaires). *Cah ORSTOM Sér Biol* 10:91-95.
- Savidan Y. 1982. Nature et héredité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. *Travaux et Documents ORSTOM, Paris*, 153:1-159.
- Savidan Y. 2000. Apomixis: genetics and breeding. *PI Breed Rev* 18:13-86.

- Savidan Y, Jank L, Costa JCG & do Valle CB. 1989. Breeding *Panicum maximum* in Brazil. 1. Genetic resources, modes of reproduction, and breeding procedures. *Euphytica* 41:107-112.
- Smith BW. 1948. Hybridity and apomixis in the perennial grass, *Paspalum dilatatum*. *Genetics* 33:628-629.
- Spillane C, Steimer A & Grossniklaus U. 2001. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. *Sex Plant Reprod* 14:179-187.
- Stebbins GL. 1947. Types of polyploids: their classification and significance. *Adv Genet* 1:403-429.
- Stebbins GL. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia Univ Press, New York.
- Stebbins GL. 1970. Variation and evolution in plants: progress during the past twenty years. In *Essays in Evolution and Genetics in Honor of Theodosius Dobzhansky. A Supplement to Evolutionary Biology* 173-208. M. K. Hecht and W. C. Steere, editors. Appleton-Century-Crofts, N.Y.
- Stein J, Quarin 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. *Theor Appl Genet* 109:186-191.
- Swaminathan MS & Sulbha K. 1959. Multivalent frequency and seed fertility in raw and evolved tetraploids of *Brassica campestris* var. toria. *Zeitschrift für Vererbungslehre* 90:385-392.
- 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.
- Urbani MH & Quarin CL. 2002. Pasto "Chané": nuevo cultivar forrajero de *Paspalum guenoarum*. XIX Reunión de grupo técnico en forrajeras del cono sur. Zona Campos. INTA. Centro Regional Corrientes, Mercedes, Corrientes. 22-24 Oct 2002.
- Valle CB do & Glenke C. 1993. Towards defining the inheritance of apomixis in Brachiaria. *Apomixis Newsl* 6:24-25.
- Valle CB do & Savidan Y. 1996. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: JW Miles, BL Maass & CB Valle do (eds.),

- Brachiaria*: Biology, agronomy, and improvement. CIAT-EMBRAPA, Cali, Colombia. pp 147-163.
- Valle CB do, Glienke C & Leguizamón GOC. 1994. Inheritance of apomixes in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsl* 7:42-43.
- Vallejo FA. 1976. Heredabilidad de los componentes del rendimiento en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Bogotá. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia. pp 93.
- Vallejo FA & Estrada Salazar EI. 2002. Mejoramiento genético de plantas. En Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmeira (ed.). pp 402.
- Vielle-Calzada JP, Nuccio ML, Budiman MA, Thomas TL, Burson BL, Hussey MA & Wing RA. 1996. Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Plant Mol Biol* 32:1085-1092.
- Watson L & Dallwitz MJ. 1992. The Grass Genera of the World. C.A.B. International, Wallingford.
- Walbot V. 1996. Sources and consequences of phenotypic and genotypic plasticity in flowering plants. *Trends Plant Sci* 1:27-32.
- Warmke HE. 1954. Apomixis in *Panicum maximum*. *Am J Bot* 41:5-11.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18:6531-6535.
- Zuloaga FO & Morrone O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral. *Ann Mo Bot Gard Monog Syst Botan* 102:1-297.