



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
INSTITUTO DE BOTÁNICA DEL NORDESTE  
(IBONE-CONICET)



**GENÉTICA Y LOCALIZACIÓN DEL LOCUS DE LA APOMIXIS EN  
ESPECIES DEL GRUPO PLICATULA DE *Paspalum* L. REVELADAS POR  
TÉCNICAS MOLECULARES**

**Lic. Patricia Mabel Aguilera**

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

***Director***

***Co-Director***

**Dr. Francisco Espinoza    Dr. Juan Pablo Amelio Ortiz**

**Ciudad de Corrientes, República Argentina  
2013**

# **Genética y localización del locus de la apomixis en especies del grupo Plicatula de *Paspalum* L. reveladas por técnicas moleculares**

Patricia Mabel Aguilera

Licenciada en Genética-Universidad Nacional de Misiones

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en el Área de Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Nordeste 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 Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Nordeste (UNNE) y el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET) durante el período comprendido entre Abril del 2008 y Octubre del 2012, bajo la dirección del Dr. Francisco Espinoza y la Co-dirección del Dr. Juan Pablo Amelio Ortiz.

Lic. Patricia Mabel Aguilera

*Tesista*

Dr. Francisco Espinoza

*Director*

Dr. Juan Pablo Amelio Ortiz

*Co-director*



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

- ACTA -

-En la Facultad de Ciencias Agrarias, dependiente de la Universidad Nacional del Nordeste, siendo las 12:00 horas del día lunes 25 de marzo de dos mil trece, en cumplimiento a lo dispuesto en el artículo 85° del anexo de la Resolución N° 196/03 C.S., se reúnen los miembros del Tribunal que fueran designados para evaluar el Trabajo de Tesis Doctoral: "**Genética y localización del locus de la apomixis en especies del grupo Plicatula de Paspalum L. reveladas por técnicas moleculares**", presentado por la Lic. Patricia Mabel AGUILERA; **integrado por:** la Dra. Norma PANIEGO (CICVyA INTA Castelar), el Dr. José VESPRINI (UNR), quien asistirá mediante Videoconferencia, el Dr. Gerardo CERVIGNI (CEFOBI) y el Dr. Francisco ESPINOZA (Director de Tesis de la Lic. Patricia Mabel AGUILERA), deciden aceptar la misma y proponen como fecha de exposición el precitado día a la hora 12:00.-----

Dra. Norma PANIEGO (CICVyA INTA Castelar)

Dr. Gerardo CERVIGNI (CEFOBI)

Dr. José VESPRINI (UNR)

Dr. Francisco ESPINOZA (UNNE)

SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO- FCA - UNNE  
posgrado@agr.unne.edu.ar  
Tel/FAX: 03794-427309 (directo) // Tel: 03794-427589 Interno 1577

Lic. JOSE A. GIUDICI  
Director de Gestión de Posgrado  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional del Nordeste



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

- A C T A -

----- En la Facultad de Ciencias Agrarias, dependiente de la Universidad Nacional del Nordeste, siendo las 13:00 horas del día lunes 25 de marzo de dos mil trece, en cumplimiento a lo dispuesto en el artículo 92° del anexo de la Resolución N° 196/03 C.S., se reúnen los miembros del Tribunal que fueran designados para evaluar el Trabajo de Tesis Doctoral: "**Genética y localización del locus de la apomixis en especies del grupo Plicatula de *Paspalum* L. reveladas por técnicas moleculares**", presentado por la Lic. Patricia Mabel AGUILERA; **integrado por:** la Dra. Norma PANIEGO (CICVyA INTA Castelar), el Dr. José VESPRINI (UNR), quien asistió mediante Videoconferencia; el Dr. Gerardo CERVIGNI (CEFOBI) y el Dr. Francisco ESPINOZA (Director de Tesis de la Lic. Patricia Mabel AGUILERA)-----

**Finalizada la exposición, el Tribunal emite el siguiente dictamen:**

La originalidad del trabajo se basa en el estudio del modo reproductivo en especies del género *Paspalum* L. grupo PLICATULA usando como modelo un cruzamiento entre las especies *P plicatulum* y *P guenoarum*.

En la introducción la candidata expone sobre la forma de reproducción en las angiospermas, enfatizando las características distintivas de forma apomictica en diferentes especies y su importancia para la agronomía. Continúa la misma describiendo conceptos de marcadores moleculares, mapeo genético y las particularidades de su construcción en modelos genéticos autoploiploides. Describe adecuadamente el género *Paspalum* y la forma de herencia de la apomixis en el mismo. Finalmente, aborda las generalidades del grupo Plicatula del género *Paspalum*, como también estudios previos de citogenética y sistema reproductivo del grupo. El contenido de esta parte de la tesis permite una presentación del problema y encuadre teórico adecuado.

La presentación de las hipótesis y objetivos estuvieron bien redactados, resultando claros y concretos.

DIRECCION DE POSGRADO - FCA - UNNE

[posgrado@agr.unne.edu.ar](mailto:posgrado@agr.unne.edu.ar)

Tel/FAX: 03794-427309 (directo) // Tel: 03794-427589 Interno 137

// Sargento Cabral 2131. Corrientes, Argentina.

  
Lic. JOSE A. GIUDICI  
Director de Gestión de Posgrado  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional del Nordeste



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

El abordaje metodológico empleado para alcanzar los resultados expuestos fue adecuado. Los resultados obtenidos fueron discutidos correctamente y las conclusiones a las que arribo constituyen una base importante al conocimiento en este área específica. Cabe destacar que se generaron materiales y datos valiosos tanto para la investigación básica de la apomixis como para el mejoramiento genético.

El material visual utilizado mediante la exposición fue apropiado y la exposición oral fue clara. Las respuestas al Jurado demostraron que la Tesista posee amplios conocimientos sobre el tema abordado.

Por lo expuesto, este Tribunal, por unanimidad decide que la Tesis presentada por la **Lic. Patricia Mabel AGUILERA** merece la calificación de: Sobresaliente (10)

Dra. Norma PANIEGO (CICVyA INTA Castelar)

Dr. Gerardo CERVIGNI (CEFOBI)

Dr. José VESPRINI (UNR)

Dr. Francisco ESPINOZA (UNNE)

DIRECCION DE POSGRADO – FCA – UNNE

[posgrado@agr.unne.edu.ar](mailto:posgrado@agr.unne.edu.ar)

Tel/FAX: 03794-427309 (directo) // Tel: 03794-427589 Interno 137  
// Sargento Cabral 2131. Corrientes, Argentina.

Lic. JOSE A. GIUDICI  
Director de Gestión de Posgrado  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional del Nordeste

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Espinoza por aceptar dirigirme y por brindarme la oportunidad, el tiempo y el espacio para llevar a cabo este trabajo de tesis.

Al Dr. Camilo L. Quarin por permitirme desarrollar esta tesis formando parte de su grupo de investigación en el área de Genética de Gramíneas del IBONE y por su guía y apoyo.

Al Dr. Juan Pablo Ortiz, por su paciencia, su buena predisposición para enseñarme y por su optimismo frente a los resultados.

A los jurados de esta tesis, los Dres. Gerardo Cervigni, Norma Paniego y José Vesprini, cuyas evaluaciones ayudaron a enriquecer esta contribución.

A la Dra. Ana I. Honfi, por incentivar mi interés por el estudio de la apomixis y del género *Paspalum*.

A la Ing. Agr. Florencia Galdeano, por su invaluable colaboración, su apoyo y amistad.

A la Dra. María Sartor, por brindarme su tiempo y su ayuda.

A mis compañeros del laboratorio de Genética: Analía, Andrea, Romina, Mapy, Marita, Floppy, Silvana, Eric, Irene, Patricia, Alex, Edmundo, Ignacio, Ríos, Guillermo, Mario, Carlos, por su colaboración y por los gratos momentos compartidos.

Agradezco a las autoridades, investigadores, personal técnico y colegas del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), de la Universidad Nacional del Nordeste y de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNNE), de la Carrera del Doctorado en el Área de Recursos Naturales de la UNNE y de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), quienes de diversas maneras hicieron posible el desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco a mis seres queridos que me acompañaron en estos años.

A mis padres Irene y Roque, por su amor.

A mis hermanas Laura y Diana y a Walter, por su cariño y apoyo.

A mis tías y mi abuela, por esperarme siempre y recibirme con alegría.

A Lidia y Jorge, por recibirme como a una hija.

A Mauro, por su infinito amor, su paciencia, su colaboración y por ser mi compañero incondicional.

*Muchas Gracias!*

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron dados a conocer previamente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas.

#### *Publicaciones*

1. **Aguilera P.M.**, Sartor M.E., Galdeano F., Espinoza F., Quarin C.L. Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. *Crop Science* 51 (4):1544-1550. 2011. ISSN version on line: 1435-0653, ISSN versión impresa: 0011-183X. Crop Science Society of America, Estados Unidos de América.

#### *Reuniones científicas*

1. **Aguilera P.M.**, Galdeano F., Ortiz J.P.A., Quarin C.L., Espinoza F. Modo reproductivo de una progenie originada en un cruzamiento sexual x apomítico entre especies del grupo Plicatula de *Paspalum*. *XXXVIII Congreso Argentino de Genética*. S. M. de Tucumán, Tucumán, 21-23/09/2009, SAG. *Lilloa* 45(S.): 50-2009.
2. **Aguilera P.M.**, Galdeano F., Ortiz J.P.A., Quarin C.L., Espinoza F. Reproductive behavior of interspecific hybrids among two forage species of the Plicatula group of *Paspalum*. *6<sup>th</sup> International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf*. Buenos Aires, Argentina, 15-19/03/2010. *Actas 6<sup>th</sup> ISMBFT*, ediciones INTA: 73-2010.
3. **Aguilera P.M.**, Sartor M.E., Galdeano F., Espinoza F., Quarin C.L. Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. II Ciclo de seminarios sobre avances en la caracterización genética y molecular de la apomixis en gramíneas forrajeras. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. Zavalla, Santa Fe, Argentina. 09 y 10/11/2010.
4. **Aguilera P.M.**, Ortiz J.P.A., Quarin C.L., Espinoza F. Población de mapeo y selección de marcadores para localizar la región genómica de la apomixis en especies del grupo Plicatula de *Paspalum*. *XL Congreso Argentino de Genética*. Corrientes, Argentina, 18-21/09/2011, SAG. *BAG* 41(S.): 191-2011.
5. **Aguilera P.M.**, Quarin C.L., Ortiz J.P.A., Espinoza F. Characterization of the linkage group carrying apomixis in Plicatula species of *Paspalum* L. III Ciclo de seminarios sobre avances en la caracterización genética y molecular de la apomixis en gramíneas forrajeras. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. Zavalla, Santa Fe, Argentina. 25-27/10/2012.

#### *Otros trabajos científicos publicados durante la realización de esta tesis*

1. **Aguilera P.M.**, Honfi A.I., Daviña J.R. Estudios cromosómicos en *Acmella bellidioides* (Sm.) R. K. Jansen (Asteraceae) del Nordeste de Argentina. *Gayana Botánica* 68 (1): 23-27. 2011. ISSN: 0016-5301. Ediciones Universidad, Chile.

2. **Aguilera P.M.**, Daviña J.R., Honfi A.I. *Viguiera anchusaefolia* var. *immarginata*. En: Marhold, K. (ed.), IAPT/IOPB chromosome data 12. *Taxon* 60 (6): 1784; E1-E2. 2011. ISSN: 0040-0262. International Association for Plant Taxonomy, Austria.
  
3. **Aguilera P.M.**, Daviña J.R., Honfi A.I. *Asteraceae*. En: Marhold, K. (ed.), IAPT/IOPB chromosome data 13. *Taxon* 61 (4): 889; E1-E2. 2012. ISSN: 0040-0262. International Association for Plant Taxonomy, Austria.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	6
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	8
<b>RESUMEN</b>	10
<b>ABSTRACT</b>	11
<b>INTRODUCCIÓN</b>	12
La reproducción sexual	12
Apomixis	13
Rasgos distintivos y tipos de apomixis	13
Importancia agronómica de la apomixis	16
Mapeo genético	17
Mapas de ligamiento genético	17
Marcadores moleculares empleados en la construcción de mapas de ligamiento genético	18
Marcadores AFLP	19
Bases teóricas para la construcción de mapas de ligamiento genético	20
Construcción de mapas de ligamiento con marcadores de ADN	22
Poliploidía: Conceptos generales, autopoliploides y alopoliploides	23
Mapeo genético en poliploides	25
Aplicaciones prácticas de la construcción de mapas de ligamiento genético en vegetales	27
El género <i>Paspalum</i>	28
Estudios previos en relación al carácter apomixis en el género <i>Paspalum</i> : herencia y mapas de ligamiento genético	30
Herencia del carácter apomixis en especies de <i>Paspalum</i>	30
Mapas de ligamiento genético, mapeo comparativo y marcadores moleculares ligados a la apomixis en especies de <i>Paspalum</i>	32
El grupo <i>Plicatula</i> de <i>Paspalum</i>	34
Generalidades y especies que conforman el grupo	34
Estudios citogenéticos y reproductivos en el grupo <i>Plicatula</i>	35
Especies utilizadas en este estudio: <i>Paspalum plicatulum</i> y <i>P. guenoarum</i>	37
<b>HIPÓTESIS</b>	38
<b>OBJETIVOS</b>	39
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	40
Material vegetal y cruzamientos	40
Caracterización morfológica de los parentales y sus híbridos	42
Clasificación de los individuos F <sub>1</sub> según el modo de reproducción	42
Determinación del nivel de ploidía de los individuos F <sub>1</sub>	43
Estudios de la meiosis de GR19 y sus híbridos interespecíficos con 4PT	44
Estudios de fertilidad	44
Extracciones de ADN genómico	45
Calidad y concentración del ADN genómico	46
Generación de marcadores moleculares de AFLP	46
Electroforesis en geles de poliacrilamida	50
Clasificación de los marcadores moleculares en la población de mapeo	52
Análisis de segregación y determinación del tipo de herencia (disómica o polisómica)	54
Construcción de mapas de ligamiento genético	55
Análisis estadístico	56
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	57
<b>Sobre la genética del locus de la apomixis en especies del grupo <i>Plicatula</i></b>	57

<b>Parte 1. Generación y caracterización de una población segregante por el modo de reproducción obtenida mediante el cruzamiento entre dos especies de gramíneas forrajeras tetraploides: <i>Paspalum plicatum</i> sexual y <i>P. guenoarum</i> apomíctico</b>	57
Generación de una población F <sub>1</sub> entre especies tetraploides del grupo Plicatula	57
Caracterización morfológica de los genotipos 4PT, GR19 y de sus híbridos	58
Caracterización reproductiva de los individuos F <sub>1</sub>	61
Determinación del nivel de ploidía de la F <sub>1</sub>	64
Estudios de fertilidad	65
Retrocruzamientos y poblaciones F <sub>2</sub> . Determinación del modo reproductivo	65
Segregación del carácter apomixis en especies del grupo Plicatula	66
Conclusiones	72
<b>Parte 2. Citogenética de <i>Paspalum guenoarum</i> y sus híbridos con <i>P. plicatum</i>.</b>	
<b>Análisis de segregación de los marcadores moleculares</b>	73
Estudio de la meiosis en GR19 y cuatro de sus híbridos con 4PT	73
Generación de marcadores moleculares y análisis de segregación en la población de mapeo	76
Marcadores moleculares	76
Análisis de segregación	79
Determinación del tipo de herencia de <i>P. plicatum</i> tetraploide sexual y de <i>P. guenoarum</i> tetraploide apomíctico mediante el análisis de marcadores moleculares	81
Conclusiones	84
<b>Sobre la localización del locus de la apomixis en especies del grupo Plicatula</b>	85
<b>Los mapas de ligamiento genético a nivel tetraploide de <i>Paspalum plicatum</i> sexual y <i>P. guenoarum</i> tetraploide apomíctico basados en marcadores moleculares de AFLP</b>	85
Construcción del mapa marco de 4PT	86
Construcción del mapa marco de GR19	90
Caracterización del grupo de ligamiento que incluye al control de la aposporia (grupo apo)	94
Determinación de cromosomas homólogos de 4PT y GR19 en base a marcadores de tipo puente alélico	95
Conclusiones	106
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	107

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADD: alelo en dosis doble (double dose allele, DDA)

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismos en el largo del fragmento de amplificación (amplified fragment length polymorphism)

ADS: alelo en dosis simple

ARNasa: ribonucleasa

BACs: cromosomas bacterianos artificiales (bacterial artificial chromosome)

BSA: albúmina sérica bovina 1-acetilada

BSA: análisis de segregantes en grupo (bulk segregant analysis)

°C: grados Celsius

cM: centiMorgans

cm: centímetros

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

F<sub>1</sub>: primera generación en un cruzamiento

F<sub>2</sub>: segunda generación en un cruzamiento, nacida del cruzamiento de dos F<sub>1</sub> o de la autopolinización de una F<sub>1</sub>.

FCCS: citometría de flujo en semilla (flow cytometry seed screen)

FISH: hibridación fluorescente in situ (fluorescent in situ hybridization)

g: gramos

kpb: kilo pares de bases ( $1 \times 10^3$  pares de bases)

M: molar

ml: mililitro

mM: milimolar

mm<sup>2</sup>: milímetro cuadrado

Mpb: mega pares de bases ( $1 \times 10^6$  pares de bases)

ng: nanogramos ( $1 \times 10^{-9}$  g)

ng/μl: nanogramos por microlitro

nm : nanómetros ( $1 \times 10^{-9}$  m)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa de ADN (polymerase chain reaction)

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

PM: peso molecular

pM: picomolar ( $1 \times 10^{-12}$  Molar)

pM/μl: picomoles por microlitro

RAPD: polimorfismos por amplificación al azar del ADN (random amplified polymorphic DNA)

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphisms)

rpm: revoluciones por minuto

SCAR: regiones amplificables caracterizadas por secuencia (sequence-characterized amplified region)

SEA: saco embrionario apospórico

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-(hidoximetil)-aminoetano

T4 ADN ligasa: enzima que liga el ADN

U: unidades; medida de cantidad de enzima

U/ $\mu$ l: unidades por microlitro

$\mu$ g: microgramos ( $1 \times 10^{-6}$  g)

$\mu$ g/ $\mu$ l: microgramos por microlitro

$\mu$ l: microlitro ( $1 \times 10^{-6}$  l)

$\mu$ M: micromolar ( $1 \times 10^{-6}$  M)

V: voltios

v/v: volumen en volumen

$\chi^2$ : Chi cuadrado

## RESUMEN

La apomixis es un sistema de reproducción asexual a través de semillas que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre. Este tipo de reproducción es significativo en varios géneros de la subfamilia Panicoideae e importante por sus connotaciones evolutivas y por sus implicancias en el mejoramiento genético. *Paspalum* es un género de la familia *Poaceae* que comprende entre 330 y 400 especies naturales de regiones tropicales, subtropicales y templadas, principalmente de América del Norte y América del Sur. El grupo Plicatula sobresale dentro del género por el potencial forrajero de sus especies, muchas de ellas típicas de los campos del NE de Argentina. La mayoría de estas especies son tetraploides ( $2n = 4x = 40$  cromosomas) y de reproducción apomítica ( $4xA$ ), y algunas de ellas tienen una contraparte coespecífica diploide sexual ( $2n = 2x = 20$ ) ( $2xS$ ). Hasta el momento no se han encontrado citotipos tetraploides sexuales ( $4xS$ ) creciendo en la naturaleza. El objetivo de este trabajo fue generar conocimiento sobre el control genético de la apomixis en especies del grupo PLICATULA DE *Paspalum* L. mediante la utilización de técnicas moleculares. Para ello, se generó una población segregante para el modo de reproducción mediante el cruzamiento entre las especies tetraploides de *Paspalum plicatulum* (100 % sexual, de origen experimental) y *P. guenoarum* (apomítico natural), se construyeron los mapas de ligamiento genético de ambas especies, se localizó en el mapa masculino la región responsable de la apomixis, se comprobó el tipo de herencia de ambos genotipos parentales y se compararon los resultados con los antecedentes citogenéticos. Se generó una población híbrida interespecífica, segregante para el modo reproductivo, de 211 plantas  $F_1$ . De 206 híbridos clasificados, 127 se reproducen por sexualidad y 79 son apomíticos. Los individuos  $F_1$  heredaron más características del padre GR19 que de la madre 4PT, lo cual indicó el origen híbrido de la progenie. La herencia del carácter apomixis en especies de Plicatula mostró una distorsión en la segregación para el carácter modo reproductivo de 1,6:1 a favor de los individuos sexuales. Este modelo de segregación del carácter propuesto para especies de Plicatula representa una novedad para híbridos interespecíficos del género. *P. guenoarum* GR19 es de origen autotetraploide, como *P. plicatulum* 4PT y ambas especies presentan en general una herencia de tipo tetrasómica, como lo evidencian los marcadores ADD de ambos genotipos que se ajustaron a la proporción 5:1. Por otra parte, algunos sectores de los genomas de ambos parentales presentarían herencia de tipo disómica (indicados por los marcadores 3:1 y las frecuentes asociaciones cromosómicas bivalentes). Ambas especies comparten el mismo complemento genómico básico. Diecisiete combinaciones de cebadores de AFLP fueron ensayadas en 89 individuos  $F_1$  (55 sexuales y 34 apomíticos) que conformaron la población de mapeo. El mapa marco de ligamiento genético del genotipo tetraploide sexual de *P. plicatulum* consistió en 89 marcadores [39 maternos (1:1) y 50 biparentales (3:1)] asignados a 11 grupos de cosegregación cubriendo una distancia total de 819 cM. El mapa marco de ligamiento genético de *P. guenoarum* tetraploide apomítico consistió en 127 marcadores [76 paternos (1:1 y 1:1,6) y 51 biparentales (3:1)], que se distribuyeron en 23 grupos de cosegregación. La distancia total cubierta fue de 1393 cM. En el mapa paterno se identificó el grupo de ligamiento que contiene al locus responsable de la apomixis (grupo apo, M10). El grupo apo M10 quedó conformado por 7 marcadores: el carácter apomixis, 5 marcadores paternos y un marcador biparental. Los marcadores paternos que mapearon en M10, así como la apomixis mostraron distorsión en la segregación, confirmando así la distorsión en la transmisión del carácter observada en la progenie  $F_1$  y de la región genómica asociada. A diferencia de lo observado para otras especies apospóricas de *Paspalum* y otras gramíneas apomíticas, hasta el momento, el análisis de ligamiento realizado en *P. guenoarum* no ha revelado marcadores completamente ligados a la apomixis. Los marcadores paternos que mapearon a menor distancia de dicho marcador genético lo hicieron a 4 cM y a 7 cM. El caso de Plicatula puede ser diferente a los descritos anteriormente y parece ser especial dentro del género. Posiblemente, si nos referimos a *P. guenoarum* estemos frente a un modelo distinto dentro de *Paspalum* para el estudio de la apomixis.

## ABSTRACT

Apomixis is a mode of asexual reproduction through seeds that originate progeny that is genetically identical to the mother plant. It is significant in the subfamily Panicoideae and genera *Paspalum* and its importance is given by the evolutionary connotations and its implications in breeding plant. *Paspalum* (Poaceae) is a genus comprising between 330 and 400 natural species of tropical, subtropical and temperate regions, mainly from North America and South America. Plicatula group of *Paspalum* comprises many promising species as forage resources and several of them are typical on natural fields of northeastern Argentina. Most apomictic species are tetraploid and usually possess sexual diploid co-specific counterparts. Sexual tetraploid plants have not been found in nature so far. The objectives of this research were: to generate a segregating population for the reproductive mode by crossing *Paspalum plicatulum* 4PT (completely sexual, experimentally induced) and *P. guenoarum* GR19 (natural apomictic) at tetraploid level, to construct genetic linkage maps of both species, to localize the region responsible for apomixis on the male map, to investigate the mode of inheritance (tetrasomic or disomic) of both parental genotypes. An interspecific hybrid population of 211 F<sub>1</sub> plants, segregating for reproductive mode, was generated. Classification of 206 hybrids showed that 127 of them were sexual and 79 apomictic. The progeny showed morphological characteristics intermediate compared to their parents but resembling more the male plant. Inheritance of apomixis in Plicatula species showed a segregation distortion of 1.6:1, favoring to sexual individuals. This proposed apomixis segregation model in Plicatula is a novelty for interspecific hybrids of *Paspalum*. *P. guenoarum* and *P. plicatulum* are autotetraploids and both species show tetrasomic inheritance, according to the DDA markers of both genotypes that fixed to the 5:1 ratio. Moreover, some regions of both parental genomes showed disomic inheritance (markers 3:1 and bivalent chromosome associations). Both species share the same basic genomic complement. Seventeen AFLP primer combinations were assayed in 89 F<sub>1</sub> individuals (55 sexual and 34 apomictic). The female genetic linkage frame map consisted of 89 markers [39 maternal (1:1) and 50 biparental (3:1)] assigned to 11 cosegregation groups, covering a distance of 819 cM. The genetic male linkage frame map was formed by 127 markers [76 paternal (1:1 and 1:1.6) and 51 biparental (3:1)], that were distributed in 23 cosegregation groups, spanning 1393 cM. The linkage group carrying apomixis (apo group, M10) was identified on the male map. Seven markers mapped onto the M10 linkage group: the character apomixis, 5 paternal markers and a biparental marker. Paternal markers that mapped onto M10 and apomixis showed segregation distortion, thus confirming the distorted transmission of the character and its associated genomic region. Unlike the data for other aposporic *Paspalum* species and other grasses, markers completely linked to apomixis have not been detected in *P. guenoarum*. Two paternal markers mapped to 4 and 7 cM from apomixis locus. Results presented in this work indicated that Plicatula species may be different cases from those previously described in the genus. Probably, *P. guenoarum* represents a new model for studying apomixis in *Paspalum*.

# INTRODUCCIÓN

## *La reproducción sexual*

Para definir la apomixis y sus rasgos distintivos, previamente resulta útil y necesario repasar brevemente las características del sistema de reproducción sexual de las angiospermas para luego comprender las del proceso reproductivo apomítico más correctamente.

La reproducción sexual en las Angiospermas involucra la alternancia cíclica de generaciones. La planta es la generación esporofítica ( $2n$ ) y en sus estructuras reproductivas especializadas, las flores, ocurre la meiosis que proporciona recombinación genética y reducción del número cromosómico, dando lugar a micrósporas (masculinas) y megásporas (femeninas) haploides ( $n$ ). Las megásporas se generan como producto del proceso de megasporogénesis que ocurre en una célula especializada del óvulo, la célula madre de las megásporas que se divide por meiosis dando cuatro células haploides (megásporas), tres de las cuales generalmente degeneran y la restante por mitosis da origen al megagametofito o saco embrionario que contiene a la ovocélula, dos sinérgidas, la célula central binucleada y tres antípodas. Por otro lado, la microsporogénesis da lugar a la formación de gametos masculinos a partir de células especializadas, las células madre de las micrósporas que se encuentran en los microsporangios en el interior de las anteras. La división meiótica de cada una de estas células madre origina cuatro micrósporas haploides que por mitosis origina a los granos de polen. Ambos tipos celulares, micrósporas y megáspora, sufren un número limitado de mitosis para formar el microgametofito (el polen o gametofito masculino) y el megagametofito (el saco embrionario o gametofito femenino, con la ovocélula, la célula central binucleada, dos sinérgidas y tres antípodas) que representan la fase haploide en la alternancia de generaciones. El microgametofito deposita dos células espermáticas haploides dentro del megagametofito a través de un tubo polínico que penetra el óvulo. Una célula espermática ( $n$ ) fertiliza la célula central binucleada ( $n + n$ ) y originan el endospermo ( $3n$ ); la otra célula espermática ( $n$ ) fertiliza a la ovocélula ( $n$ ) y forman el embrión ( $2n$ ) y así la doble fecundación, característica de las angiospermas, restaura el número cromosómico somático.

## *Apomixis*

La apomixis es un sistema por el cual ciertas especies se reproducen en forma asexual (agamospermia) a través de semillas, conduciendo a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler, 1984). Etimológicamente, apomixis deriva del griego *apo* que significa falta o ausencia y *mixis* que quiere decir mezcla o unión, lo cual hace referencia a que en este tipo de reproducción no ocurre la unión de gametos masculino y femenino para la formación del embrión. Este sistema de reproducción, no muy frecuente pero importante en la familia Poaceae, es especialmente significativo en géneros de la subfamilia Panicoideae, con distribución pantropical y subtropical, también descrito en géneros de Asteraceae, Rosaceae y Rutaceae. Es importante por sus connotaciones evolutivas y por sus implicancias en el mejoramiento genético.

Gregor Mendel fue el primero en experimentar, sin saberlo, con plantas apomícticas al utilizar cruces interespecíficas de *Hieracium* para intentar confirmar los resultados obtenidos en sus estudios de herencia en las arvejas de jardín. Como observó progenies F<sub>1</sub> segregantes y numerosas F<sub>2</sub> no segregantes, Mendel atribuyó ésto a una frecuente autopolinización, sin saber entonces que muchas especies del género *Hieracium* se reproducen por apomixis. La apomixis fue descrita por primera vez en la especie australiana *Alchornea ilicifolia* (J. Sm.) Muell. Arg. Un ejemplar femenino de esta especie que es dioica fue llevado a los jardines botánicos del Kew en Londres, floreció y produjo semillas en ausencia de un progenitor masculino, lo cual puso en evidencia el carácter (Savidan, 2000; Pessino y Ortiz, 2010).

Se considera que la apomixis evolucionó como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de desarrollo del ovario (Koltunow, 1993; Grimanelli et al., 2001; Grossniklaus, 2001).

## *Rasgos distintivos y tipos de apomixis*

La reproducción apomíctica resulta de ciertos desvíos, fallas o cambios en determinadas etapas de los procesos cito-embriológicos que son los que usualmente producen dos resultados fundamentales para la reproducción sexual: la reducción del número cromosómico y la recombinación génica a través de las meiosis, complementadas por la reunión al azar y fusión de gametos en el momento de la fecundación. En la apomixis, las modificaciones cito-embriológicas señaladas llevan, por un lado a anular la meiosis o sus

productos, y por otro a evitar o remplazar la fecundación mediante el desarrollo partenogenético (Quarin, 1992).

La apomixis puede ser clasificada en:

(I) *Embrionía adventicia* o *apomixis esporofítica*: el embrión se forma directamente, sin formación de saco embrionario, a partir de una célula somática del nucelo o de los tegumentos del óvulo; esta forma de apomixis es común en los cítricos.

(II) *Apomixis gametofítica*: da lugar a la formación de sacos embrionarios (o megagametofitos) no reducidos, ya que los núcleos que los conforman no han pasado por meiosis y por ello no han reducido su contenido de ADN (esta ausencia de meiosis es llamada también *apomeiosis*). Posteriormente, el embrión es originado por partenogénesis de la ovocélula, una de las células del saco embrionario no reducido. Según el origen de la célula que genera al gametofito femenino no reducido, la apomixis gametofítica se divide en:

a) *Diplosporia*: el saco embrionario no reducido se origina de la célula arquesporrial directamente por mitosis o indirectamente por un proceso meiótico modificado;

b) *Aposporia*: uno o más sacos embrionarios no reducidos o sacos embrionarios apospóricos (SEA) se originan por mitosis a partir de una o varias células somáticas del óvulo, usualmente de una perteneciente al nucelo. Éste es el tipo de apomixis más frecuente en las especies del género *Paspalum*.

Tanto para la diplosporia como para la aposporia, existen diferentes formas de desarrollo de los sacos embrionarios. A fines prácticos y dentro del marco de la presente tesis, se hará referencia solamente al tipo de saco embrionario apospórico típico de las especies apospóricas de *Paspalum*, limitándonos únicamente a mencionar los demás tipos de sacos existentes. Las formas de sacos diplospóricos más comunes son el tipo *Antennaria* y el tipo *Taraxacum* (Savidan, 2000). Por otra parte, en los SEA, según la disposición que tomen los dos núcleos producto de la primera mitosis de la megagametogénesis se pueden distinguir dos formas de desarrollo de los mismos: son monopolares, como el tipo *Panicum*, compuesto por cuatro núcleos y carente de antípodas (Warmke, 1954); o son bipolares, como el tipo *Hieracium*, con ocho núcleos distribuidos en siete células (Rosenberg, 1908; 1930). La aposporia es muy común en el género *Paspalum*. Los sacos embrionarios de muchas especies inician su desarrollo mediante una primera mitosis bipolar, pero también presentan similitudes con el tipo *Panicum*. A la madurez, los SEA se caracterizan por contener entre 4 y 5 núcleos, los cuales corresponden a la ovocélula, una o dos sinérgidas y

una gran célula central con dos núcleos polares (Norrman et al., 1989; Quarin y Burson, 1991).

La apomixis se caracteriza por cuatro procesos cito-embriológicos que la diferencian de la reproducción sexual:

(I) la *apomeiosis*: es una “atajo” en el camino normal de la meiosis, que ocurre tanto en la diplosporia como en la aposporia. En la apomixis apospórica la meiosis finaliza pero se produce la degeneración de las cuatro megásporas;

(II) la capacidad de células citológicamente no reducidas ( $2n$ ) para desarrollar sacos embrionarios; en individuos apomícticos apospóricos, los sacos embrionarios se desarrollan a partir del nucelo;

(III) la *partenogénesis*: es la formación del embrión directamente a partir de la ovocélula, sin fecundación de la misma;

(IV) la *seudogamia*: en muchas especies apomícticas, como en la mayoría de las gramíneas tropicales, es necesario que un gameto masculino se fusione con el o los núcleos polares de la célula central del saco embrionario para formar el endospermo. Es el proceso de la pseudogamia. Es decir que, en la apomixis gametofítica, la partenogénesis excluye uno de los procesos de la doble fecundación, la unión de gametos femeninos y masculinos. Sin embargo, aunque no necesariamente se anula la fecundación de los núcleos polares, en algunos casos el endospermo puede desarrollarse de forma autónoma (sin la unión de un gameto masculino con los núcleos polares) (Quarin, 1992).

Como resultado de la apomixis gametofítica, el esporofito y el megagametofito tienen el mismo nivel de ploidía. Por otra parte, si bien es un modo reproductivo específico del gametofito femenino y se considera que no afecta la formación del microgametofito y que la meiosis ocurre normalmente en las anteras de las plantas apomícticas (Nogler, 1984), existen algunas excepciones (Pichot et al., 2001) y también se ha observado en *Paspalum notatum* Flüggé (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004) y en *Erigeron annuus* (L.) Pers. (Noyes y Reiseberg, 2000) que la transferencia del carácter a través del polen se desvía significativamente de las proporciones mendelianas esperadas.

Por otra parte, aunque con frecuencia se habla de sexualidad y apomixis como sistemas alternativos, en muchas especies ambos sistemas reproductivos coexisten en una misma planta, pudiendo aparecer simultáneamente sacos embrionarios reducidos y no reducidos hasta en el mismo óvulo (Harlan et al., 1964). Es decir, el hecho de tener la

capacidad para la apomixis no quita que la reproducción pueda ocurrir también por la vía sexual. Una planta apomíctica es considerada como facultativa cuando puede producir una parte de su progenie por sexualidad. Las progenies de una planta facultativa pueden segregarse como clases maternas ( $2n + 0$ ) y como aberrantes o fuera de tipo, provenientes de reproducción sexual (Asker y Jerling, 1992). Entre los individuos aberrantes pueden originarse: 1) híbridos BII ( $n + n$ ) que resultan de la unión de dos gametos reducidos, 2) híbridos BIII ( $2n + n$ ) que se originan por fecundación de una ovocélula no reducida por un gameto masculino reducido y 3) haploides ( $n + 0$ ) generados por partenogénesis a partir de una ovocélula reducida y sin fecundación (Savidan, 2000). Una planta es considerada apomíctica obligada cuando el 100 % de sus progenies es de origen materno.

#### *Importancia agronómica de la apomixis*

Aunque la apomixis ha sido reportada en más de 400 especies de angiospermas, este modo reproductivo es característico de unas pocas especies relevantes para la agricultura, entre ellas, especies forrajeras (Spillane et al., 2001). Sin embargo, la apomixis es un carácter de gran interés para la agricultura, ya sea para el aprovechamiento de sus características en la producción a gran escala de alimentos para la población mundial como para incrementar la producción y mantener la calidad de especies de gramíneas forrajeras seleccionadas que sirven de alimento al ganado.

La clonación natural y consecutiva de un individuo a través de semillas hace que importantes grupos de investigación en el mundo focalizaran sus estudios en la apomixis. Por un lado, se han identificado los relativos apomícticos salvajes de algunos cultivos importantes de granos (Bashaw y Hanna, 1990), mientras que para cultivos principales como arroz, trigo, centeno y cebada no existen relativos apomícticos naturales que puedan ser cruzados con las formas sexuales cultivadas. Los esfuerzos para introducir el carácter, desde los relativos naturales a las variedades cultivadas, por medio de retrocruzamiento han sido infructuosos (revisado en Spillane et al., 2001). Un abordaje alternativo para la introgresión de la apomixis es la ingeniería del carácter a través de la biotecnología.

Los principales beneficios del aprovechamiento de la apomixis en plantas cultivadas, según se enuncia en la Declaración de Apomixis de Bellagio (Italia, 1998), son: la fijación del vigor híbrido en plantas cultivadas, supervivencia e inmediata fijación de recursos genéticos combinados, expansión del uso de recursos genéticos y reproducción a través de verdaderas

semillas de plantas que usualmente se propagan vegetativamente. Además, el mejoramiento genético vegetal empleando la tecnología de la apomixis sería rápido y respondería de manera específica a microambientes, limitaciones socioeconómicas y condiciones particulares de cultivo y de mercado. Los esquemas de mejoramiento apomíctico permitirían la inclusión a los mismos de germoplasma perteneciente a variedades adaptadas localmente (Spillane et al., 2004).

### *Mapeo genético*

#### *Mapas de ligamiento genético*

Un mapa genético establece de manera probabilística el arreglo lineal de un grupo de marcadores sobre el genoma de una especie.

Un mapa de ligamiento es un mapa genético de una especie o población experimental que muestra la posición relativa de genes conocidos o de marcadores moleculares, en términos de frecuencias de recombinación a lo largo de cada cromosoma. Es la representación gráfica lineal del orden más probable de los marcadores moleculares. Cada arreglo lineal es conocido como grupo de ligamiento (Russell, 2005; Griffiths et al., 2008).

Existe ligamiento genético cuando dos o más genes o marcadores moleculares se localizan juntos en un cromosoma y son heredados juntos en la meiosis, ya que a menor distancia existente entre ellos, menor es la probabilidad de que sean separados hacia diferentes cromátidas luego del entrecruzamiento o *crossing-over* que conlleva un intercambio de material genético entre cromosomas homólogos.

El ligamiento genético fue descubierto por William Bateson y Reginald Punnett en trabajos con aves y guisantes, luego del redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900. Pero el concepto fue mejor comprendido a partir de los trabajos de Thomas H. Morgan en *Drosophila melanogaster* Meigen, donde observó que ciertas mutaciones a veces aparecían juntas en las progenies en el cromosoma sexual, y otras veces no. Esto lo condujo a la idea de ligamiento genético y *crossing-over* (Russell, 2005; Griffiths et al., 2008).

El primer mapa genético fue generado por un estudiante de Morgan en 1913, Alfred Sturtevant, en *D. melanogaster* usando seis marcadores morfológicos (Sturtevant, 1913).

Un marcador genético es cualquier característica determinada genéticamente, heredable, que permite establecer diferencias (polimorfismos) entre individuos (genotipos) de la misma especie o especies emparentadas, cuya herencia responde a las leyes de

Mendel y que pueden utilizarse como puntos de referencia en el genoma (Brown, 2000). Los marcadores genéticos pueden ser de tres clases: I) morfológicos, son características fenotípicas visibles; II) bioquímicos, incluyen isoenzimas y proteínas de reserva y III) marcadores de ADN o moleculares, que son sitios de variación del ADN.

El advenimiento de las técnicas de biología molecular permitió superar las limitaciones impuestas por los marcadores morfológicos y bioquímicos al mapeo genético, mediante el uso de marcadores moleculares de ADN que permiten detectar polimorfismos directamente a nivel genómico. Así también, el avance de estas nuevas técnicas y metodologías permitió la construcción de mapas de ligamiento genético en un gran número de especies vegetales y animales. A su vez, estos mapas fueron el inicio de estudios genómicos en donde no sólo es posible describir la herencia y ubicación relativa un determinado carácter, sino que además es posible estudiar un gran número de loci simultáneamente y describir la estructura física de los genomas (Brown y Brown, 2004). Actualmente, es posible generar dos categorías de mapas genéticos: los mapas de ligamiento genético y los mapas físicos (Brown y Brown, 2004). En la presente tesis solamente se tratará sobre la construcción y utilización de los mapas de ligamiento genético.

#### *Marcadores moleculares empleados en la construcción de mapas de ligamiento genético*

Un marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación específica en el genoma, cuya herencia puede seguirse en los individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a una región génica o codificante, o a una región del genoma sin función conocida. Las técnicas de generación de marcadores moleculares se basan en la presencia de variaciones en la secuencia de ADN genómico y el marcador puede ser definido como un locus genómico, detectable con sondas o cebadores específicos que, en virtud de su presencia, revela de modo característico e inequívoco un segmento cromosómico con el cual se identifica a la región que lo circunda en el extremo 5' y 3' (Barcaccia et al., 2000). Entre las diferentes metodologías desarrolladas para la generación de marcadores moleculares se encuentran la de RFLP (polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción, restriction fragment length polymorphism) (Botstein et al., 1980) y VNTR (número variable de repeticiones en tándem, variable number of tandem repeats) (Jeffreys et al., 1988), basados en la hibridación de sondas oligonucleotídicas; las técnicas de RAPD (polimorfismos por la amplificación al azar del ADN, random amplification of polymorphic DNA) (Williams et al.,

1990) y AFLP (polimorfismo en el largo del fragmento de amplificación, amplified fragment length polymorphism) (Vos et al., 1995), basadas en amplificaciones por PCR, y SSR (polimorfismos en la amplificación de secuencias repetidas, conocidos también como microsatélites, simple sequence repeats o short tandem repeats –STR-) (Litt y Luty, 1989), donde la secuencia central del marcador coincide con aquella sonda utilizada para RFLP o VNTR.

#### *Marcadores AFLP*

Los marcadores elegidos para el trabajo de mapeo en esta tesis fueron los de AFLP. Esta técnica de obtención de marcadores moleculares combina la especificidad, la resolución y el poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, con la velocidad y la practicidad de la detección de los polimorfismos por medio de PCR. Desde su desarrollo, los AFLP han sido empleados tanto para la obtención de huellas dactilares de ADN o *fingerprinting*, para mapeo genético localizado mediante la estrategia de análisis de segregantes en grupo (bulked segregant analysis) (Michelmore et al., 1991) así como para la construcción de mapas genéticos especialmente en especies de plantas cultivadas que presentan baja tasa de polimorfismo de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Los marcadores de AFLP son muy eficientes para el mapeo ya que esta metodología permite generar un número alto de marcadores, típicamente unos 50 a 100 fragmentos de restricción son amplificados y detectados por electroforesis en geles de poliacrilamida (Vos et al., 1995). Tienen la ventaja de que no se necesita conocimiento previo de la secuencia del genoma a estudiar para su implementación y con una sola reacción de amplificación se evalúan varias regiones genómicas simultáneamente, por lo que son más efectivos en la cobertura y representación del genoma. La mayoría de los fragmentos de AFLP corresponden a posiciones únicas en el genoma y por lo tanto, pueden emplearse como hitos en mapas genéticos. La técnica permite la detección de fragmentos de restricción en muestras de ADN de cualquier complejidad y con cualquier trasfondo genético, incluyendo muestras de mezclas de ADN y segmentos de ADN clonados y mezclados. Los AFLP son marcadores de tipo dominante. Ésta es quizás su principal limitación, ya que proporcionan un bajo contenido de información genética por locus. Esto quiere decir que se detecta solamente un alelo, o sea, el fragmento que se amplifica. Las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como un alelo nulo y los datos que se toman tienen naturaleza binaria. Los

genomas heterocigotos no pueden discriminarse directamente de los homocigotos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

### *Bases teóricas para la construcción de mapas de ligamiento genético*

En los eucariotas, cada cromosoma está constituido por una molécula de ADN cuya longitud es constante dentro de la especie y variable entre los diferentes cromosomas del cariotipo de la misma. En promedio, un cromosoma tiene  $10^8$  pares de base (100 Mega pares de bases o Mpb) y múltiples sitios de inicio de la replicación (Kearsy y Pooni, 1996). Por lo tanto, los genes y los marcadores genéticos se localizan en una sola dimensión y en posiciones determinadas a lo largo de la molécula de ADN. El mapeo genético consiste en determinar la posición relativa de un determinado número de loci a lo largo del cromosoma (Kearsy y Pooni, 1996). El ordenamiento se basa en la estimación de la frecuencia de recombinación e intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis.

La presencia de un quiasma en un cromosoma en particular implica que ha ocurrido un intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, haciendo que en referencia a dos loci adyacentes, la mitad de los gametos de esa meiosis sean de tipo recombinante y la otra mitad de tipo parental. Por convención, un cromosoma que presenta un solo quiasma tiene en promedio una longitud de 50 centiMorgans (cM), unidad de mapeo establecida en honor a T. H. Morgan (Kearsy y Pooni, 1996).

Brevemente, el primer paso en un programa de mapeo genético es la elección de los progenitores de la futura población de mapeo, tratando de maximizar la probabilidad de detectar polimorfismos a nivel de ADN. Luego, la población segregante obtenida debe estar compuesta por un número tal de individuos que posibilite contar con una muestra suficientemente grande de eventos meióticos, observables en la progenie pero que ocurrieron en los padres. A partir de esta muestra se estimará la frecuencia de recombinación entre los marcadores moleculares obtenidos.

Un mapa de ligamiento genético se construye entonces examinando las frecuencias de recombinación de determinados loci en las progenes de un cruzamiento y estableciendo las posiciones relativas de los mismos en los cromosomas. Dos genes muy cercanos en el mismo cromosoma no segregarán independiente durante la meiosis ya que la corta distancia física que los separa reduce la probabilidad de que ocurra un entrecruzamiento entre ellos. Esta

relación se denomina ligamiento y explica la aparición de combinaciones genéticas parentales en mayor frecuencia de lo esperado según la segunda Ley de Mendel o ley de la segregación independiente. Cuando dos loci son separados por un entrecruzamiento durante la meiosis, la recombinación que ocurrió entre ellos se identifica por la presencia de gametos que contienen los loci recombinados y esos gametos a su vez, se reconocen por los fenotipos/genotipos de las progenies. La frecuencia de estos gametos es una estimación de la frecuencia de recombinación entre ambos loci (Suzuki et al., 1996; Kearsy y Pooni, 1996).

La población segregante de mapeo debe ser caracterizada genéticamente para un número suficiente de marcadores moleculares, los que fueron seleccionados por ser polimórficos entre los genotipos parentales (presentes en uno y ausentes en el otro, y viceversa). Posteriormente, a cada marcador se le aplica una primera prueba estadística con el objetivo de testear la hipótesis nula de segregación de acuerdo con las proporciones esperadas (1:1, 3:1, 5:1, u otras). A partir de aquí, los marcadores que segregan en las proporciones esperadas, 1:1 en nuestro caso, son sometidos de a pares a una prueba para la detección de ligamiento genético. Esta es la tarea que realizan los programas específicos de mapeo genético, como JoinMap (Stam, 1993; van Ooijen y Voorrips, 2001) y Mapmaker (Lander et al., 1987). Los grupos formados por marcadores que no segregan independientemente se denominan “grupos de ligamiento”.

El próximo paso en el mapeo genético es la estimación de la distancia en unidades de recombinación entre dos marcadores, que no es una distancia física sino que refleja la frecuencia de recombinación entre ellos. Diversos métodos permiten estimar este parámetro expresado en porcentaje de recombinación o en cM, a través de la transformación de los valores de recombinación por diferentes funciones de mapeo. Se define como unidad de mapeo a la distancia entre dos loci o marcadores para los cuales se observa un recombinante cada cien productos de la meiosis, equivalente a una frecuencia de recombinación  $r = 1\%$ . Si dos loci están lo suficientemente cerca como para que sólo ocurra un entrecruzamiento entre ellos, la frecuencia de recombinación ( $r$ ) será igual a la distancia en cM. Es decir, una unidad de cM equivale aproximadamente a un 1 % de recombinación cuando los marcadores están muy próximos, o puede diferir del porcentaje de recombinación cuando están más distantes (Haldane, 1919). Así, cuando la distancia entre los marcadores es tal que se pueden formar dos o más quiasmas entre ellos, las distancias relativas se distorsionan y no puede emplearse directamente el porcentaje de

recombinación para estimar posiciones relativas ya que la estimativa de la proporción de genotipos recombinantes en relación con los parentales, se ve influenciada. Es posible demostrar que la frecuencia de recombinación en estos casos puede resultar también en promedio 50% (Russel, 1996). Ésto indica que si bien la distancia de mapeo aumenta linealmente con el número de quiasmas, la frecuencia de recombinación alcanza un máximo (50%). Para contemplar estos problemas se diseñaron funciones de mapeo que corrigen los valores de recombinación observados por la probabilidad de que existan quiasmas múltiples, siendo las funciones más comunes la de Haldane (1919) y la de Kosambi (1944). Ambas, permiten transformar los valores de la frecuencia de recombinación ( $r$ ) a valores de distancia de mapeo en cM ( $R$ ), lo cual hace que las distancias genéticas en unidades de mapeo sean magnitudes aditivas.

Una vez agrupados los marcadores en los distintos grupos de ligamiento y tomadas las distancias genéticas dos a dos, el mapa puede ser construido mediante el procedimiento clásico de la prueba de tres puntos. Actualmente, los programas de mapeo utilizan métodos más sofisticados y rápidos para este paso en el que los marcadores deben ser ordenados, en el orden más probable. Estos métodos utilizan estimaciones de máxima similitud de la frecuencia de recombinación entre marcadores y algoritmos de ordenación rápida de gran número de marcadores.

#### *Construcción de mapas de ligamiento con marcadores de ADN*

En el análisis de ligamiento con marcadores de ADN, la determinación del orden de marcadores ligados se basa en el método de máxima similitud, es decir el orden de marcadores que abarca la menor distancia y requiere la menor cantidad de entrecruzamientos entre marcadores (Mather, 1957). Actualmente, existen programas de computación que permiten el análisis simultáneo de muchos marcadores en un gran número de individuos: identifican grupos de cosegregación, estiman las frecuencias de recombinación entre los marcadores ligados, asignan el mejor orden y estiman las distancias (cM) de los marcadores que componen un grupo. Entre ellos, los más citados en la literatura son: Mapmaker (Lander et al., 1987) y Joinmap (Stam, 1993; van Ooijen y Voorrips, 2001). Los cálculos probabilísticos que emplean estos programas tienen la misma lógica que las funciones de mapeo en pruebas de dos o tres puntos clásicas, pero son más poderosos porque al tratarse de una prueba multipunto permiten minimizar los errores debidos a

dobles entrecruzamientos e interferencias. Los algoritmos matemáticos para detectar ligamiento entre dos loci se basan en el LOD score (Mapmaker) o en el método de los mínimos cuadrados (JoinMap). El LOD score se define como el logaritmo en base diez del cociente entre la probabilidad de que dos loci estén ligados para un valor dado de recombinación, sobre la probabilidad de que ambos loci no estén ligados y hayan co-segregado por azar. Por ejemplo, un LOD score = 3.0 para un par de marcadores indica que es 1000 veces más probable que los marcadores estén ligados a que no lo estén (Lincoln et al., 1993).

Idealmente, en un individuo diploide el número de grupos de ligamiento en el mapa debería ser igual al número haploide de cromosomas ( $n$ ) pero es posible que marcadores que corresponden al mismo cromosoma aparezcan en grupos de ligamiento separados por no haberse detectado loci intermedios. Es posible lograr una cobertura del genoma más completa a medida que se incorporan más marcadores.

Es interesante describir las distancias entre marcadores de un mapa genético no sólo en unidades de mapeo (cM) sino por su distancia física real en pares de bases (pb). La unidad de mapa genético varía en número de nucleótidos según la especie, el cromosoma y la localización en el cromosoma. Aproximadamente, 1 cM equivale a 1 Mpb (1 millón de pares de bases) en humanos y a 750 kpb en plantas superiores (Lincoln et al., 1993).

#### *Poliploidía: Conceptos generales, autopoliploides y alopoliploides.*

Un individuo es considerado diploide cuando su dotación normal de cromosomas autosómicos está compuesta por dos juegos idénticos de  $x$  cromosomas cada uno, de forma que estos  $x$  cromosomas son todos diferentes entre sí dentro de cada uno de los juegos, y no pueden reagruparse en grupos inferiores. El genomio es el conjunto de  $x$  cromosomas y número básico es el número de cromosomas que lo conforman, es decir,  $x$ . Por extensión, el número cromosómico de un individuo diploide es  $2x$  (Lacadena, 1996).

Un individuo poliploide es aquél cuya dotación autosómica normal está compuesta por más de dos genomios o juegos completos de cromosomas (Lacadena, 1996). A los individuos poliploides se los denomina tri, tetra,  $n$ -ploides de acuerdo con el número de  $x$  genomios que presenten sus células somáticas. Los números cromosómicos serán entonces  $3x$ ,  $4x$ ,  $nx$ . Se sabe que son varios los mecanismos citológicos que inducen la poliploidía en plantas (Ramsey y Schemske, 1998): la duplicación somática en meristemas de esporofitos jóvenes o

adultos, que produce quimeras mixoploides; la duplicación somática en tejidos no meristemáticos; la duplicación somática en el cigoto o en el embrión joven genera esporofitos completamente poliploides, fenómeno descrito en experimentos de shock térmico donde embriones jóvenes son expuestos brevemente a altas temperaturas (Ramsey y Schemske, 1998), o en experimentos donde los embriones son expuestos a un agente químico como la colchicina; la no reducción gamética o restitución nuclear meiótica durante los procesos de micro y megasporogénesis, proceso que genera gametas  $2n$  no reducidas que contienen el conjunto completo de cromosomas somáticos y pueden dar origen a embriones poliploides; la polispermia (Ramsey y Schemske, 1998).

Según el origen de los genomas que los componen, los poliploides pueden ser de tipo:

a) Autopoliploide: los genomas componentes provienen de la misma especie (son homólogos) (Lacadena, 1996). Es un poliploide originado del cruzamiento dentro o entre poblaciones de la misma especie (Ramsey y Schemske, 1998).

Se denomina cromosomas homólogos a los cromosomas de un autopoliploide que pertenecen a diferentes genomas y que se aparean durante la meiosis, debido a la complementariedad de bases que poseen a nivel del ADN. En plantas, la duplicación somática puede tener lugar en el cigoto o en embriones jóvenes. Los autopoliploides pueden tener un origen natural o inducido experimentalmente.

b) Aloploiploide: son poliploides que derivan de híbridos entre especies y los genomas que componen a estos poliploides provienen, por lo tanto, de dos o más especies diploides diferentes (Ramsey y Schemske, 1998). Se pueden originar por duplicación cromosómica de híbridos interespecíficos o intergenéricos, o por autopoliploidización y posterior cruzamiento de los autopoliploides de especies diferentes. Se denomina homeólogos a los cromosomas de los diferentes genomas que se originaron a partir de un cromosoma ancestral común (Lacadena, 1988).

El comportamiento de los cromosomas en meiosis comúnmente difiere entre los autopoliploides y los aloploiploides. Asimismo, este comportamiento influye en su fertilidad.

La constitución genética de los gametos producidos por un autopoliploide dependerá de la formación de multivalentes meióticos y de la posterior segregación en anafase I, de manera que las segregaciones fenotípicas y genotípicas serán diferentes de las mendelianas típicas de los organismos diploides: este comportamiento genético característico de los autopolloides se denomina herencia polisómica, y herencia tetrasómica en el caso de un

autotetraploide (Lacadena, 1988). En este último caso, los cromosomas homólogos se encuentran por cuadruplicado y dadas las homologías entre ellos, más de dos cromosomas pueden aparearse en las mismas zonas y originar diferentes configuraciones multivalentes durante la profase I. Cuando se forman configuraciones de cromosomas en bivalentes, el cromosoma elegido suele ser cualquiera de los homólogos al azar, de manera que en cada meiosis existe la misma probabilidad de que se apareen como bivalentes cualquiera de los homólogos. La segregación de los cromosomas en un autotetraploide es función de factores como el 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). Por otra parte, a largo plazo luego de la constitución de un autopoliploide, se observan a veces sectores del genoma que tienden a presentar apareamiento preferencial, fenómeno en el que los homólogos se aparean como bivalentes siempre con los mismos cromosomas.

En el caso de los alopoliploides, el comportamiento cromosómico meiótico depende del grado de homología que exhiban los genomas de las especies que originaron el alopoliploide. En un alopoliploide durante la meiosis se formarán bivalentes entre cromosomas homólogos, dando lugar a una segregación genética igual a la de los diploides, lo que se conoce como herencia disómica (Lacadena, 1988).

Entre los extremos representados por los autopoliploides y los alopoliploides obligados existe una gran gama de situaciones en las que puede observarse una combinación de herencia de tipo disómica o polisómica, según el grado de homología y/o diferenciación en los genomas que haya alcanzado la especie en particular (Lacadena, 1988).

### *Mapeo genético en poliploides*

Si bien los métodos estadísticos para la construcción de mapas de ligamiento genético fueron pensados para especies diploides como tomate, maíz y arroz, muchas especies cultivadas de importancia agronómica son poliploides.

El mapeo en especies poliploides es mucho más complejo que para las diploides por varias razones: a) hay un número mayor de genotipos segregantes esperados; b) puede ocurrir co-migración de fragmentos que tengan similar peso molecular y distinta secuencia; c) la constitución genómica, es decir, el origen autopoliploide o alopoliploide, de muchas especies no es conocida, haciendo difícil determinar los patrones de herencia; d) la

caracterización fenotípica es complicada debido a la presencia de fragmentos múltiples (Sorrels, 1992; Wu et al., 1992).

Una estrategia para simplificar el mapeo en poliploides es analizar la segregación de los marcadores por presencia:ausencia en la población. Un fragmento que está presente en dosis simple en uno de los parentales y que por lo tanto segrega en una relación 1:1 (presencia:ausencia) en los gametos de este individuo se denomina alelo en dosis simple (ADS). Un ADS en un autopoliploide es equivalente a un simplexo (Aaaa, en caso de tetraploidía) o a un locus heterocigota en uno de los juegos diploides en un alopoliploide. En ambos casos la relación de segregación del ADS en un cruzamiento Aaaa x aaaa es 1:1 (Aaaa:aaaa) (Wu et al., 1992). De esta forma es posible identificar exactamente el genotipo, para ese determinado locus en cada individuo de la progenie.

El primer paso en la construcción de un mapa genético usando este método es determinar la dosis de cada marcador en base a la relación de segregación, por medio de la prueba de Chi cuadrado. Posteriormente, los marcadores en dosis simple se ordenan formando grupos de ligamiento en fase de acoplamiento (grupos de cosegregación). Por definición, dos o más marcadores están ligados en fase de acoplamiento o en *cis*, cuando se encuentran en el mismo cromosoma; por otra parte, dos o más marcadores están ligados en fase de repulsión o en *trans*, cuando se localizan en cromosomas homólogos.

Como se mencionó anteriormente, las especies autopoliploides presentan herencia polisómica, es decir que dentro de cada grupo de cromosomas homólogos, éstos se aparean al azar durante la meiosis. Por otro lado, los alopoliploides presentan herencia disómica y la genética es similar a la de los diploides, excepto por los múltiples genomas.

La estimación del ligamiento tanto en un auto como en un alopoliploide, entre dos ADS en fase de acoplamiento es idéntica que para un diploide. En cambio, si los ADS están en fase de repulsión, la estimación del ligamiento será igual que para los diploides sólo si el poliploide muestra herencia disómica (alopoliploides). En caso de herencia polisómica (autopoliploides) los ligamientos en fase de repulsión son muy difíciles de detectar ya que la chance de apareamiento entre los cromosomas homólogos que llevan los loci ligados en fase de repulsión será  $1/(h-1)$  ( $h$  = número de homólogos en el grupo), resultando en una menor probabilidad de que se produzca recombinación entre ellos (Wu et al., 1992).

### *Aplicaciones prácticas de la construcción de mapas de ligamiento genético en vegetales*

Tradicionalmente, el mejoramiento genético practicado en especies vegetales estuvo basado en el análisis y selección de los fenotipos sobresalientes. Actualmente, la tendencia en el mejoramiento genético de plantas es la combinación de las técnicas clásicas con las más modernas de la biología molecular y la biotecnología. Es así que la tecnología de los marcadores moleculares comenzó a contribuir al conocimiento básico de los cultivos y de los caracteres agronómicos y productivos de interés (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

En un sentido amplio, el mejoramiento genético vegetal en especies apomícticas, por medio de cruzamientos, puede involucrar la creación de una gran población híbrida como material fundacional (Hanna, 1995; Pessino y Ortiz, 2010).

La estrategia del uso de marcadores moleculares requiere de conocimientos básicos sobre la naturaleza del carácter estudiado. Los estudios primarios concernientes al adecuado conocimiento del modo reproductivo del material vegetal disponible y a la comprensión de las bases genéticas de la herencia de la apomixis son indispensables para proponer un programa de mejoramiento mediante cruzamientos en especies forrajeras apomícticas, como objetivo principal. Entender las bases del control genético y de la herencia de la apomixis que ocurre naturalmente en diferentes taxa, resulta un requisito previo vital para explotar su potencial y tener éxito al intentar expresarla en plantas domesticadas que se reproducen sexualmente (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Por otro lado, el desarrollo de mapas de ligamiento genético de especies tetraploides puede también ofrecer una valiosa herramienta a ser utilizada en estudios genéticos básicos de la apomixis, así como en programas de mejoramiento de los ecotipos tetraploides cultivados.

Sin embargo, el primer requerimiento de cualquier estudio genético primario del carácter apomixis es la posibilidad de realizar cruzamientos entre una planta tetraploide completamente sexual y una planta tetraploide apomíctica, a fin de generar una población segregante  $F_1$  para el modo reproductivo (Pessino y Ortiz, 2010).

Un mapa de ligamiento genético representa un marco genético para estudios básicos y aplicados de la especie de interés. Dentro de este marco es posible, mediante marcadores moleculares, identificar genotipos, identificar marcadores ligados a caracteres de interés complejos y localizarlos en grupos de ligamiento, llevar a cabo selección asistida por marcadores, hasta la clonación de genes que puedan ser empleados en el mejoramiento mediante transformación genética. Además, la construcción de un mapa genético

proporciona gran cantidad de información sobre la estructura y organización del genoma en estudio, como por ejemplo patrones de distorsión de la segregación mendeliana de segmentos cromosómicos, la presencia de alteraciones estructurales como inversiones o translocaciones y también ofrece la posibilidad de comparar la estructura genética de distintas especies, en base a la homología genómica y la conservación de la distancia y el orden de los marcadores moleculares en los grupos de ligamiento.

### *El género Paspalum*

*Paspalum* es un género de la familia *Poaceae* (subfamilia *Panicoideae*, tribu *Paniceae*) que comprende entre 330 y 400 especies, las cuales crecen naturalmente en regiones tropicales, subtropicales y templadas de América del Norte y América del Sur, con unas pocas especies nativas de África, Asia y Oceanía y con sólo tres o cuatro especies cosmopolitas. América del Sur es el centro de origen del género (Chase, 1929; 1939; Nicora y Rúngulo de Agrasar, 1987; Judziewicz, 1990; Zuloaga y Morrone, 2005), mientras que los centros de diversidad se encuentran en los cerrados de Brasil y en los campos de Argentina y Uruguay (Zuloaga y Morrone, 2005).

Los datos obtenidos hasta el momento han contribuido al conocimiento del sistema genético de especies del género *Paspalum*. Los niveles de ploidía, el comportamiento de los cromosomas en meiosis y el modo reproductivo fueron determinados para 72 especies (Ortiz et al., 2012). De ellas, el 25 % es diploide y el 75 % es poliploide, con una variación desde 3x (Quarin y Lombardo, 1996) a 16x (Burton, 1940). El nivel de ploidía más común es el tetraploide. El número cromosómico básico más frecuente en *Paspalum* es  $x = 10$  (Quarin, 1992). Como excepciones, han sido reportados  $x = 6$  para *P. alium* Chase (Quarin, 1974),  $x = 9$  para *P. contractum* Pilg. (Davidse y Pohl, 1974) y  $x = 16$  para *P. convexum* Humb. & Bonpl. ex Flügge y *P. stellatum* Humb. & Bonpl. ex Flügge (Selva, 1976; Killeen, 1990; Honfi et al., 1990).

Las especies de *Paspalum* presentan diferentes estrategias reproductivas, con representantes que son principalmente sexuales y alógamos debido a la autoincompatibilidad, y representantes que se reproducen por apomixis, sonseudógamos y autofértiles (Quarin, 1992; Bashaw et al., 1970). Las especies diploides son de reproducción sexual mientras que las especies poliploides se reproducen por apomixis y/o sexualidad. Es probable que los distintos sistemas reproductivos así como los diferentes niveles de ploidía

que se observan entre las especies del género estén relacionados a la diversidad ecológica de los taxones de *Paspalum*. Muchas de estas especies se caracterizan por presentar citotipos diploides de reproducción sexual y una contrapartida coespecífica tetraploide y apomíctica (Quarin, 1992). Se postula que la mayoría de las especies apomícticas de *Paspalum* se originó por autoploidía a partir de ancestros diploides sexuales. Morfológicamente, estos citotipos diploides son semejantes a su respectiva contraparte tetraploide (Norrman et al., 1989; Quarin, 1992). La autoploidía fue confirmada en *Paspalum simplex* Morong. (Pupilli et al., 1997), y en *P. notatum* (Stein et al., 2004) en base a la herencia tetrasómica de marcadores moleculares. Sin embargo, el género también presenta algunos ejemplos indiscutidos de especies apomícticas aloploidias, de origen híbrido, como lo es *P. dilatatum* Poir. (Bashaw y Holt, 1958; Bashaw y Forbes, 1958).

Estudios básicos en *Paspalum* relacionados al sistema genético, hibridaciones, análisis de poblaciones y en los últimos años, la aplicación de técnicas de biología molecular permitieron la obtención de mapas de ligamiento genético, identificación de la región genómica de la apomixis y de marcadores ligados al carácter apomixis, obtención de marcadores SCAR relacionados al carácter y su aplicación en selección asistida, estudios de transcriptómica, clonado y secuenciación de clones de BACs. Todo ello convierte al género *Paspalum* en un modelo para los estudios relacionados con el aislamiento de genes ligados a la apomixis del tipo apospórica (Ortiz et al., 2001; Pessino et al., 2001; Lombarda et al., 2002; Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004, 2007; Pupilli et al., 2004; Calderini et al., 2006; 2011; Laspina et al., 2008; Polegri et al., 2010; Rebozzio et al., 2012).

Numerosas especies de *Paspalum* son componentes de las praderas naturales del este de Bolivia, Paraguay, centro y sur de Brasil, norte de Argentina y Uruguay (Zuloaga y Morrone, 2005). Muchas de ellas son valoradas por su calidad como forrajeras, su palatabilidad y su producción de materia seca. Sin embargo, sólo unas pocas han sido seleccionadas de la naturaleza, domesticadas y llevadas a cultivo. *Paspalum notatum* y *P. dilatatum* son económicamente las más importantes y ampliamente empleadas como forrajeras, principalmente en el Sur de los EE.UU. Otras, son cultivadas como cereal, césped u ornamentales (Giussani et al., 2009).

*Estudios previos en relación al carácter apomixis en el género Paspalum: herencia y mapas de ligamiento genético.*

#### *Herencia del carácter apomixis en especies de Paspalum*

Nogler (1984) propuso que los determinantes básicos de la apomixis se habrían originado por mutación y que la mayoría de los otros genes involucrados en el proceso serían probablemente similares a aquellos implicados en la sexualidad. En el género *Paspalum*, los estudios genéticos sobre herencia de la apomixis se han realizado principalmente en *P. notatum* y en *P. simplex*. Burton y Forbes (1960) realizaron un test de progenie para características morfológicas en una población segregante de *P. notatum* y propusieron que el carácter apomixis estaba controlado por unos pocos genes recesivos. Más tarde, Martínez et al. (1999) investigaron la segregación del modo reproductivo en la progenie  $F_1$  del cruzamiento interespecífico entre una planta tetraploide sexual autoincompatible de *P. ionanthum* Chase y un genotipo apomítico facultativo de *P. cromyorrhizon* Trin. La proporción de segregación observada fue de 3:1 para plantas apomíticas vs. plantas sexuales. Entonces, dos modelos fueron propuestos para explicar el control genético del carácter: 1) la aposporia estaba controlada por un gen mendeliano recesivo con herencia tetrasómica que requiere al menos de dos dosis junto a una única copia del alelo salvaje (dominante) para manifestarse; 2) la aposporia estaba controlada por un factor dominante con herencia tetrasómica asociado a letalidad gamética (Martínez et al., 1999). Sin embargo, estos dos modelos no pudieron ser comprobados debido a la esterilidad masculina de la mayoría de los híbridos de la  $F_1$  estudiada lo que no permitió obtener poblaciones  $F_2$  y tampoco realizar retrocruzas. Sin embargo, estudios más recientes de la herencia de la apomixis en *P. notatum*, que fueron realizados en esta especie al cruzar una planta tetraploide completamente sexual de origen experimental (Q4188) con una apomítica natural como parental masculino (Q4117) (Martínez et al., 2001) y analizando asimismo las progenies  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruzas, mostraron proporciones de segregación de 1:2,8 a 1:3 apomíticas vs. sexuales. Estos experimentos indicaron que la apomixis es efectivamente un carácter dominante, pero al mismo tiempo el modelo fue modificado: se trata de un alelo simple dominante con herencia tetrasómica, con una notable distorsión en el patrón de segregación en contra de la apomixis. Esto sugiere que el control podría tener relación con algún efecto letal pleiotrópico con penetrancia incompleta (Martínez et al., 2001). El exceso de progenie sexual causaba la desviación de las proporciones mendelianas

observadas respecto a las esperadas 1:1 o 13:15 (si se asume segregación al azar cromosómica o cromatídica), lo que fue atribuido a un alelo dominante letal pleiotrópico con penetrancia incompleta o a letalidad parcial de factores ligados al locus de la aposporia. Posteriormente, el estudio de la segregación del carácter en otra población  $F_1$  de los mismos parentales mostró una distorsión aún mayor de las proporciones observadas (Stein et al., 2004), indicando que la penetrancia del efecto letal puede variar. Por otra parte, se observaron otras proporciones distorsionadas en la especie: 1:4 apomícticos vs. sexuales (Acuña et al., 2009) y 1:4,6 apomícticos vs. sexuales (Acuña et al., 2011).

En el caso de *Paspalum simplex*, se observó una segregación de 1:1,6 entre individuos apomícticos vs. sexuales en una población tetraploide derivada de la retrocruza entre un híbrido  $F_1$  apomíctico y su parental femenino tetraploide sexual experimental. Esta proporción concuerda con el modelo de herencia tetrasómica y segregación cromatídica en el que la apomixis es controlada por un alelo simple dominante, ligado o no a un alelo letal recesivo (Pupilli et al., 2001). Otras proporciones de segregación distorsionadas siempre a favor de la sexualidad se observaron en cruzamientos interespecíficos entre *P. simplex* y *P. malacophyllum* Trin. (Pupilli et al., 2004) o *P. procurrans* Quarin (Hojsgaard et al., 2011).

Este modelo coincide parcialmente con otros postulados previamente en especies de gramíneas apomícticas tales como Guinea grass [*Megathyrsus maximus* (Jacq.) B. K. Simon & S. W. L. Jacobs] (Savidan, 1975) o en especies de *Brachiaria* (Valle y Glenke, 1993); es el de un gen simple o alelo en dosis simple dominante con herencia tetrasómica. Es decir, si este modelo se aplicara en *Paspalum notatum*, la apomixis sería dominante sobre la sexualidad, en base a la proporción de segregación 1:1 (apomícticos vs. sexuales) en las progenies de una planta experimental autotetraploide sexual cruzada por una planta tetraploide apomíctica natural. La constitución genética de dicho locus para el progenitor sexual y para el apomíctico sería nuliplexo (aaaa) y simplexo (Aaaa), respectivamente. En estas condiciones, la relación de segregación esperada para un carácter en la progenie  $F_1$  sería de 1:1 (apomícticos vs. sexuales).

La hipótesis más común para explicar la baja transmisión de la apomixis en poblaciones segregantes es la presencia de un alelo letal ligado al carácter apomixis, que actúa a nivel gametofítico o esporofítico. Nogler (1982) postuló la existencia de un factor apospórico dominante que actúa como factor letal recesivo. Este factor apospórico no se transmitiría a través de gametos monoploides, lo que explicaría la ausencia de plantas apomícticas a nivel

diploide. Esta hipótesis fue parcialmente confirmada mediante cruzamientos interespecíficos entre *P. notatum* y *P. simplex* (Martínez et al., 2007).

#### *Mapas de ligamiento genético, mapeo comparativo y marcadores moleculares ligados a la apomixis en especies de Paspalum*

El primer mapa de ligamiento genético en el género *Paspalum* fue desarrollado por Ortiz et al. (2001) para citotipos diploides ( $2n = 2x = 20$ ) de *P. notatum* (Pensacola Bahiagrass). Este mapa marco se basó en marcadores moleculares de RFLP, AFLP y RADP. El mapa de la especie contiene 10 grupos de ligamiento y se extiende en una longitud de 991 cM. Distintas regiones del mapa presentaron sintenia con los mapas de maíz y de arroz. Pese a tratarse de una especie diploide de reproducción sexual, fue posible localizar marcadores en tres grupos de ligamiento distintos que habían sido reportados como ligados al carácter apomixis en especies de gramíneas relacionadas (Ortiz et al., 2001).

Posteriormente, Stein et al. (2007) desarrollaron el mapa de ligamiento genético de *P. notatum* a nivel tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ). El mapa obtenido fue un mapa marco que significó la base para la generación de un mapa de mayor saturación en trabajos posteriores, algunos aún en curso actualmente. Con la construcción de este mapa tetraploide se identificó el grupo de ligamiento asociado con la apomixis en la especie, llamado P17a, se caracterizó el modo de herencia tetrasómica de las razas tetraploides de la especie y la organización de su genoma (Stein et al., 2004; 2007). Para su obtención, se generó una población segregante  $F_1$  a partir del cruzamiento entre un genotipo tetraploide sexual de origen experimental y una planta tetraploide apomíctica natural como progenitor masculino. De cuarenta grupos de acoplamiento esperados para cada mapa, se obtuvieron 26 grupos de ligamiento con una longitud total de 1815 cM para el genotipo materno y 39 grupos y 2708 cM totales para el genotipo paterno (Stein et al., 2007). El grupo de ligamiento P17a es el que contiene la región genómica que controla la apomixis y se encuentra en el progenitor masculino, apomíctico. Este grupo mostró un número de marcadores que mapearon completamente ligados entre sí al locus del carácter apomixis, con valores de recombinación de entre 1,5 % y 5,5 %, lo que indica una fuerte supresión de la recombinación en esta región, así como apareamiento preferencial de los cromosomas, evidenciado por la identificación de ligamientos en repulsión menores al 33,3 % (Stein et al., 2004). La longitud de este segmento cromosómico sería de aproximadamente 36 Mpb. De manera similar, en

*P. simplex* el locus que controla la apomixis es definido genéticamente como un alelo simple dominante caracterizado por una fuerte represión de la recombinación (Pupilli et al., 2001).

Tanto en *P. notatum* como en *P. simplex* y en *P. malacophyllum* se han detectado marcadores moleculares ligados al carácter apomixis. Usando sondas heterólogas (provenientes de arroz) Pupilli et al. (2001) hallaron en *P. simplex* un grupo de marcadores localizados en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 12 de arroz que cosegregan estrictamente con el carácter. Lombarda et al. (2002) determinaron que un grupo de marcadores de AFLP homólogos también cosegrega estrictamente con la apomixis en *P. simplex*. El mapeo comparativo mostró que el locus que controla la apomixis en *P. simplex* está casi completamente conservado en *P. malacophyllum*, una especie perteneciente al mismo grupo, mientras que en *P. notatum*, especie lejanamente emparentada, la conservación de la sintenia es sólo parcial. La sintenia observada fue marcadamente fuerte al comparar este locus tanto de *P. simplex* como de *P. malacophyllum* con un segmento del cromosoma 12 de arroz (Pupilli et al., 2004). De mismo modo, en *P. notatum* la región que contiene el locus de la apomixis mostró sintenia con este segmento del cromosoma 12 y además, con un segmento del cromosoma 2 de arroz (Pupilli et al., 2004; Podio et al., 2012). Finalmente, diversos marcadores de RAPD, AFLP y RFLP completamente ligados al locus de la aposporia fueron detectados en *P. notatum* (Stein et al., 2004; Pupilli et al., 2004; Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007). La sintenia del segmento que porta el locus de la apomixis con segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz, así como de los cromosomas 3 y 5 de maíz, fue confirmada por información obtenida a nivel de secuencia del ADN (Calderini et al., 2006; Podio et al., 2012). Estos marcadores definen un área de represión de la recombinación en un cromosoma con apareamiento cromosómico preferencial con uno de los tres homólogos (Stein et al., 2004). Varios marcadores de AFLP y dos marcadores SCAR ligados al carácter en *P. notatum* estuvieron presentes en un grupo de plantas apomícticas de diversos orígenes geográficos, lo que sugiere que la estructura del segmento cromosómico que porta el carácter aposporia está altamente conservada en las razas apomícticas de la especie (Rebozzio et al., 2012).

Recientemente, la región genómica ligada a la apomixis en *P. simplex* fue aislada parcialmente (Calderini et al., 2011), mediante técnicas de mapeo físico. Además, un pequeño grupo de marcadores que cosegrega con la apomixis fue identificado, mediante

análisis de mapeo comparativo, en *P. simplex*, *P. malacophyllum*, *P. notatum* y *P. procurrens* (Hojsgaard et al., 2011).

### *El grupo Plicatula de Paspalum*

#### *Generalidades y especies que conforman el grupo*

Plicatula es una categoría botánica informal e infragenérica establecida por Chase (1929) que incluye a aquellas especies del género *Paspalum* que presentan marcadas afinidades morfológicas con la especie emblemática del grupo, *Paspalum plicatulum* Michx. El grupo comprende plantas perennes o anuales, terrestres o palustres, de inflorescencias por lo general con numerosos racimos, rígidos y con las espiguillas marcadamente planoconvexas. Las especies del grupo pueden ser fácilmente reconocidas por las características morfológicas de la espiguilla ya que el antecio superior es de color castaño oscuro brillante y la lemma inferior posee visibles arrugas o pliegues transversales; de ahí el nombre del grupo: plicatulum proviene del latín *plicatus* que significa plegado. Pero estos últimos caracteres no son exclusivos de Plicatula ya que ocurren en otros grupos de *Paspalum* y en otros géneros de Paniceae. Además, la delimitación de los taxones se dificulta por la marcada variabilidad de los caracteres vegetativos y reproductivos de las especies del grupo. Se han nombrado numerosas variedades y especies pertenecientes a este grupo, particularmente en América del Sur y es necesario un estudio integral del grupo Plicatula para dilucidar las relaciones entre taxones (Zuloaga & Morrone, 2005). El centro de diversidad del grupo se encuentra en Brasil (de Oliveira, 2004).

Las especies incluidas en Plicatula que habitan en América del Sur según Zuloaga y Morrone (2005) son las siguientes:

<i>Paspalum plicatulum</i>	<i>P. limbatum</i> Henrard
<i>P. atratum</i> Swallen	<i>P. macranthecium</i> Parodi
<i>P. chaseanum</i> Parodi	<i>P. melanospermum</i> Desv. ex Poir
<i>P. compressifolium</i> Swallen	<i>P. modestum</i> Mez
<i>P. convexum</i> Humb. & Bompl. ex Flüggé	<i>P. nicorae</i> Parodi
<i>P. geminiflorum</i> Steud.	<i>P. palustre</i> Mez
<i>P. glaucescens</i> Hack.	<i>P. scrobiculatum</i> L.
<i>P. guenoarum</i> Arech.	<i>P. wrightii</i> Hitchc. & Chase

Sin embargo, Chase (1939) en su manuscrito inédito incluye además a las siguientes especies dentro del grupo *Plicatula*:

<i>P. plicatulum polystachyum</i> Munro inéd.	<i>P. otembense</i> Leon
<i>P. plicatulum longipilum</i> Hack.	<i>P. urbanianum</i> Ekman
<i>P. arenarium</i> Arech.	<i>P. leptachne</i> Chase
<i>P. pubifolium</i> Presl.	<i>P. hydrophilum</i> Henr.
<i>P. collinum</i> Chase	<i>P. texanum</i> Swallen
<i>P. centrale</i> Chase	<i>P. lacustre</i> Chase
<i>P. foveolatum</i> Steud.	<i>P. crustarium</i> Chase
<i>P. ellipsoidalis</i> Chase	<i>P. subrotundum</i> (Doell) Chase
<i>P. yaguaronense</i> Henr.	<i>P. amazonicum</i> Trin.
<i>P. pontanale</i> Chase	<i>P. riparium</i> Nees.
<i>P. goyanum</i> Chase	<i>P. boscianum</i> Flügge
<i>P. rojasii</i> Hack.	<i>P. turgidum</i> Chase
<i>P. palustrine or subaquatic</i>	

#### *Estudios citogenéticos y reproductivos en el grupo Plicatula*

El grupo *Plicatula* se caracteriza por incluir a especies diploides sexuales y poliploides (especialmente tetraploides) que se reproducen por apomixis y son seudógamas y autofértiles (Quarin et al., 1997; Espinoza et al., 2001). Al igual que en *Paspalum*, en *Plicatula* predominan las especies poliploides, siendo la tetraploidía el nivel más comúnmente observado en este grupo (de Oliveira, 2004).

Si bien los citotipos diploides son raros en la naturaleza, han sido reportados biotipos 2x para algunas especies de *Plicatula*, tales como: *P. compressifolium* (Quarin et al., 1996), *P. glaucescens* (Pritchard, 1962; sin. *P. yaguaronense* Henrard), *P. plicatulum* (Espinoza y Quarin, 1997), *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001; sin. *P. limbatum*) y *P. wrightii* (Martínez y Quarin, 1999; sin. *P. hydrophilum*). Por otra parte, los estudios realizados hasta el momento demostraron que la mayoría de especies analizadas presenta citotipos tetraploides y todos ellos se reproducen por apomixis, tales como: *P. guenoarum* (Pritchard, 1970; Burson y Bennett, 1971b; Espinoza et al. 2001), *P. atratum* (Quarin et al., 1997), *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001) y *P. plicatulum* (Saura, 1941; Pritchard, 1970; Bashaw et al., 1970;

Burson y Bennett, 1971b). De hecho, varias de estas especies fueron recientemente introducidas al cultivo en diferentes lugares del mundo. Entre ellas podemos mencionar a: *P. nicorae*, *P. atratum* y *P. guenoarum* (Espinoza et al., 2001; Urbani y Quarin, 2002; Evers y Burson, 2004). Estos cultivares son el resultado de la selección de los mejores ecotipos que han sido coleccionados directamente de la naturaleza, evaluados por sus condiciones agronómicas, seleccionados y luego propagados como clones a través de verdaderas semillas. Hasta el momento no existen cultivares obtenidos por la vía de los cruzamientos para estas especies.

Numerosas especies de *Plicatula* son componentes de las pasturas naturales de América del Sur y poseen un considerable potencial forrajero (Espinoza et al., 2001).

Dado que los genotipos 4x conocidos son apomícticos y que las razas 2x son de reproducción sexual, el mejoramiento genético mediante cruzamientos y selección es impracticable dentro de las especies del grupo a nivel tetraploide. La obtención de plantas sexuales a nivel 4x es un requisito importante para estudios básicos de la apomixis así como para iniciar cualquier programa de mejoramiento genético a ese nivel de ploidía. Ésto depende de la duplicación de los cromosomas de una planta diploide. La relevancia de este procedimiento ha sido inmensamente reconocida por varios autores, a partir de que Forbes y Burton (1961a, b), Acuña et al. (2009) y Quesenberry et al. (2010) duplicaron los cromosomas de bahiagrass diploide sexual (*P. notatum*) con el objetivo de cruzar plantas sexuales tetraploides inducidas con genotipos tetraploides apomícticos naturales de la misma especie. Sin embargo, duplicar los cromosomas para inducir plantas tetraploides sexuales supone un punto especialmente difícil. Además de los resultados pioneros reportados por Forbes y Burton (1961a) para *P. notatum*, se han obtenido tetraploides sexuales inducidos solamente para otras tres especies de *Paspalum* en la última mitad del siglo: *P. hexastachyum* Parodi (Quarin y Hanna, 1980), *P. simplex* (Cáceres et al., 1999) y más recientemente *P. plicatulum* (Sartor et al., 2009). El descubrimiento de plantas diploides sexuales de *P. plicatulum* (Espinoza y Quarin, 1997) y las plantas tetraploides sexuales obtenidas experimentalmente a partir de estos diploides han abierto la posibilidad para el ingreso a programas de mejoramiento genético en estas especies (Sartor et al., 2009). Más aún, la disponibilidad de estas plantas tetraploides sexuales de *P. plicatulum* facilitaría los cruzamientos interespecíficos entre varias especies del grupo a nivel tetraploide.

*Especies utilizadas en este estudio: Paspalum plicatulum y P. guenoarum*

*Paspalum plicatulum* es una especie ampliamente distribuida, desde el sur de los Estados Unidos de América, hasta Argentina y Uruguay. Habita en sabanas, campos secos o bajos, preferentemente en suelos arenosos y arcillosos, húmedos, en bordes de caminos y vías férreas y en suelos modificados. Posee una marcada variabilidad en sus caracteres vegetativos y reproductivos lo cual dificulta su delimitación y la de otras especies pertenecientes al grupo (Zuloaga y Morrone, 2005). Esta especie posee dos citotipos: uno diploide ( $2n = 2x = 20$ ), de reproducción sexual y alógamo debido a autoincompatibilidad (Brown, 1950; Reeder, 1967; Davidse y Pohl, 1972, 1978; Fernandes et al., 1974; Honfi et al., 1990; Espinoza y Quarin, 1997) y otro tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ) de reproducción apomíctica,seudógamo y autocompatible (Saura, 1941; Pritchard, 1970; Bashaw et al., 1970; Burson y Bennett, 1971b). Hasta el momento no se han coleccionado plantas tetraploides sexuales de *P. plicatulum* creciendo en la naturaleza. La existencia de razas diploides y tetraploides sugiere un lógico origen autopoliplóide de los tetraploides (Sartor et al., 2009). Sin embargo, para estos tetraploides apomícticos de *P. plicatulum* se ha indicado un reciente origen alopoliplóide segmentario (Pohl y Davidse, 1971; Burson y Bennett, 1971b) y autotetraploide (Fernandes et al., 1974). Recientemente, se obtuvo de manera experimental una planta tetraploide completamente sexual de *P. plicatulum* mediante duplicación cromosómica con colchicina de una planta diploide sexual (Sartor et al., 2009).

*Paspalum guenoarum* crece en Bolivia, Paraguay, sur de Brasil, Argentina y Uruguay. Se lo encuentra en campos sobre suelos húmedos, rocosos o flojos. Se distingue de *P. plicatulum* por el porte de la planta, el tamaño de las inflorescencias y de las espiguillas. Es una especie muy variable en el tamaño de las láminas, número de racimos y pilosidad (Zuloaga y Morrone, 2005). En esta especie solamente se conocen biotipos tetraploides apomícticos con  $2n = 4x = 40$  cromosomas (Pritchard, 1970; Burson y Bennett, 1971b; Espinoza et al., 2001) y ningún citotipo diploide ha sido reportado para esta especie. Se ha sugerido que *P. guenoarum* podría haberse originado por hibridación al nivel de especie (Pritchard, 1970) y que probablemente se trate de un alopoliplóide segmentario (Burson y Bennett, 1971a).

En *P. plicatulum* y en *P. guenoarum* la apomixis está dada por aposporia seguida deseudogamia (Aguilera et al., 2011).

## HIPÓTESIS

En base a los antecedentes expuestos, las hipótesis de trabajo planteadas son:

- La apomixis puede ser transferida entre especies del grupo *Plicatula* por medio de gametos masculinos y su herencia responde a un modelo de locus simple dominante.
- Las especies *Paspalum plicatulum* y *P. guenoarum* son autotetraploides.
- El carácter está ligado a una serie de marcadores moleculares que se presume que deben corresponder a regiones genómicas conservadas, y que mayormente deben coincidir con los que fueron descritos para otras especies de *Paspalum*.
- El control del carácter se ubica en una región cromosómica relativamente grande donde la recombinación se encuentra restringida.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer la estructura básica de los grupos de ligamiento de especies del grupo Plicatula a nivel tetraploide y localizar la región responsable de la apomixis en *Paspalum guenoarum*.

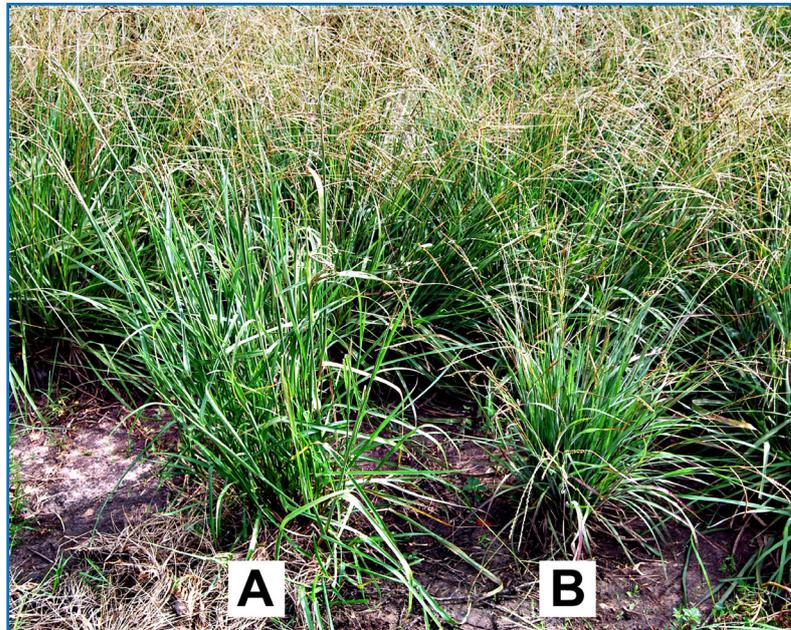
### Objetivos específicos

- Generar una población segregante para el modo de reproducción mediante el cruzamiento entre las especies tetraploides de *Paspalum plicatulum* (100 % sexual) y *P. guenoarum* (apomítico natural).
- Obtener un número suficiente de marcadores moleculares como para cubrir el genoma de la especie y realizar mapeo genético.
- Comprobar el tipo de herencia tetrasómica o disómica de ambos genotipos parentales (*P. plicatulum* y *P. guenoarum*) y comparar los resultados obtenidos con los antecedentes citogenéticos.
- Identificar el grupo de ligamiento que contiene el locus responsable de la apomixis en *P. guenoarum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material vegetal y cruzamientos*

A fin de generar una población F<sub>1</sub> segregante para el modo reproductivo se realizaron cruzamientos entre dos genotipos de especies diferentes del grupo Plicatula de *Paspalum*. Una planta tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ) sexual inducida, totalmente autoincompatible de *P. plicatulum* (de ahora en más, 4PT) fue empleada como parental femenino en los cruzamientos interespecíficos. Este material fue obtenido a partir de porciones de rizomas de la planta tetraploide sexual 4c-4x originalmente inducida por colchicina, obtenida en un trabajo anterior a partir de la planta diploide sexual H-14 (Sartor et al., 2009). El parental dador de polen fue la planta GR19, un genotipo tetraploide apomíctico natural proveniente del cultivar Rojas de *P. guenoarum*. Ambos parentales se encontraban creciendo en macetas dentro de un invernáculo al momento de realizar los cruzamientos; posteriormente fueron trasplantados al campo de cultivo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNNE) de Corrientes, Argentina (Fig. 1 A y B).



**Figura 1.** Individuos parentales de los cruzamientos 4PT x GR19. A) Planta GR19 de *Paspalum guenoarum* cultivar Rojas, tetraploide apomíctica. B) Planta 4PT de *P. plicatulum*, tetraploide sexual de origen experimental.

Antes del inicio de la floración, las inflorescencias de 4PT fueron aisladas en sobres de papel sulfito para evitar la contaminación con polen de otro genotipo. Durante la mañana siguiente, se colectó polen fresco de GR19, se removió el sobre de la inflorescencia de 4PT que mostró algunas espiguillas en anthesis y el polen de GR19 fue espolvoreado sobre los estigmas expuestos de 4PT. La floración en la planta 4PT ocurre alrededor de las 11:00 horas (a.m.), progresivamente y hacia abajo desde los racimos superiores en la inflorescencia y toma 4 a 6 días completar la anthesis de todas las espiguillas de una inflorescencia. Por lo tanto, la polinización se llevó a cabo por varios días en la misma inflorescencia, removiendo el sobre de papel sulfito cada mañana y luego colocándolo nuevamente para evitar la contaminación con polen indeseado. La floración de la planta GR19 ocurre en horas más tempranas, aproximadamente a las 8:30 horas (a.m.) por lo que comúnmente una vez colectado en un sobre, el polen fue conservado en el laboratorio hasta el momento de realizar la polinización sobre los estigmas de 4PT. Las inflorescencias polinizadas permanecieron en los sobres por un mes aproximadamente para evitar la caída y pérdida de las semillas que iban madurando, luego fueron colectadas cortando las varas florales, permaneciendo las inflorescencias dentro de los sobres. Éstos se colocaron en estufa a 37 °C durante 24-48 horas. Las espiguillas fueron separadas manualmente de las inflorescencias; las espiguillas llenas fueron separadas de las vacías empleando un aparato soplador de semillas.

Adicionalmente a la obtención de la población  $F_1$ , se obtuvieron una población  $F_2$  y tres poblaciones de retrocruzas; éstas fueron generadas a partir de la autopolinización de una planta  $F_1$  sexual ( $F_1\#8$ ) y las retrocruzas involucrando a 4PT y a una planta  $F_1$  sexual ( $F_1\#29$ ) y a dos  $F_1$  apomícticas ( $F_1\#15$  y  $F_1\#62$ ) respectivamente. Todos los cruzamientos se practicaron como se indicó anteriormente, durante los meses de verano cuando ocurre la floración de estas especies.

Las semillas obtenidas de todos los cruzamientos mencionados fueron puestas a germinar en suelo esterilizado, a principios de la primavera, para obtener las plantas de las futuras poblaciones  $F_1$ ,  $F_2$  y de retrocruzas. Aproximadamente 2 semanas después de la germinación, los plantines fueron trasplantados a macetas que permanecieron en el invernáculo hasta fines de la primavera, cuando fueron llevados al campo de cultivo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNNE) de Corrientes, Argentina.

### *Caracterización morfológica de los parentales y sus híbridos*

Los genotipos parentales (4PT y GR19) y 6 híbridos  $F_1$  (tres plantas sexuales y tres apomícticas) fueron utilizados para la caracterización morfológica. Las características medidas en las inflorescencias fueron: longitud del eje de la inflorescencia, número medio de racimos por inflorescencia y longitud de los racimos distal y basal. Las mediciones fueron realizadas en inflorescencias al momento de la antesis en plantas cultivadas que se encontraban creciendo en el campo. Tres inflorescencias fueron estudiadas por cada genotipo. Otras de las características analizadas fueron el ancho y la longitud de la lámina de la hoja determinados para la segunda hoja por debajo de la base de la inflorescencia. También se determinó el peso de 1000 semillas.

### *Clasificación de los individuos $F_1$ según el modo de reproducción*

Muestras de cariopses maduros del parental masculino GR19 y de cada una de las plantas de la población híbrida  $F_1$  fueron analizadas por citometría de flujo (FCSS), siguiendo los métodos descritos por Matzk et al., (2000), para determinar el modo de reproducción en base al contenido relativo de ADN embrión: endospermo. Adicionalmente, los individuos de la población  $F_2$  y los de las tres poblaciones obtenidas por retrocruzas también fueron clasificados según el modo de reproducción mediante análisis por citometría de flujo.

Dado que en estas especies de *Paspalum* la apomixis está dada por una serie de eventos que involucran: apomeiosis, desarrollo de sacos embrionarios a partir de células citológicamente no reducidas, partenogénesis y pseudogamia, el contenido relativo de ADN embrión: endospermo presentará diferentes valores ya sea que la semilla haya sido originada por sexualidad o a través de la vía apomíctica. Esto es debido a que en la mayoría de las especies apomícticas de *Paspalum* los sacos embrionarios apospóricos tienen dos núcleos polares no reducidos ( $2n$ ) en la célula central. El valor  $2x$  del embrión y el valor  $3x$  del endospermo indican que la semilla es producto de un evento sexual, como resultado de la doble fecundación: la de la ovocélula reducida ( $n$ ) y la de la célula central (la cual tiene dos núcleos polares  $n$ ), cada una por uno de los núcleos espermáticos  $n$  que llegan al saco embrionario a través del tubo polínico. En contraste, una proporción de contenido de ADN embrión: endospermo  $2x:5x$  denota que la semilla se formó a partir de un SEA. El embrión es formado por partenogénesis de una ovocélula no reducida ( $2n + 0$ ), mientras que el

endospermo surge de pseudogamia que involucra la célula central (que porta dos núcleos polares no reducidos,  $2n + 2n$ ) fecundado por un núcleo espermático reducido ( $n$ ).

Para cada planta, el análisis por citometría de flujo se realizó en grupos o *bulks* de 2 a 10 cariopses. Se analizaron en total entre 15 y más de 50 cariopses frescos para cada planta  $F_1$  y del parental masculino GR19. Una relación embrión:endospermo de 2:3 sugiere que esa planta se reproduce por sexualidad debido a que la descendencia es exclusivamente originada a partir de SEM; en cambio una relación embrión:endospermo de 2:5 indica que esa planta se reproduce por apomixis ya que origina descendientes a partir de SEA. Eventualmente algunas plantas  $F_1$  pueden tener la capacidad de reproducirse por sexualidad y por apomixis (apomixis facultativa) donde las progenies pueden originarse a partir de SEM y SEA. Cuando el análisis de semillas en bulks de plantas  $F_1$  mostró histogramas correspondientes a progenies originadas a partir de ambos tipos de sacos embrionarios, se decidió realizar un análisis individual de cariopses para establecer la expresividad de la apomixis de las plantas  $F_1$  apomícticas facultativas. Del mismo modo, entre 2 y 22 cariopses de la descendencia  $F_2$  y de los individuos obtenidos por retrocruzas fueron analizados por citometría de flujo a fin de establecer el modo reproductivo de esas plantas.

Los cariopses fueron finamente cortados en 0,5 ml de buffer para extracción nuclear. Luego de 2 minutos de incubación, la suspensión de núcleos fue filtrada a través de un pequeño embudo con un filtro de 30  $\mu\text{m}$  en un tubo limpio. Luego se agregaron 1,5 ml del buffer de tinción fluorescente 4 $\alpha$ ,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El buffer de extracción de núcleos y el de tinción están incluidos en el kit Partec P y son marca registrada de Partec (CyStain UV precise P; Partec, Munster, Germany). Las suspensiones fueron analizadas pasándolas a través de un citómetro de flujo (Partec Ploidy Analyzer PA-II), con el detector operando a 355 nm. Para cada muestra, se contaron al menos 3000 núcleos. Para el análisis de los datos, se utilizó el software de computación PA-II Partec FloMax. No se utilizó ningún patrón interno junto a la muestra de semillas maduras debido a que sólo eran de interés la presencia y posiciones relativas de los picos de los histogramas para inferir la o las vías reproductivas presentes en esas muestras.

#### *Determinación del nivel de ploidía de los individuos $F_1$*

Se determinó el nivel de ploidía utilizando muestras del tejido de hojas, siguiendo las recomendaciones del manual de Partec P kit CyStain UV Precise P 05-5002. Para realizar las

mediciones se utilizó una porción de hoja (aproximadamente 25 mm<sup>2</sup>) de la planta a estudiar y una muestra similar de hoja de una planta control cuyo nivel de ploidía era conocido, en este caso de la planta 4PT con  $2n = 4x = 40$  cromosomas (Sartor et al., 2009). Cada muestra fue preparada siguiendo el mismo procedimiento que se indicó anteriormente para cariopses (ver *Clasificación de los individuos F<sub>1</sub> según el modo de reproducción*). Las suspensiones fueron pasadas a través de un citómetro de flujo (Partec Ploidy Analyzer PA-II) con el detector operando a 355 nm. Al menos 3000 núcleos fueron contados por cada muestra. Los datos fueron analizados usando el programa de computación PA II Partec FloMax.

#### *Estudios de la meiosis de GR19 y sus híbridos interespecíficos con 4PT*

Inflorescencias jóvenes del parental masculino *P. guenoarum* GR19 y de cuatro híbridos fueron fijadas en solución 5:1 (v/v) de etanol absoluto:ácido láctico por 24 horas y luego almacenadas en etanol 70 % a 4 °C. Para realizar los preparados citológicos, las anteras fueron extraídas del interior de las espiguillas con ayuda de agujas histológicas y una lupa binocular (Nikon) y fueron aplastadas en una gota de carmín acético al 2 %, para así obtener de su interior las células madre del polen (CMP). Los preparados se hicieron permanentes con solución de terpentina de Venecia. Las células en diacinesis y metafase I fueron observadas con un microscopio óptico (Leica) para estudiar las asociaciones cromosómicas meióticas.

#### *Estudios de fertilidad*

La fertilidad de un grupo de híbridos F<sub>1</sub> y del parental masculino GR19 fue determinada mediante el análisis de la producción de semillas bajo condiciones de autopolinización y en polinización libre. Para las autopolinizaciones se seleccionaron tres inflorescencias de cada planta que fueron aisladas antes del inicio de la antesis utilizando sobres de papel sulfito y permanecieron en estas condiciones hasta la maduración completa de las semillas (aproximadamente 30 días). En cambio, para la obtención de semillas por polinización libre, las inflorescencias seleccionadas permanecieron descubiertas hasta que finalizó la antesis en toda la inflorescencia para permitir la libre polinización. Una vez que se completó la antesis, las inflorescencias fueron aisladas con sobres de papel sulfito para evitar la pérdida de semillas llenas. En ambos casos, se colectaron los sobres, se cosecharon las semillas y se

separaron semillas llenas y vacías como se describió anteriormente (*ver Material vegetal y cruzamientos*).

#### *Extracciones de ADN genómico*

Se realizaron microextracciones de ADN genómico total a partir de hojas frescas y jóvenes de los 109 individuos F<sub>1</sub> y de sus progenitores 4PT y GR19, siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983), con las modificaciones realizadas por Ortiz et al. (1997). Se cosecharon entre 0,2 y 0,4 gramos de hojas frescas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Luego las hojas fueron molidas con mortero y pilón, ambos enfriados apropiadamente con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colectó en microtubos de 2 ml y cada tubo fue introducido inmediatamente en nitrógeno líquido hasta el momento de procesar cada muestra. A cada tubo de muestra molida se agregaron 1,3 ml de buffer de extracción de ADN [Tris-HCl 100mM (pH 7,5), EDTA 50mM (pH 8), NaCl 500 mM, SDS 2 % y PVP 1 % PM 360000], el cual fue previamente precalentado a 68 °C y al que se le adicionaron 10 µl de β-mercaptoetanol por cada 1 ml de buffer. Las muestras se incubaron a 68 °C durante 15 minutos, agitándolas suavemente 1 ó 2 veces durante ese tiempo para que el buffer entre en contacto con toda la muestra. Luego se agregaron 250 µl de acetato de potasio 5M (pH 6,5) a cada tubo y se incubaron las muestras en hielo entre 1 y 2 horas. Pasado este tiempo, los tubos se sometieron a 10 minutos de centrifugación a 10500 rpm en una centrífuga (Eppendorf) refrigerada a 4 °C. Se tomaron 900 µl del sobrenadante y se transfirieron a microtubos limpios de 2 ml y se agregó 1 ml de isopropanol frío a cada muestra. Esta mezcla se incubó durante toda la noche a -20 °C. Luego de la incubación los microtubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 13000 rpm a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes, se dejaron secar los pellets a temperatura ambiente el tiempo necesario y luego se resuspendieron en 250 µl de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8) y EDTA 1 mM (pH 8)]. Los microtubos fueron agitados durante 1 hora aproximadamente para disolver completamente los pellets. Luego se realizó un tratamiento con 1 µl de ARNasa (10 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Cada muestra se transfirió a un microtubo de 1,5 ml, donde recibió un tratamiento de fenol:cloroformo, para lo cual se agregaron 125 µl de fenol y 125 µl de cloroformo a cada muestra. Los tubos fueron agitados por inversión durante algunos segundos y luego se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos en centrífuga refrigerada a 4 °C. Se transfirieron 150 µl de la fase superior de la

muestra a microtubos limpios de 1,5 ml y se agregaron 10  $\mu$ l de NaCl 5M y 500  $\mu$ l de etanol absoluto a cada tubo. Esta mezcla se incubó durante 8 horas a -20 °C. Luego de la incubación las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos en centrífuga refrigerada a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70 %. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se agregó nuevamente 1 ml de etanol 70 % al pellet para lavarlo y se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a 37 °C durante 20 minutos y luego fue resuspendido en 25  $\mu$ l de agua ultrapura estéril.

#### *Calidad y concentración del ADN genómico*

La concentración de cada una de las muestras se estimó: (I) espectrofotométricamente, para lo cual se realizaron mediciones de absorbancia a 260 nm (Sambrook et al., 1989) empleando un espectrofotómetro BioRad SmartSpec 3000; (II) mediante estimación visual en geles de agarosa al 1 %, en los que se realizó la corrida electroforética de una alícuota de las muestras (1  $\mu$ l) en presencia de buffer de siembra 1X (azul de bromofenol 0,025 %, xilen-cianol 0,025 % y glicerol 30 %) y una muestra de concentración conocida. La electroforesis se realizó en una cuba horizontal y una fuente de poder BioRad 300 a 40 V durante aproximadamente 2 horas. Luego se realizó la tinción del mismo sumergiéndolo en solución de bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml) por aproximadamente 30 minutos y luego visualizado con un transiluminador de luz ultravioleta y digitalizado mediante un analizador de imágenes. Finalmente, todas las muestras de ADN fueron llevadas a una concentración de 0,3  $\mu$ g/ $\mu$ l y luego conservadas a -20 °C.

#### *Generación de marcadores moleculares de AFLP*

La generación de marcadores de AFLP se llevó a cabo según la técnica desarrollada originalmente por Vos et al. (1995), de acuerdo a lo descrito por Espinoza et al. (2006) y con las modificaciones que se detallan a continuación.

*Digestión:* Se utilizó 1  $\mu$ g de ADN genómico de cada planta que fue digerido utilizando simultáneamente dos enzimas de restricción: *EcoRI* y *MseI*. Para realizar la digestión se utilizó buffer OPA 5X [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 50 mM], que es compatible para ambas enzimas y para T4 ADN ligasa de la marca

comercial BioNeer. La digestión se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo la mezcla de reacción que se indica en la tabla 1.

**Tabla 1.** Componentes de mezcla de digestión *EcoRI-MseI*.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 muestra (25 µl)
Buffer OPA	5X	1X	5 µl
DTT	250 mM	5 mM	0,5 µl
BSA	500 ng/µl	50 ng/µl	2,5 µl
<i>EcoRI</i>	12 U	5 U	0,4 µl
<i>MseI</i>	10 U	5 U	0,5 µl
ADN	300 ng/µl	1 µg	3,3 µl
Agua U.P.			12,8 µl

La digestión se llevó a cabo a 37 °C durante 4 horas y luego se detuvo colocando los tubos en baño María a 72 °C durante 10 minutos.

*Generación de adaptadores:* Los fragmentos de ADN genómico generados por restricción fueron ligados a adaptadores especiales que se unen al extremo de ADN que haya sido escindido ya sea por la enzima *EcoRI* o *MseI*. Para ello, los adaptadores se prepararon utilizando oligonucleótidos de cadena simple sintetizados por la University of British Columbia. Para obtener adaptadores de doble cadena se mezclaron, en un microtubo para PCR 10 µg de los oligonucleótidos *EcoRI* “forward” (5'-CTC GTG ACT GCG TAC C-3') y “reverse” (5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3') y en otro microtubo 10 µg de los oligonucleótidos *MseI* “forward” (5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') y “reverse” (5'-TAC TCA GGA CTC ATC-3'). Las mezclas se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y luego a temperatura ambiente durante 30 minutos. Ambos adaptadores se diluyeron a 50 pM/µl. Los adaptadores *EcoRI* fueron diluidos nuevamente en una proporción 1:10 para llevarlos a una concentración final de 5 pM/µl.

Adaptador *EcoRI*: 5'-CTCGTGACTGCGTACC-3'  
3'-CTGACGCATGGTTAA-5'

Adaptador *MseI*: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'  
3'-TACTCAGGACTCAT-5'

*Ligación de los adaptadores:* La ligación de los adaptadores a los sitios de restricción generados por las enzimas *EcoRI* y *MseI* se realizó en el mismo tubo donde se lleva a cabo la reacción de digestión. A cada tubo se agregaron 7,5 µl de solución de ligación de

adaptadores (ATP 1mM, buffer OPA 1X, DTT 5mM, BSA 50 ng/μl), 5 pM de adaptador *EcoRI*, 50 pM de adaptador *MseI* y 5 unidades de T4 ADN ligasa (Tabla 2). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 4 horas y luego se conservaron a -20 °C.

**Tabla 2.** Componentes de la mezcla de ligación.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 muestra (10 μl)
Solución de ligación			7,5 μl
T4 ADN Ligasa	200 U/μl	15 U/μl	0,075 μl
Adaptador <i>MseI</i>	50 pM	5 pM	1 μl
Adaptador <i>EcoRI</i>	5 pM	0,5 pM	1 μl
Agua U.P.			0,425 μl

*Pre-amplificación:* Las reacciones de pre-amplificación se llevaron a cabo utilizando como templado el producto de la ligación, como cebadores los oligonucleótidos E01 (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3') y M01 (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AA-3') sintetizados por la University of British Columbia y la enzima polimerasa GoTaq® DNA Polymerase de Promega. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μl con los componentes que se indican en la tabla 3.

**Tabla 3.** Componentes de mezcla de preamplificación.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 muestra (25 μl)
Templado		2 μl	2 μl
dNTP's	5 mM	0,2 mM	1 μl
Cebador E01	30 ng/μl	1,2 ng/μl	1 μl
Cebador M01	30 ng/μl	1,2 ng/μl	1 μl
Go Taq Promega	5 U/μl	1 U	0,2 μl
Buffer Taq	5X	1X	5 μl
Agua U.P.			14,8 μl

Las reacciones de pre-amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de la marca comercial BioRad programado como se indica en la tabla 4.

**Tabla 4.** Esquema de ciclado de pre-amplificaciones.

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

*Amplificaciones selectivas:* Las amplificaciones selectivas se llevaron a cabo utilizando como templado una dilución 1:10 del producto de pre-amplificación, como cebadores se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores E y M sintetizados por la University of British Columbia y la enzima polimerasa GoTaq® DNA Polymerase de Promega. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl con los componentes que se indican en la tabla 5.

**Tabla 5.** Componentes de mezcla de la amplificación selectiva.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 muestra (10 µl)
Preamplificación		2 µl	2 µl
dNTP's	5 mM	0,2 mM	0,4 µl
Cebador E	30 ng/µl	1,2 ng/µl	0,4 µl
Cebador M	30 ng/µl	1,2 ng/µl	0,4 µl
Go Taq Promega	5 U/µl	1 U	0,2 µl
Buffer Taq	5X	1X	2 µl
Agua U.P.			4,6 µl

Las amplificaciones selectivas se realizaron en un termociclador de la marca comercial BioRad, siguiendo las condiciones indicadas en Vos et al. (1995). El programa de amplificación consta de 36 ciclos y se indica en la tabla 6.

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

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

#### *Electroforesis en geles de poliacrilamida*

Los productos de las amplificaciones selectivas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % [acrilamida:bisacrilamida (19:1); urea 7M; buffer TBE 10X] de 4 mm de espesor. Antes de realizar la siembra se adicionó a cada muestra el volumen necesario de buffer de siembra 6X (azul de bromofenol 0,05 %, xilen-cianol 0,05 %, formamida 95 % y NaOH 10 mM) para llegar a una concentración final de 1X y luego las muestras fueron desnaturalizadas calentándolas a 95 °C durante 5 minutos y colocadas inmediatamente en hielo. Para realizar la corrida electroforética se utilizó el sistema de la marca comercial SciePlas y una fuente de poder de 3000 V. Previo a la siembra se realizó una precorrida del gel a una potencia constante de 60 W por aproximadamente 1 hora, hasta alcanzar una temperatura de 50 °C. Luego se sembraron 5,5 µl de cada muestra y, en la primera calle del gel 2,5 µl del marcador de peso molecular Cien Marker de la marca comercial Biodynamics, previamente desnaturalizados. La corrida electroforética se llevó a cabo a una potencia constante de 60 W por 1 hora y 20 minutos. Finalmente los geles fueron teñidos utilizando nitrato de plata según el protocolo de Promega.

Los geles fueron analizados empleando un transiluminador de luz blanca. Se realizó el registro de los patrones electroforéticos obtenidos para los marcadores de AFLP mediante el sistema de notación de (1) para las bandas presentes y (0) para las ausentes. Los geles fueron escaneados para su digitalización.

La obtención de marcadores moleculares por la técnica de AFLP se realizó en tres etapas sucesivas distintas.

*Etapa 1:* Se llevó a cabo la metodología denominada *Bulked Segregant Analysis* (Análisis de segregantes en grupos, BSA por sus siglas en inglés), descrita por Michelmore et al. (1991), que permitió realizar una detección de las combinaciones de cebadores más informativas, es decir aquellas que revelaran más polimorfismos entre los parentales, y que luego serían ensayadas en todos los individuos de la población para la construcción del mapa de ligamiento. Para ello, se empleó el ADN de 10 plantas F<sub>1</sub> sexuales y de 10 plantas F<sub>1</sub> apomícticas que fueron mezclados en respectivos bulks sexual y apomíctico. Luego, el ADN de los bulks y el ADN de los parentales fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *MseI*, se ligaron los adaptadores específicos, se realizaron las pre-amplificaciones con el par de cebadores E01M01 y las correspondientes amplificaciones selectivas con distintas combinaciones de cebadores *EcoRI* (E) y *MseI* (M). En la tabla 7 se muestran las secuencias de los cebadores E y M que, en distintas combinaciones, se ensayaron en esta etapa.

**Tabla 7.** Secuencias de cebadores E y M empleadas, en distintas combinaciones, para las amplificaciones selectivas.

Cebador	Secuencia
E31	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
E32	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3'
E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
E34	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA T-3'
E35	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC A-3'
E36	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC C-3'
E38	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'
M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA A-3'
M32	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA C-3'
M33	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA G-3'
M34	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA T-3'
M35	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC A-3'
M36	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC C-3'
M37	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC G-3'
M38	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC T-3'
M39	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG A-3'
M40	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG C-3'
M42	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAG T-3'

*Etapa 2:* Se empleó la estrategia de *mapeo selectivo* (Vision et al., 2000; ver más adelante). El ADN genómico total extraído de los 109 híbridos F<sub>1</sub> de la población de mapeo y de los parentales 4PT y GR19 fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *MseI*, se ligaron los adaptadores específicos y se realizaron pre-amplificaciones con el par de cebadores E01M01. Estas pre-

amplificaciones fueron utilizadas como templado para nuevas amplificaciones selectivas empleando algunas de las combinaciones de cebadores que resultaron más informativas en el BSA. El mapeo selectivo se realizó mediante una función del programa de computación para el cálculo de mapas de ligamiento genético JoinMap<sup>®</sup> 3.0 (van Ooijen y Voorrips, 2001) y se comparó el perfil genético de las 109 F<sub>1</sub>. Para ello, se confeccionó un archivo de datos que contenía la información correspondiente a cada individuo, para los marcadores de tipo paterno que segregaron en proporción 1:1 y para los que segregaron como 1:1,6, incluyendo el carácter apomixis. Los criterios para excluir o mantener a un individuo dentro de la población de mapeo fueron los siguientes: I) se estableció un umbral de similitud de hasta 0,75 para considerar a dos genotipos como distintos; a partir de este valor, dos plantas fueron consideradas genotípicamente similares; II) no se excluyeron individuos de reproducción apomítica; III) en los casos en que los que se observó similitud (> 0,75) entre una planta sexual y una apomítica, se excluyó la sexual. Además, fueron excluidos los individuos que presentaron menos de 10 bandas segregantes desde el genotipo paterno GR19, así como aquellos genotipos que mostraron más de 10 datos perdidos.

*Etapas 3:* Esta última etapa limitó el trabajo a los híbridos seleccionados mediante el mapeo selectivo de la etapa previa, y a sus parentales. Con las pre-amplificaciones existentes, se realizaron las amplificaciones selectivas con combinaciones de cebadores E-M seleccionadas de la etapa 1.

#### *Clasificación de los marcadores moleculares en la población de mapeo*

Se confeccionaron dos archivos de datos conteniendo los resultados de segregación de los marcadores en los 89 individuos de la población de mapeo. Un archivo contenía solamente los datos de los marcadores segregantes a partir del progenitor femenino (marcadores maternos) y otro, solamente los que segregaron del progenitor masculino (marcadores paternos); el carácter apomixis, segregante desde el progenitor GR19, se incluyó en éste último. Aquellos marcadores segregantes presentes en ambos progenitores se consideran como puentes alélicos (Ritter et al., 1990) y en un primer momento, fueron incluidos en un archivo independiente.

Los valores de segregación de cada marcador que mostró polimorfismo entre los progenitores fueron examinados mediante una prueba de  $\chi^2$  ( $p < 0,01$ ), confrontando los valores observados con los esperados de las distintas combinaciones alélicas posibles de cada

uno de los progenitores o ambos en caso de herencia disómica o polisómica (Tabla 8). También se testeó la proporción 1:1,6 para los marcadores paternos. Para ello, se consideró que los alelos en dosis simple (ADS, Aaaa) son aquellos presentes en uno de los genotipos parentales y ausentes en el otro y que segregan en proporción 1:1 en la población, sin importar el nivel de ploidía ni el tipo de herencia del organismo (Wu et al., 1992). Por otra parte, en un individuo tetraploide (como es el caso de *P. plicatum* 4PT y de *P. guenoarum* GR19) los únicos marcadores en dosis múltiple presentes en uno solo de los genotipos parentales que segregarán en la población son los alelos en dosis doble (ADD, AAaa) ya que los marcadores que tengan las otras dos configuraciones posibles (AAAA y AAAa) estarán presentes en todos los individuos  $F_1$ . Para un ADD se espera la relación de segregación cromosómica 5:1 en un autotetraploide y 3:1 o 1:0 para un alotetraploide (Lacadena, 1988). También se evaluó la presencia de marcadores distorsionados, cuyos valores de segregación presencia:ausencia no se ajustaron a ninguna de las hipótesis esperadas ( $\chi^2 > 7$ ;  $p < 0,01$ ). Finalmente, se determinó la presencia de marcadores segregantes desde ambos progenitores. Las relaciones de segregación esperadas para estos marcadores se muestran en la tabla 8. Los marcadores de tipo puente alélico o biparentales son aquellos que se encuentran en dosis simple en los dos genotipos parentales y cuya segregación esperada es 3:1 para ambos tipos de herencia (Ritter et al., 1990). Aquellos marcadores maternos y paternos que se ajustaron a la proporción 1:1, y los paternos a la proporción 1:1,6, fueron empleados en la construcción del mapa genético.

**Tabla 8.** Segregaciones esperadas de marcadores maternos o paternos (ADS y ADD) y marcadores comunes (presentes en ambos genotipos parentales) en la población de mapeo tanto para auto como para alotetraploidía (herencia tetrasómica y disómica, respectivamente).

Tipo de marcador	Configuración parental	Tipo de Herencia	Relación de segregación (presencia:ausencia)
ADS <sup>d</sup>	Aaaa x aaaa	Tetrasómica	1:1
		Disómica	1:1
Materno (1/0) <sup>a</sup> o Paterno (0/1) <sup>b</sup>	AAaa x aaaa	Tetrasómica	5:1
		Disómica	3:1 o 1:0 <sup>h</sup>
ADT <sup>f</sup> /ADC <sup>g</sup>	AAAa x aaaa / AAAA x aaaa	Tetrasómica	1:0
		Disómica	1:0
Materno/Paterno (1/1) <sup>c</sup>	Aaaa x Aaaa	Tetrasómica	3:1
		Disómica	3:1
	AAaa x Aaaa	Tetrasómica	11:1
		Disómica	7:1 o 1:0 <sup>h</sup>
	AAaa x AAaa	Tetrasómica	35:1
		Disómica	15:1 o 1:0 <sup>h</sup>

a: marcadores presentes en el genotipo materno y ausentes en el paterno

b: marcadores presentes en el genotipo paterno y ausentes en el materno

c: marcadores presentes en ambos genotipos

d: alelos en dosis simple

e: alelos en dosis doble

f: alelos en dosis triple

g: alelos en dosis cuádruple

h: relaciones de segregación esperadas según que los alelos estén en cromosomas homólogos u homeólogos

#### *Análisis de segregación y determinación del tipo de herencia (disómica o polisómica)*

Los marcadores segregantes desde cada genotipo parental fueron registrados y analizados independientemente. Para la determinación del tipo de herencia, solamente se consideraron los marcadores presentes en un progenitor y ausentes en el otro, y viceversa.

El tipo herencia (disómico o polisómico) de estas especies se estudió mediante el análisis de la segregación de marcadores en doble dosis (ADD). Estos marcadores (AAaa) son los que segregan en una proporción 5:1 en caso de herencia polisómica, y no segregarán o lo harán en proporción 3:1 si la herencia es de tipo disómica, dependiendo si los fragmentos amplificados están en cromosomas homólogos u homeólogos, respectivamente (Wu et al., 1992).

### *Construcción de mapas de ligamiento genético*

La estrategia utilizada para el desarrollo de los mapas de ligamiento a nivel tetraploide en especies del grupo Plicatula de *Paspalum* se basó en la identificación y mapeo de marcadores de AFLP presentes en dosis simple (ADS) (Ej: A000 x 0000) (Wu et al., 1992), segregantes de cada uno de los progenitores de la población de mapeo, de acuerdo a lo descrito por Grattapaglia y Sederoff (1994). Los marcadores en esta situación presentan una segregación esperada de 1:1 o 13:15 (presencia:ausencia) en la progenie, dependiendo si la segregación es cromosómica o cromatídica (Sorrells, 1992; Wu et al., 1992).

Los datos de segregación de cada genotipo parental para estos marcadores se registraron y analizaron independientemente y se construyeron dos mapas de ligamiento, correspondientes a cada uno de los progenitores, 4PT y GR19. Los mapas marcos se establecieron considerando las siguientes configuraciones alélicas: Aaaa x aaaa (presencia de la banda en 4PT y ausencia en GR19) y aaaa x Aaaa (presencia de la banda en GR19 y ausencia en 4PT) para el desarrollo de los mapas materno y paterno, respectivamente. Asimismo, se seleccionaron los marcadores de tipo ADS, que presentaron segregación 1:1, confrontando valores de segregación observados contra los valores esperados con una prueba de  $\chi^2$  a un  $p < 0,01$ , para un grado de libertad. En el caso de los marcadores segregantes del progenitor paterno, también se consideró el carácter apomixis y a aquellos marcadores que segregaron en la misma proporción presencia:ausencia que el carácter apomixis en la población. También se consideraron tanto para el progenitor materno como para el paterno, los marcadores de tipo puente alélico que segregaron en una proporción 3:1 en la población ( $\chi^2$ ;  $p < 0,01$ ) y los mismos fueron incorporados a los respectivos archivos de segregación de los progenitores.

El análisis de ligamiento y la localización de la región genómica que caracteriza a la apomixis se realizaron utilizando el programa de mapeo JoinMap<sup>®</sup>3.0 (van Ooijen y Voorrips, 2001). Este programa permite el cálculo de ligamientos y frecuencias de recombinación a partir de varios tipos de segregación y la combinación de la información de ligamiento de poblaciones diferentes, para la construcción de mapas integrados sobre la base de un número mínimo de loci compartidos. El mismo estima las distancias de mapeo para un grupo dado de marcadores por el método de los mínimos cuadrados (Stam, 1993).

Los datos genéticos de los marcadores ADS y puente alélico fueron codificados como una población de tipo "CP" (cross-pollination population type). Los individuos  $F_1$  que

presentaron marcadores en dosis simples y/o el carácter apomixis fueron considerados como heterocigotos del tipo simplexo (Aaaa) para ese locus, mientras que los individuos que no presentaron marcadores y/o son sexuales se consideraron como homocigotos (aaaa). Las unidades de mapeo en cM derivaron de la función de Kosambi (1944).

El procedimiento para la construcción de los mapas materno y paterno fue llevado a cabo en dos etapas. Primero, se establecieron los grupos de ligamiento de marcadores ligados en fase de acoplamiento (grupos de cosegregación). Esto permitió la construcción de un mapa para el genotipo materno 4PT y de otro para el genotipo paterno GR19. Luego, se realizó la determinación de cromosomas homólogos entre 4PT y GR19 en base a marcadores de tipo puente alélico.

Se estimó el largo del genoma esperado,  $E(G)$ , para los mapas de *Paspalum plicatulum* y *P. guenoarum* por el método de Hulbert et al. (1988) modificado por Chakravarti et al. (1991) de acuerdo a la ecuación  $E(G) = [n(n-1)d] / k$ ; donde  $n$  es el número de marcadores en el mapa,  $d$  es la mayor distancia en cM observada entre dos loci a un LOD score dado y  $k$  es el número de pares de marcadores ligados a ese LOD score. La cobertura del genoma se estimó como la proporción del largo de recombinación experimental obtenido (suma de los grupos de ligamiento) sobre el largo teórico estimado del genoma  $[E(G)] \times 100$ .

#### *Análisis estadístico*

El test estadístico  $\chi^2$  Chi Cuadrado fue empleado para comparar las proporciones de segregación sexualidad:apomixis observadas con las proporciones esperadas para la  $F_1$ ,  $F_2$  y poblaciones de retrocruzamientos, y compararlas también con segregaciones previamente reportadas. Todas las diferencias se refieren a una significancia a  $p < 0,01$ . Se consideró que la segregación observada no era significativamente diferente de la esperada cuando  $\chi^2 < 6,9$ .

Los datos de características morfológicas fueron analizados usando el programa de computación PROC GLM de PC SAS (SAS Institute, 2004). Cuando se detectaron diferencias significativas entre genotipos para un carácter morfológico, se empleó el test de Tukey para separación de medias. Todas las diferencias se refieren a una significancia al  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sobre la genética del locus de la apomixis en especies del grupo *Plicatula*

Parte 1. **Generación y caracterización de una población segregante por el modo de reproducción obtenida mediante el cruzamiento entre dos especies de gramíneas forrajeras tetraploides: *Paspalum plicatulum* sexual y *P. guenoarum* apomíctico.**

#### *Generación de una población $F_1$ entre especies tetraploides del grupo *Plicatula**

Aproximadamente 1400 espiguillas de la planta de *Paspalum plicatulum* (4PT) fueron polinizadas con *P. guenoarum* (GR19). Ambas especies coinciden en el período de floración, que se inicia entre mediados y fines del mes de diciembre, hasta mediados del mes de febrero. Alrededor del 20 % de las espiguillas resultaron llenas y 242 semillas fueron sembradas en bandejas conteniendo suelo estéril. Este valor de llenado de semillas es comparable al 23 % (y un rango de 10 a 35 %) obtenido previamente para tetraploides apomícticos y sexuales inducidos de *P. notatum*, especie reconocida como uno de los más importantes recursos naturales forrajeros de regiones tropicales y subtropicales de América del Sur (Acuña et al., 2009). Considerando este dato, se puede afirmar que la planta 4PT tetraploide inducida presentó un nivel de fertilidad como el de los tetraploides inducidos en el trabajo de Acuña et al. (2009) o bien, que 4PT fue compatible con el parental masculino GR19, como lo fueron los tetraploides inducidos de *P. notatum* en cruzamientos intra-específicos con parentales masculinos apomícticos de *P. notatum* en ese estudio previo. Ello indica que es factible que estas especies del grupo *Plicatula* sean exitosamente incluidas en esquemas de mejoramiento por cruzamientos interespecíficos, como lo están siendo distintos genotipos de *P. notatum*.

El porcentaje de germinación fue del 80 %, obteniéndose un total de 211 individuos que constituyeron la población  $F_1$  derivada del cruzamiento entre *Paspalum plicatulum* y *P. guenoarum* y que se encuentran creciendo en el campo de cultivo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNNE) de Corrientes, Argentina (Fig. 2).



**Figura 2.** Progenie F<sub>1</sub> del cruzamiento entre *Paspalum plicatulum* 4PT y *P. guenoarum* GR19.

#### *Caracterización morfológica de los genotipos 4PT, GR19 y de sus híbridos*

En base a las comparaciones fenotípicas de los caracteres morfológicos seleccionados, los cuales exhiben mayor similitud con el progenitor masculino que con el femenino, y debido a que la planta madre resultó ser completamente autoincompatible (Sartor et al., 2009), los descendientes del cruzamiento 4PT x GR19 fueron clasificados como híbridos interespecíficos.

Se observó una considerable variabilidad entre los seis híbridos estudiados para varias de las características morfológicas consideradas. Cuando las características seleccionadas difirieron entre los parentales, los híbridos produjeron valores intermedios a los de los padres, aunque algunos híbridos excedieron los valores de los progenitores (Tabla 9). Las inflorescencias de 4PT mostraron 3 a 4 racimos por inflorescencia, cuyo eje midió en longitud 7,86 ( $\pm$  1,09) cm en promedio, mientras que en *P. guenoarum* las inflorescencias contenían 5 a 10 racimos y promediaron 20,20 ( $\pm$  2,35) cm de longitud. Los racimos de 4PT fueron todos de longitudes similares mientras que GR19 mostró inflorescencias truncadas piramidales. En los híbridos la longitud del eje de la inflorescencia fue siempre mayor que en la madre y los promedios oscilaron entre 10,20 ( $\pm$  1,55) y 22,10 ( $\pm$  5,10) cm, mientras que el número medio de racimos por inflorescencia fue variable (entre 4,00 y 6,33) pero intermedio al de los padres (3,33 para 4PT y 8,33 para GR19). Los híbridos mostraron considerable

variación para la forma de la inflorescencia y la longitud de los racimos. Algunas inflorescencias exhibieron mayor similitud con el parental femenino (p. e. el híbrido #01), mientras que otros híbridos tuvieron inflorescencias más piramidales, aunque ninguno de ellos mostró la clara diferencia en la longitud del racimo superior e inferior observada en el parental masculino (Tabla 9). El promedio del ancho de la lámina de la hoja fue 0,66 ( $\pm$  0,11) cm para la madre y 1,63 ( $\pm$  0,15) cm para el padre. Los valores de ancho de la lámina de la hoja observados para los seis híbridos fueron intermedios a los de los padres y variaron entre 0,76 ( $\pm$  0,15) y 1,20 ( $\pm$  0,26) cm. De la misma manera, la longitud media de la hoja fue variable entre los seis híbridos e intermedia a la de los padres, con excepción del híbrido #01 que tuvo hojas más cortas que la planta madre (Tabla 9). En cambio, el peso de 1000 semillas llenas excedió los valores de ambos padres para la mayoría de los híbridos. De manera global, y teniendo en cuenta las características fenotípicas de los descendientes del cruzamiento entre 4PT y GR19, los mismos heredaron más características del padre GR19 que de la madre 4PT, lo cual indica el origen híbrido de la progenie.

El análisis estadístico de los caracteres morfológicos analizados mostró que los mismos fueron significativamente diferentes entre 4PT y GR19, con la excepción de la longitud del racimo superior de sus inflorescencias. La mayoría de los híbridos mostró características morfológicas intermedias a las de los padres. Sin embargo, la mayoría de los valores observados en los híbridos no fue significativamente diferente de los valores obtenidos para el progenitor masculino GR19, pero fueron significativamente diferentes para la mayoría de los valores obtenidos para el parental femenino 4PT. La excepción fue el híbrido #01, que mostró características morfológicas que no fueron significativamente diferentes de 4PT pero difirieron del parental masculino. Estos resultados tienen una singular significancia para programas de mejoramiento en *Paspalum*, especialmente dentro del grupo Plicatula ya que es posible diferenciar a los híbridos de manera sencilla mediante el uso de caracteres morfológicos en cruzamientos interespecíficos a nivel tetraploide.

Por otra parte, estudios previos realizados en una muestra de 23 individuos de esta población  $F_1$  utilizando marcadores de RAPD mostraron que la totalidad de la muestra amplificó bandas específicas del parental masculino, comprobándose el origen híbrido de los 23 descendientes (Aguilera et al., 2011).

**Tabla 9.** Características morfológicas del citotipo tetraploide inducido por colchicina de *P. plicatulum*, *P. guenoarum* tetraploide y seis híbridos interespecíficos.

Especies o Híbridos	Longitud del eje de la inflorescencia (cm)		Número de racimos por inflorescencia		Longitud racimo superior (cm)		Longitud racimo inferior (cm)		Ancho de la lamina de la hoja (cm)		Longitud de la lamina de la hoja (cm)		Peso de semillas (g) <sup>†</sup>						
	DE		DE		DE		DE		DE		DE		DE						
<i>P. plicatulum</i> (4PT) (S) <sup>‡</sup>	7,86	d <sup>§</sup>	1,09	3,33	b	0,57	10,56	a	1,28	10,43	cd	2,30	0,66	b	0,11	32,66	bc	8,01	2,66
<i>P. guenoarum</i> (GR19) (A) <sup>¶</sup>	20,20	ab	2,35	8,33	a	2,88	6,13	a	2,65	17,46	ab	3,33	1,63	a	0,15	51,50	a	4,97	2,39
Híbridos																			
01 (S)	10,20	cd	1,55	4,00	b	0,00	7,66	a	0,86	7,80	d	1,12	0,90	b	0,10	28,80	c	1,20	3,78
02 (S)	13,66	bcd	1,27	4,33	ab	0,57	7,53	a	1,36	11,63	bcd	1,75	1,00	b	0,17	35,43	abc	5,95	4,19
06 (S)	17,50	abc	3,67	4,66	ab	0,57	11,43	a	1,60	14,70	abc	2,98	1,20	ab	0,26	47,00	ab	7,69	3,94
12 (A)	18,76	ab	1,06	5,00	ab	0,00	11,06	a	0,11	17,76	ab	0,25	1,13	ab	0,35	45,00	abc	4,35	2,66
20 (A)	19,90	ab	0,88	4,66	ab	0,57	9,03	a	1,77	16,53	abc	1,53	0,76	b	0,15	46,23	abc	6,33	2,30
22 (A)	22,10	a	5,10	6,33	ab	3,21	11,20	a	2,81	20,73	a	2,21	1,03	b	0,25	50,06	ab	7,65	3,20

DE, desvío estándar.

<sup>†</sup> Peso de 1000 semillas llenas.

<sup>‡</sup> S, planta sexual.

<sup>§</sup> Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a un nivel de probabilidad de  $\alpha = 0,05$  de acuerdo al test de Tukey.

<sup>¶</sup> A, planta apomíctica.

**Tabla 10.** Proporciones de contenido relativo de ADN embrión: endospermo y modo reproductivo de *Paspalum plicatulum* tetraploide sexual, *P. guenoarum* tetraploide apomíctico y sus híbridos interespecíficos caracterizados por citometría de flujo en semillas.

Especie o Híbridos	Contenido relativo de ADN del Embrión	Contenido relativo de ADN del Endospermo	Proporción Embrión:Endospermo	Modo de reproducción
<i>P. plicatulum</i> (4PT)*	2x	3x	2:3	Sexualidad
<i>P. guenoarum</i> (GR19)	2x	5x	2:5	Apomixis
Híbridos F <sub>1</sub>				
127 individuos	2x	3x	2:3	Sexualidad
79 individuos	2x	5x	2:5	Apomixis

\*Datos obtenidos de Sartor et al. (2009).

### *Caracterización reproductiva de los individuos F<sub>1</sub>*

La determinación del modo reproductivo de la población F<sub>1</sub> se realizó por citometría de flujo en semillas maduras de 206 individuos y de ambos parentales, mediante la estimación de la relación del contenido relativo de ADN del embrión y del endospermo siguiendo la metodología explicada en la sección de Material y Métodos.

El análisis mostró segregación para el modo de reproducción. Del estudio surgió que la madre (4PT) y 127 individuos F<sub>1</sub> presentaron histogramas con un pico en 2x correspondiente al embrión y un pico pequeño en 3x para el endospermo, lo que indica una relación del contenido de ADN embrión:endospermo de 2:3 (Tabla 10; Fig. 3A). Esto significa que las semillas de estos individuos fueron generadas exclusivamente a través de un proceso sexual mediante la intervención de sacos embrionarios reducidos (meióticos).

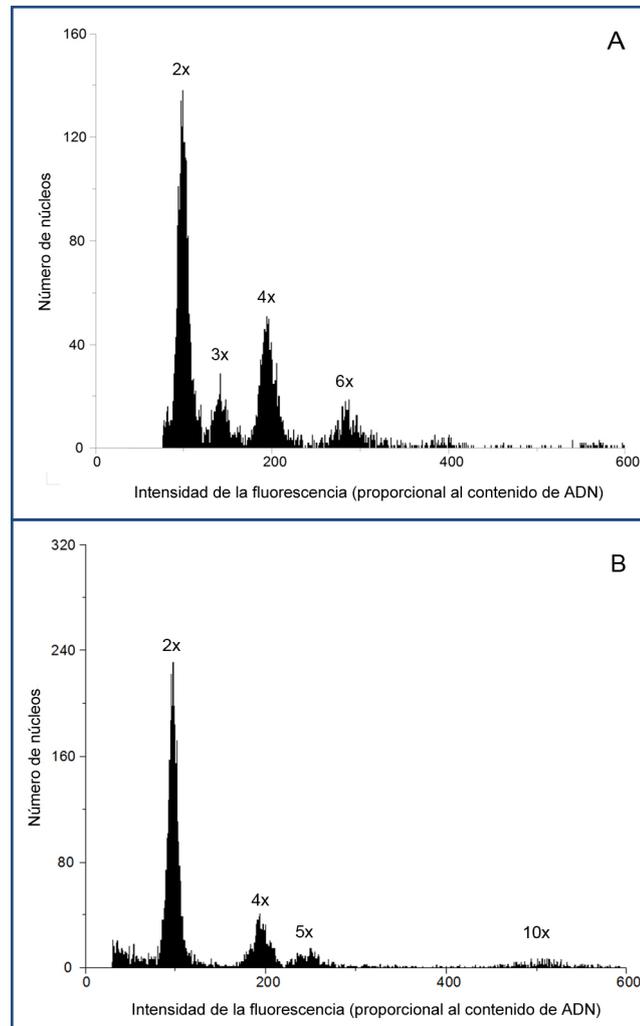
Sin embargo, el parental masculino (GR19) y los restantes 79 híbridos mostraron histogramas con una relación de contenido relativo de ADN embrión:endospermo de 2:5 (Tabla 10; Fig. 3B). Esto significa que presentaron como modo de reproducción a la apomixis ya que las semillas producidas por estos individuos se originaron a partir de sacos embrionarios no reducidos. El embrión de las mismas se originó por partenogénesis de la ovocélula no reducida ( $2n + 0$ ), mientras que el endospermo se generó por la fecundación de la célula central binucleada y no reducida ( $2n + 2n$ ) por un núcleo espermático reducido ( $n$ ). La necesidad de fecundación de la célula central en estos individuos apomícticos, fenómeno conocido como pseudogamia, es común a la mayoría de las especies apomícticas de *Paspalum* (Quarin, 1999).

La mayoría de estos 79 híbridos apomícticos mostró capacidad para la reproducción sexual, es decir fueron apomícticos facultativos. Esto se evidenció cuando el análisis de grupos de semillas de estas plantas reveló picos en los histogramas que sugirieron que algunas de esas semillas se originaron a partir de sacos embrionarios apospóricos y otras a partir de sacos embrionarios meióticos. En esos casos, además del pico 2x del embrión y del pico 5x del endospermo, se observaron picos con una relación del contenido de ADN embrión:endospermo de 2:3, tal como fuera explicado anteriormente.

Los histogramas de las plantas apomícticas y sexuales siempre mostraron picos adicionales producidos por núcleos del embrión y del endospermo en estado G<sub>2</sub> del ciclo celular (Fig. 3 A y B).

La expresividad del carácter apomixis fue determinada por citometría de flujo en semillas individuales de un grupo de 36 de los 79 híbridos  $F_1$  apomícticos. En estos 36 individuos analizados, la expresividad varió de 80 a 100 %, con un promedio de 95,22 % ( $\pm 5,27$ ) (Tabla 11). Estos individuos fueron considerados como altamente apomícticos. Al menos 12 de estos híbridos apomícticos mostraron exclusivamente la relación de contenido relativo de ADN embrión: endospermo 2x:5x (Tabla 11), la cual caracteriza a las plantas apomícticas obligadas. Este pequeño potencial para reproducirse por la vía sexual es una característica común en las especies apomícticas de *Paspalum*. En estas 36 plantas altamente apomícticas, la expresividad de la sexualidad varió de 0 a 13,33 %, con un promedio de 3,26 % ( $\pm 4,77$ ) (Tabla 11).

Además, fueron observadas algunas semillas hexaploides que fueron cosechadas de algunos híbridos apomícticos (Tabla 11). El porcentaje de semillas formadas como híbridos  $B_{III}$  varió de 0 a 6,67 %, con un promedio de 1,16 % ( $\pm 1,93$ ). Estos individuos hexaploides se originan porque eventualmente se produce una falla en la partenogénesis de la ovocélula no reducida de un saco embrionario no reducido y que al ser fecundada por un gameto masculino reducido origina un híbrido  $B_{III}$  ( $2n + n$ ).



**Figura 3.** Histogramas de citometría de flujo generados a partir de semillas de híbridos interespecíficos de *Paspalum plicatulum* x *P. guenoarum*. A) Híbrido sexual mostrando un pico 2x más alto para el embrión y un pico 3x más pequeño para el endospermo. B) Híbrido apomíctico con una proporción de contenido relativo de ADN embrión:endospermo de 2x:5x. Ambos histogramas mostraron picos adicionales producidos por núcleos del embrión y del endospermo en estadio G<sub>2</sub> del ciclo celular.

**Tabla 11.** Determinación de la expresividad de la apomixis por citometría de flujo en semillas individuales de un grupo de 36 híbridos F<sub>1</sub> apomícticos.

Híbrido	Número de semillas	Proporción de semillas originadas por		
		Sexualidad (n + n) (%)	Apomixis (2n + 0) (%)	B <sub>III</sub> <sup>†</sup> (2n + n) (%)
3	40	0	100	0
4	55	0	98,18	1,82
6	50	0	100	0
9	35	0	100	0
10	51	0	100	0
12	15	0	93,33	6,67
13	40	2,50	95	2,50
15	51	0	98,04	1,96
16	15	13,33	80	6,67
20	15	0	100	0
21	15	20	80	0
22	36	0	97,22	2,78
23a	15	13,30	86,70	0
23b	52	0	98,08	1,92
31	50	0	100	0
33	56	3,57	96,43	0
34	68	2,94	91,18	5,88
44	52	11,54	88,46	0
45	50	2	96	2
52	50	0	100	0
53	54	5,55	92,59	1,85
58	61	3,28	96,72	0
62	50	0	100	0
63	49	4,08	91,84	4,08
66	25	8	92	0
68	25	8	92	0
72	25	0	100	0
74	54	3,70	92,59	0
82	50	4	96	0
83	50	4	96	0
85	51	0	98,04	1,96
86	54	0	100	0
93	50	0	100	0
96	53	3,77	92,23	0
97	51	3,92	94,12	1,96
112	48	0	100	0

#### *Determinación del nivel de ploidía de la F<sub>1</sub>*

Con el objetivo de conocer el nivel de ploidía de las plantas de la población segregante derivada del cruzamiento entre 4PT y GR19, se analizaron por citometría de flujo porciones de tejido de hoja de una muestra de los híbridos F<sub>1</sub>. Se utilizó una porción de hoja de la planta a estudiar y una cantidad comparable de tejido de hoja de una planta con nivel de ploidía conocido, en este caso la planta 4PT con  $2n = 4x = 40$  cromosomas. El número cromosómico y el nivel de ploidía de 4PT fueron determinados previamente por recuento de sus cromosomas en puntas de raíz (Sartor et al., 2009). Del mismo modo, anteriormente fueron determinados el número cromosómico y el nivel de ploidía del parental masculino GR19 ( $2n = 4x = 40$ ).

Todos los individuos de la  $F_1$  estudiados produjeron histogramas mostrando un contenido relativo de ADN similar al control 4x utilizado en este análisis (4PT). Un solo híbrido hexaploide ( $2n = 6x$ ) fue recuperado de la población  $F_1$ . Dado que la planta madre 4PT es completamente sexual, puesto que se observó que solamente produce sacos embrionarios meióticos (Sartor et al., 2009), el híbrido hexaploide que se instaló en la población podría provenir de la germinación de una semilla de alguno de los híbridos apomícticos que producen  $B_{III}$ .

### *Estudios de fertilidad*

Una importante variación fue observada para el llenado de semillas de los híbridos (Tabla 12). La proporción de espiguillas conteniendo cariopses varió de 11,30 a 55 % en condiciones de polinización abierta para los 11 híbridos que fueron analizados. Más de 17000 espiguillas maduras de estos 11 híbridos fueron consideradas y el llenado de semillas fue en promedio de 31,30 %. Un total de 6627 espiguillas de cinco híbridos diferentes fueron autopolinizadas y el llenado de semillas promedió el 9,50 % con un rango de 0,30 a 23,60 %.

**Tabla 12.** Llenado de semillas en híbridos de *Paspalum plicatulum* x *P. guenoarum*.

	Plantas híbridas (no.)	Espiguillas analizadas (no.)	Promedio y rango de espiguillas con cariopses (%)
Autopolinización	5	6627	9,50 (0,30-23,60)
Polinización Abierta	11	17376	31,30 (11,30-55)

### *Retrocruzamientos y poblaciones $F_2$ . Determinación del modo reproductivo.*

Una vez establecida la población  $F_1$ , se obtuvo una población  $F_2$  y tres poblaciones a partir de retrocruzamientos (backcross, BC). La tabla 13 indica los cruzamientos realizados, el número de progenies obtenidas, las proporciones de segregación observadas para el modo reproductivo y los ajustes de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) a distintas proporciones esperadas.

La autopolinización de la planta  $F_1$ #8 sexual produjo una  $F_2$  de 24 plantas. Los retrocruzamientos involucraron a la planta madre de la población  $F_1$ , 4PT, y a las plantas  $F_1$ #29 sexual y  $F_1$ #15 y  $F_1$ #62 apomícticas como dadores de polen y produjeron 23, 20 y 22 individuos respectivamente (Tabla 13). Estos resultados confirman las observaciones de Sartor et al. (2009) respecto a que es posible obtener poblaciones  $F_2$  y BC, involucrando a *P.*

*plicatum* 4PT y a otra especie del grupo *Plicatula*, como *P. guenoarum* GR19. Estos cruzamientos se realizaron a fin de corroborar la proporción de segregación observada para el modo de reproducción en la población  $F_1$ , mediante la clasificación de las progenies por citometría de flujo.

La autopolinización de un individuo  $F_1$  sexual o la retrocruza involucrando plantas sexuales produjo progenies completamente sexuales (Tabla 13). El análisis del modo de reproducción por citometría de flujo en semillas mostró que la autopolinización de la planta sexual  $F_1$ #8 dio origen a una progenie  $F_2$  de individuos que se reproducen exclusivamente por sexualidad (24:0). De la misma manera, se comprobó que el retrocruzamiento de 4PT x  $F_1$  sexual #29 dio lugar exclusivamente a individuos sexuales (23:0).

Los retrocruzamientos involucrando a 4PT y plantas apomícticas produjeron, como se esperaba, progenies segregantes para el modo reproductivo (Tabla 13). El análisis por citometría de flujo en semillas mostró que el cruzamiento de 4PT x  $F_1$  apomíctica #15 produjo 10 plantas sexuales y 10 apomícticas. Por otro lado, el cruzamiento de 4PT x  $F_1$  apomíctica #62 originó 8 plantas sexuales y 14 apomícticas.

#### *Segregación del carácter apomixis en especies del grupo Plicatula*

El modelo genético más ampliamente aceptado para la herencia de la apomixis en gramíneas tropicales, o de la aposporia más específicamente, considera que el carácter es controlado por un gen o alelo en dosis simple dominante con herencia tetrasómica (Savidan, 1975; Valle y Glenke, 1993). La constitución genética de los progenitores sexual y apomíctico para dicho locus sería nuliplexo (aaaa) y simplexo (Aaaa), respectivamente. La relación de segregación esperada para un carácter en esta condición en la progenie  $F_1$  sería entonces de 1:1 sexual vs. apomíctico (Fig. 4).

Sin embargo, los estudios de la herencia de la apomixis en *P. notatum*, mostraron una particularidad. Bahiagrass es de origen autotetraploide y por lo tanto se esperaba que mostrara herencia tetrasómica. Los experimentos realizados por Martínez et al. (2001) indicaron que la aposporia es efectivamente un carácter dominante, pero su segregación no correspondía directamente al modelo de herencia simple. Los autores postularon que el carácter aposporia sería determinado por un alelo simple dominante con herencia tetrasómica influenciado por un efecto letal pleiotrópico y/o penetrancia incompleta, que causa una notable distorsión en el patrón de segregación de este carácter en la progenie. Se

propuso también que, alternativamente factores letales ligados a la apomixis podrían estar contribuyendo a la distorsión de la segregación en contra del carácter.

Como se mencionó anteriormente, del cruzamiento 4PT x GR19, 127 plantas  $F_1$  fueron clasificadas como sexuales y 79 como apomíticas (Tabla 10), resultando ello en una relación de segregación de 1,6:1 sexuales vs. apomíticas (Tabla 13). El análisis de Chi cuadrado  $\chi^2$  mostró que la proporción de 127:79 se desvió significativamente del modelo esperado 1:1 ( $\chi^2_{1:1} = 11,18, p < 0,01$ ) (Tabla 13). Para corroborar este patrón de segregación observado se realizaron cruzamientos experimentales posteriores y se obtuvo una población  $F_2$  y tres poblaciones de retrocruzas con la planta 4PT, y todas las progenies fueron clasificadas según el modo reproductivo por citometría de flujo.

La autopolinización de un individuo  $F_1$  sexual y la retrocruza involucrando plantas sexuales produjo progenies completamente sexuales (Tabla 13). Como se esperaba, las proporciones observadas en estas poblaciones se ajustaron a la proporción esperada 1:0 y se desviaron significativamente de 1:1 y de 1,6:1 (Tabla 13).

Las retrocruzas involucrando a 4PT y plantas apomíticas produjeron, como se esperaba, progenies segregantes para el modo reproductivo (Tabla 13). El cruzamiento de 4PT x  $F_1$  apomítica #15 produjo 10 plantas sexuales y 10 apomíticas. Si bien esta proporción observada se ajusta a 1:1, no difiere significativamente de 1,6:1 sexuales:apomíticas (Tabla 13) que es la proporción observada en la  $F_1$  para el carácter modo reproductivo y que se espera se repita en todo cruzamiento de una planta sexual por una apomítica entre estas especies. Por otro lado, el cruzamiento de 4PT x  $F_1$  apomítica #62 originó 8 plantas sexuales y 14 apomíticas, en una proporción 1:1,75 sexuales:apomíticas, lo cual no mostró diferencias significativas respecto a 1:1 y tampoco resultó significativamente diferente de la proporción esperada 1,6:1 (Tabla 13). Por lo tanto si consideramos que para un cruzamiento sexual x apomítico en *Paspalum* se espera que la proporción de segregación sea mayor a 1 a favor de la sexualidad (Acuña et al., 2009), y si esto debiera cumplirse también en especies del grupo Plicatula, los resultados obtenidos en estos análisis indican que la distorsión a favor de las progenies sexuales ocurre en Plicatula pero es menor en este grupo que en el grupo Notata al que pertenece *P. notatum*. Por otra parte, el hecho de que sean 3 los genotipos apomíticos distintos que originaron la  $F_1$  y ambas poblaciones de retrocruza respectivamente, podría explicar porqué se observa una penetrancia distinta para el carácter en cada caso.

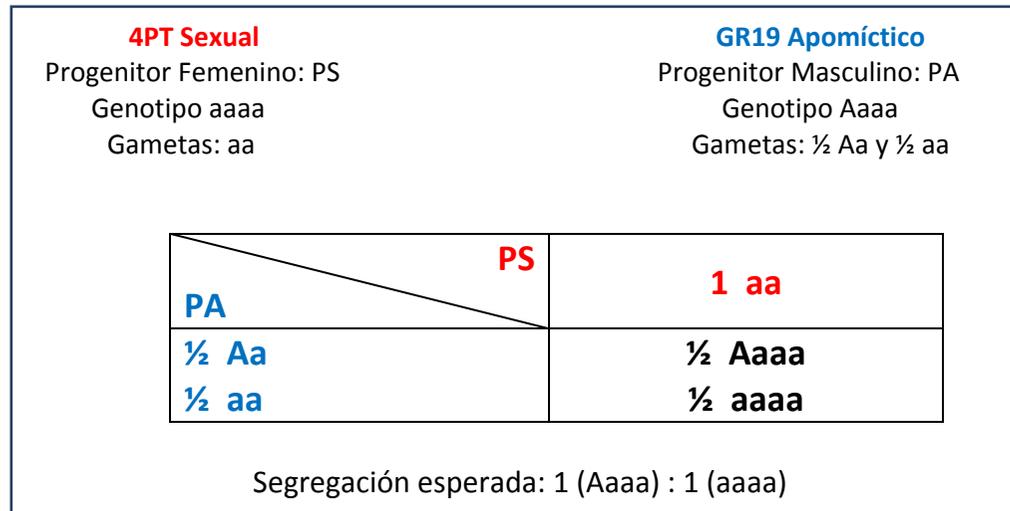
En general, las observaciones de segregación del carácter en la  $F_1$  están en concordancia con la distorsión en la segregación reportada previamente por Martínez et al. (2001) y por Acuña et al. (2009) para poblaciones experimentales de *P. notatum*. Más aún, Pupilli et al. (2001) observaron el mismo patrón de segregación de la apomixis en una población tetraploide de *P. simplex*. En aquel caso, la población derivó de la retrocruza de una planta  $F_1$  apomítica con un genotipo sexual autotetraploide inducido por colchicina y de sus 87 descendientes, 53 fueron sexuales y 34 apomíticos, segregación concordante con la proporción 1,6:1 ( $\chi^2 = 0,01$ ,  $p < 0,01$ ) y significativamente diferente de 1:1 ( $\chi^2 = 4,15$ ,  $p < 0,05$ ). Para los autores, esta proporción es consistente con un modelo de herencia tetrasómica y segregación cromatídica al azar de un alelo en dosis simple dominante, con (para la proporción esperada 15:12,  $\chi^2 = 1,16$  no es significativo) o sin ligamiento (para la proporción esperada 15:13,  $\chi^2 = 1,66$  no es significativo) a un gen letal recesivo. Las observaciones del presente trabajo de tesis coinciden con las de Pupilli et al. (2001): en ambos casos se observaron patrones de segregación con diferencias significativas respecto a la proporción 1:1, que se ajustan a 1,6:1 y que no muestran diferencias significativas respecto a 15:12 y 15:13 ( $\chi^2 = 3,10$  y 5,41 para *Plicatula*, respectivamente).

La distorsión en la segregación a favor de plantas sexuales fue observada también en la progenie de cruzamientos interespecíficos entre *P. simplex* tetraploide sexual y *P. malacophyllum* tetraploide apomítico (Pupilli et al., 2004) o *P. procurrens* (Hojsgaard et al., 2011), así como en poblaciones segregantes de otras gramíneas apomíticas (Ozias-Akins y van Dijk, 2007).

La población de híbridos  $F_1$  de 4PT x GR19 mostró distorsión en la segregación del carácter modo reproductivo a favor de los individuos sexuales. Ésto puede deberse a que la  $F_1$  representa la primera generación del cruzamiento interespecífico y que los genomas parentales no resultan completamente homólogos. Los resultados obtenidos en las poblaciones de BC pueden ser diferentes y quizás ya en este caso la posibilidad de apareamientos regulares aumente y por lo tanto disminuya la distorsión de la segregación. La distorsión observada en *Plicatula* fue menor a la reportada para *P. notatum*, lo que indica que no necesariamente todas las poblaciones de *Paspalum* se ajustarán al modelo de *P. notatum*. El modelo de segregación del carácter para especies de *Plicatula* propuesto en esta tesis representa una novedad para híbridos interespecíficos del género.

**Tabla 13.** Proporciones de segregación del modo reproductivo de la población F<sub>1</sub> y de las poblaciones originadas por autopolinización y retrocruzamientos de híbridos F<sub>1</sub> de *Paspalum plicatulum* x *P. guenoarum*.

Individuos parentales		Número de Progenies		Proporción Sexual : Apomítica	$\chi^2_{1:1}$	$\chi^2_{1,6:1}$	$\chi^2_{1:0}$
Madre	Padre	Sexuales	Apomíticas				
4PT (S)	GR19 (A)	127	79	1,6:1	11,18	0,00	30,30
Autopolinización de F <sub>1</sub> #8 (S)		24	0	1:0	24	15	0,00
Retrocruzamiento							
4PT (S)	F <sub>1</sub> #29 (S)	23	0	1:0	23	14,38	0,00
4PT (S)	F <sub>1</sub> #15 (A)	10	10	1:1	0,00	1,13	5
4PT	F <sub>1</sub> #62 (A)	8	14	1:1,75	1,64	5,89	8,90



**Figura 4.** Modelo de segregación esperada para un alelo dominante simple (A) responsable del carácter apomixis en la población F<sub>1</sub> segregante.

Los resultados de este trabajo de tesis permiten afirmar que la herencia del carácter apomixis en especies de *Panicum* tiene puntos en común con lo reportado en otras especies de *Paspalum*: la apomixis es controlada por un locus simple con distorsión de la segregación que favorece la prevalencia de genotipos sexuales.

Sin embargo, es importante considerar que actualmente ya no se habla de un *gen* como único determinante del carácter apomixis. Dada la estrecha relación entre apomixis y poliploidía, desde hace un tiempo se sabe que luego de la poliploidización el genoma de *Paspalum* es genética y epigenéticamente modificado en regiones que codifican retrotrasposones y pseudogenes lo que lleva como consecuencia a efectos moduladores de la expresión génica (Martelotto et al., 2007; Rodríguez et al., 2012). Tan importante es el escenario genético poliploide del genoma para la expresión completa de la apomixis, que en *P. notatum* la duplicación por colchicina del genoma de una planta diploide sexual produce poliploides tanto sexuales como apomícticos facultativos (Quarin et al., 2001), lo cual indica que los determinantes de la apomixis se encuentran presentes a nivel diploide pero están silenciados. Entonces, se plantea la posibilidad de que, al menos en *Paspalum*, exista para la apomixis un mecanismo de activación dependiente de la dosis génica que involucre a otros loci que controlen la expresión del carácter mediante efectos de interacción génica. Los rápidos rearrreglos genómicos (translocaciones, inserción de elementos transponibles, etc.) que ocurren como respuesta a la poliploidización pueden relocalizar genes cerca de elementos regulatorios en *cis* que pueden desregular su transcripción. Otro factor a tener en cuenta es el hecho de que la región que controla la apomixis (ACR, Apomixis Controlling Region) contiene una abundante cantidad de retroelementos (Podio et al., 2012, Calderini et al., 2006). La expresión génica de esta región podría estar mediada por estos elementos repetitivos, puesto que se sabe que los elementos transponibles en general (transposones y retroelementos) pueden interferir por varios mecanismos en la regulación génica. Al mismo tiempo, esta región que controla la apomixis contiene genes ligados al carácter, de estructura, función y posición desconocida. Algunos de estos genes son pseudogenes que se caracterizan por la desregulación constitutiva de la expresión. Aunque la expresión de estos pseudogenes podría estar relacionada al silenciamiento de sus relativos sexuales homólogos, la presencia de algunos genes que actúen como activadores positivos de la apomixis no debe ser descartada (Pupilli et al., en preparación).

El cruzamiento entre *P. plicatulum* sexual y *P. guenoarum* apomítico a nivel tetraploide abre la posibilidad de intercambiar genes entre estas dos especies, al mismo nivel de ploidía. Este mecanismo posibilita además explotar la gran variabilidad genética presente en los individuos apomíticos naturales y utilizarla para la creación de nuevos cultivares. Esta posibilidad se basa en el éxito de cruzamiento obtenido entre las dos especies (20%), el grado de fertilidad entre los híbridos (mayor al 55%), la segregación observada para el modo reproductivo en la progenie F<sub>1</sub> y el procedimiento muy simple empleado para determinar el modo reproductivo de cada híbrido. Las prácticas de cruzamientos podrían involucrar la creación de una población híbrida grande, como fue propuesto por Hanna (1995). Los segregantes apomíticos pueden ser identificados fácilmente por citometría de flujo usando una pequeña muestra de semillas de cada híbrido. Debido a que los análisis del modo reproductivo realizados en este trabajo de tesis indicaron que los híbridos pueden ser clasificados como completamente sexuales, apomíticos o apomíticos facultativos, el análisis de 10 semillas por híbrido (semilla por semilla) puede ser suficiente para clasificar cada planta por su modo reproductivo. Una vez que los híbridos apomíticos son identificados, éstos pueden entrar a pruebas de campo para evaluación agronómica y llegar al status de cultivar. Por otro lado, los híbridos sexuales pueden ser evaluados y seleccionados para ser usados como parentales femeninos en nuevos intentos de cruzamientos. Debido a que los resultados sugieren un control monogénico del modo reproductivo con la aposporia dominante sobre la sexualidad, como fue propuesto en *Paspalum notatum* (Martínez et al., 2001), la sexualidad debería estar condicionada por el genotipo homocigoto recesivo. Esto trae la posibilidad de sintetizar una población de cruzamiento tetraploide sexual a partir de híbridos de primera generación formados por el cruzamiento de la planta 4PT con una variedad de genotipos tetraploides apomíticos de *P. guenoarum*. Este esquema de cruzamiento fue propuesto por Miles (2007) para programas de cruzamiento de *Brachiaria*. Brevemente, el procedimiento implica la obtención de una población tetraploide sintética que permanecería completamente sexual generación tras generación y puede ser manejada por métodos simples de selección masal. Ya que el objetivo para los programas de cruzamientos sería la obtención de cultivares solamente apomíticos, la creación de una población de cruzamiento tetraploide sexual sintética representa un paso inicial, a ser seguido por el cruzamiento de esta población con uno o más genotipos apomíticos de elite (*P. plicatulum* o *P. guenoarum*) para generar poblaciones

híbridas de las cuales se podrá seleccionar genotipos apomícticos segregantes superiores a ser desarrollados al status de cultivar. De hecho, a partir de la población F<sub>1</sub> híbrida segregante obtenida en este trabajo, híbridos apomícticos y sexuales han sido seleccionados para su evaluación en estudios a campo, en el caso de los apomícticos, y para la formación de una población sexual tetraploide sintética, en el caso de los sexuales.

### *Conclusiones*

El cruzamiento entre *P. plicatum* sexual y *P. guenoarum* apomíctico a nivel tetraploide produjo una población híbrida interespecífica de 211 plantas F<sub>1</sub>, segregante para el modo reproductivo. De manera global, estos individuos heredaron más características del padre GR19 que de la madre 4PT, lo cual indicó el origen híbrido de la progenie.

La herencia del carácter apomixis en especies de *Plicatula* mostró una distorsión en la segregación para el carácter modo reproductivo, a favor de los individuos sexuales, lo cual concuerda con los antecedentes para el patrón de herencia de la apomixis en *Paspalum*. Sin embargo, dado que la distorsión observada en la población estudiada en este trabajo fue menor a la reportada para *P. notatum* es posible afirmar que no necesariamente todas las poblaciones de *Paspalum* se ajustarán al modelo de *P. notatum*. El modelo de segregación del carácter para especies de *Plicatula* propuesto en esta tesis representa una novedad para híbridos interespecíficos del género.

La posibilidad de hibridación entre *P. plicatum* y *P. guenoarum* a nivel tetraploide y el grado de fertilidad observado entre los híbridos abren nuevas posibilidades para el mejoramiento vegetal a través de cruzamientos y transferencia de genes entre estas especies de *Plicatula*. Los resultados de esta tesis indican que es posible saltar el cuello de botella que supone la falta de biotipos sexuales en *P. guenoarum* para el mejoramiento vegetal a través de cruzamientos. A partir de estos resultados, se espera que otras especies tetraploides apomícticas del grupo *Plicatula* de *Paspalum* puedan estar involucradas en este esquema de cruzamiento interespecífico.

Parte 2. Citogenética de *Paspalum guenoarum* y sus híbridos con *P. plicatulum*. Análisis de segregación de los marcadores moleculares.

*Estudio de la meiosis en GR19 y cuatro de sus híbridos con 4PT*

Las configuraciones cromosómicas en diacinesis y metafase I de la meiosis fueron analizadas en los microsporocitos de *P. guenoarum* y de cuatro de sus híbridos F<sub>1</sub> con *P. plicatulum*. En *P. guenoarum*, los cromosomas se asociaron principalmente como bivalentes (II) y cuadrivalentes (IV) (Tabla 14, Fig. 5A). En los cuatro híbridos F<sub>1</sub> estudiados, las configuraciones cromosómicas meióticas fueron similares a aquellas observadas en el progenitor GR19, principalmente asociaciones bivalentes y cuadrivalentes, con ocasionales univalentes (I) y trivalentes (III) (Fig. 5B).

**Tabla 14.** Configuraciones cromosómicas meióticas de *Paspalum plicatulum* tetraploide sexual y *P. guenoarum* tetraploide apomíctico y sus híbridos interespecíficos en diacinesis y metafase I.

Especies o Híbridos	Número de plantas	No. de CMP <sup>†</sup>	Promedio y rango ( ) por célula			
			I	II	III	IV
<i>P. plicatulum</i> 4PT (S) <sup>‡§</sup>	1	53	0,06 (0-1)	14,20 (8-18)	0,06 (0-1)	2,80 (1-7)
<i>P. guenoarum</i> GR19 (A) <sup>¶</sup>	1	21	1,38 (0-6)	12,33 (7-18)	0,09 (0-1)	3,38 (1-6)
Híbridos 4PT x GR19	4	38	1,65 (0-6)	12,26 (4-18)	0,50 (0-2)	3,07 (1-7)

<sup>†</sup>CMP, células madre del polen.

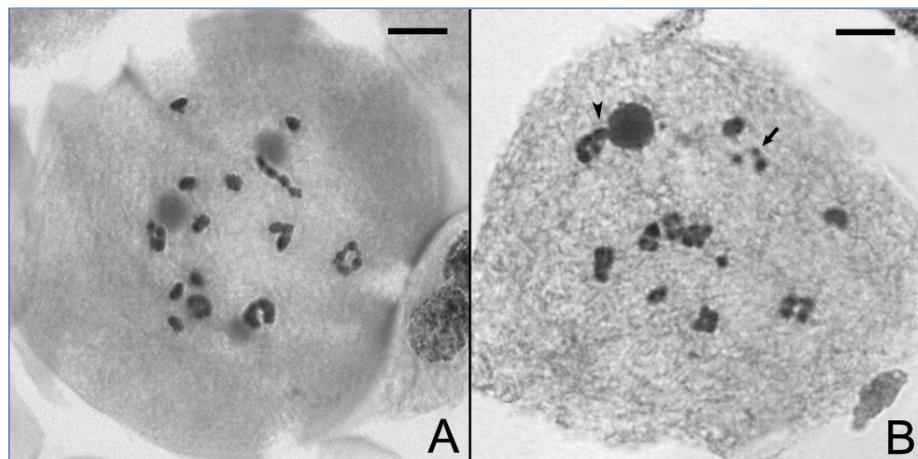
<sup>‡</sup>S, planta sexual.

<sup>§</sup>Datos de Sartor et al. (2009).

<sup>¶</sup>A, planta apomíctica.

Las configuraciones cromosómicas meióticas en GR19 mostraron un promedio más alto de cuadrivalentes (3,38 por célula, con un máximo de 6 por célula; Tabla 14) que los previamente reportados para otras accesiones de la misma especie. Pritchard (1970) mencionó un promedio de 0,82 cuadrivalentes por célula en una planta tetraploide coleccionada en Paraguay y sugirió que *P. guenoarum* podría haberse originado por hibridación al nivel de especie. Burson y Bennett (1971a) reportaron una media de 1,84 cuadrivalentes con un máximo de cinco cuadrivalentes por célula; ésto indicaría que la especie es un alotetraploide segmentario o bien, un autotetraploide. Los autores propusieron que debido a que la especie mostró una baja frecuencia de cuadrivalentes y

ninguna célula madre del polen tuvo 10 cuadrivalentes, *P. guenoarum* era probablemente un alopoliploide segmentario. Esto implicaría un origen híbrido de dos especies genómicamente relacionadas. En base a las asociaciones cromosómicas observadas por Burson y Bennett (1971a) y los resultados del presente trabajo, es posible postular que *P. guenoarum* se originó probablemente por autoploidía antes que por hibridación interespecífica. El comportamiento cromosómico reportado por Sartor et al. (2009) para la planta tetraploide sexual de *P. plicatum*, obtenida experimentalmente a través del tratamiento con colchicina de un biotipo diploide, apoya esta propuesta. La planta 4PT promedió 2,80 cuadrivalentes por célula con un máximo de siete por célula (Sartor et al., 2009), mientras que en GR19 se registró un promedio más alto de cuadrivalentes por célula (3,38) y un máximo de 6 cuadrivalentes. Los datos de Sartor et al. (2009) indican que al menos en algunas especies de este grupo no necesariamente los 40 cromosomas formarán 10 cuadrivalentes en la meiosis.



**Figura 5.** Asociaciones cromosómicas en *P. guenoarum* y sus híbridos interespecíficos con *P. plicatum*. A) Diacinesis en *P. guenoarum* con ocho bivalentes y seis cuadrivalentes. B) Diacinesis en un híbrido de *P. plicatum* x *P. guenoarum* con un univalente, cuatro bivalentes, un trivalente y siete cuadrivalentes. La punta de flecha apunta a un bivalente superpuesto con un cuadrivalente y la flecha indica el trivalente. La barra mide 5  $\mu$ m.

Usualmente, el criterio citogenético utilizado en especies poliploides para juzgar el origen de las mismas por autoploidía o por hibridación de los genomas de dos especies cercanamente emparentadas (aloploidía segmentaria) es el número medio y el rango de asociaciones cromosómicas multivalentes en meiosis. Sin embargo, la proporción de

cromosomas asociados como multivalentes puede variar. Gilles y Randolph (1951) fueron los primeros en reportar que en autopoliploides inducidos ocurre un cambio gradual que lleva de la formación de sinapsis de tipo multivalente a una de tipo bivalente. Estos autores observaron los apareamientos cromosómicos en una raza autotetraploide de maíz, por un período de 10 años y concluyeron que las asociaciones cromosómicas multivalentes características de la mayoría de los autopoliploides de origen reciente no necesariamente persisten indefinidamente en las generaciones siguientes. Existe una tendencia para los autopoliploides, tanto naturales como inducidos, de adquirir gradual o rápidamente las características citológicas de un diploide (Swaminathan y Sulbha, 1959). Si esto sucede de tal manera, 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 está bajo la influencia de procesos de diploidización o bajo el control genético del apareamiento cromosómico.

Más aún, *P. guenoarum* tetraploide mostró un número promedio aún mayor de cuadrivalentes por célula que el observado en el autotetraploide obtenido experimentalmente de *P. plicatulum* (4PT). Esto sugiere fuertemente que *P. guenoarum* puede haberse originado por autoploidía.

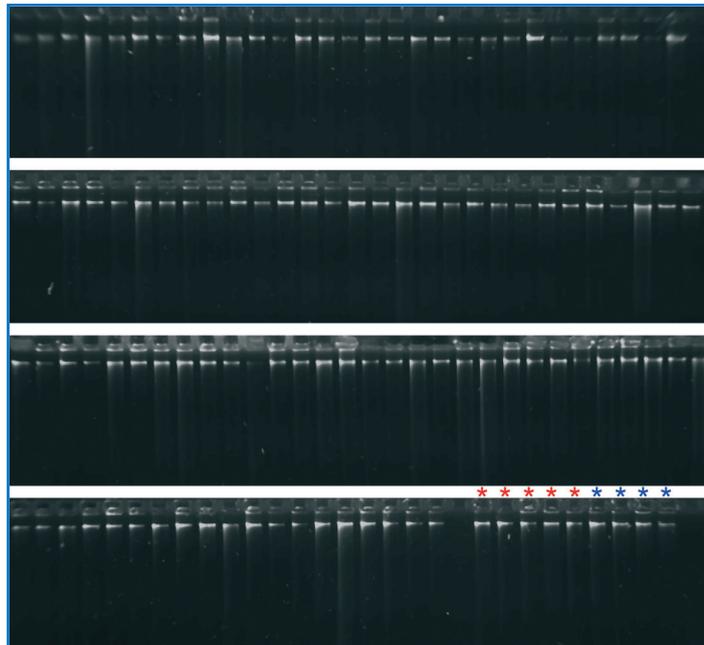
La observación de las asociaciones cromosómicas en los híbridos tetraploides de *P. plicatulum* x *P. guenoarum* y sobre todo la formación de asociaciones de cuadrivalentes indican que las dos especies comparten el mismo complemento genómico básico.

Desde que Saura (1941) observó  $2n = 40$  cromosomas en *P. plicatulum*, muchos autores han reportado el mismo número cromosómico para varias accesiones, indicando que la tetraploidía es la regla (Gates et al., 2004). Sin embargo, algunos diploides ( $2n = 20$ ) han sido ocasionalmente reportados desde que Brown (1950) descubrió un citotipo diploide. Las razas tetraploides son todas apomíticas (Pritchard, 1970; Bashaw et al., 1970; Burson y Bennett, 1971b), mientras que los diploides se reproducen sexualmente (Espinoza y Quarín, 1997). No se han descubierto tetraploides sexuales creciendo en la naturaleza. Por el contrario, sólo biotipos tetraploides apomíticos son conocidos para *P. guenoarum* (Pritchard, 1970; Burson y Bennett, 1971b) y ninguna planta diploide ha sido descubierta para esta especie hasta el presente.

*Generación de marcadores moleculares y análisis de segregación en la población de mapeo*  
*Marcadores moleculares*

Antes de exponer los resultados sobre la determinación del tipo de herencia de *P. plicatum* tetraploide sexual y de *P. guenoarum* tetraploide apomítico, realizada mediante el análisis de marcadores moleculares, es necesario en este punto explicar las etapas en las que se obtuvieron dichos marcadores y los consiguientes resultados.

Se realizaron extracciones de ADN genómico de 109 individuos F<sub>1</sub>. En la figura 6 se observa la fotografía de un gel de agarosa al 1 % con las muestras de ADN de las 109 plantas y de sus parentales.



**Figura 6.** Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio en el que se observan las muestras de ADN genómico de 109 híbridos F<sub>1</sub>, del parental materno 4PT (5 muestras señaladas con estrellas rojas) y del parental paterno GR19 (4 muestras señaladas con estrellas azules).

Los marcadores moleculares de AFLP fueron generados en tres etapas sucesivas distintas, revelados y analizados según se detalla en la sección Material y Métodos.

Luego de la digestión del ADN de las 109 F<sub>1</sub>, 4PT y GR19, la digestión con las enzimas *EcoRI* y *MseI* y la ligación de los adaptadores, se realizaron las reacciones de preamplificación

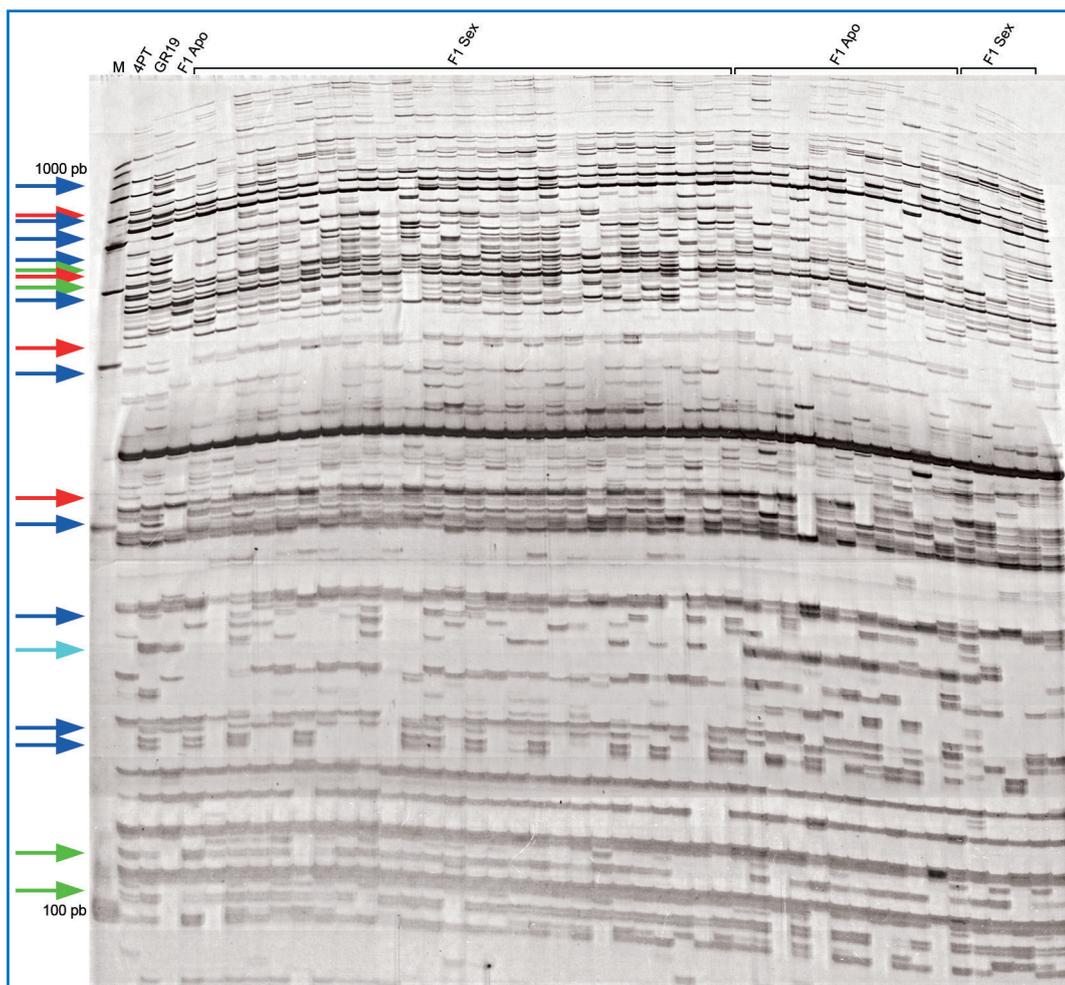
con los cebadores E01 y M01. Los productos generados en este primer paso de amplificación se emplearon en todas las amplificaciones selectivas posteriores.

En primer lugar se realizaron amplificaciones selectivas y se ensayaron 50 combinaciones de cebadores *EcoRI* (E) y *MseI* (M) mediante la metodología de BSA, empleando el ADN de los genotipos parentales 4PT y GR19 y grupos generados in vitro con ADN de 10 plantas sexuales y 10 apomícticas (bulk sexual y bulk apomíctico, respectivamente). Las combinaciones de cebadores ensayadas fueron: E31M31, E31M32, E31M33, E31M34, E31M35, E31M36, E31M37, E31M39, E31M42, E32M31, E32M32, E32M33, E32M34, E32M35, E32M36, E32M37, E32M39, E32M42, E33M31, E33M32, E33M33, E33M37, E33M38, E34M32, E34M33, E34M34, E34M35, E34M37, E34M38, E34M39, E34M40, E34M42, E35M32, E35M33, E35M34, E35M35, E35M37, E35M39, E34M40, E35M42, E36M32, E36M33, E36M34, E36M35, E36M37, E36M38, E36M39, E38M32, E38M38, E38M39. Las primeras 37 combinaciones que fueron probadas permitieron generar más de 500 marcadores con un porcentaje promedio de polimorfismo entre los padres del 20 % (variando entre 5 y 36 %). Este paso permitió seleccionar aquellas combinaciones que produjeron patrones de amplificación con bandas claras y perfectamente distinguibles, así como las que revelaron mayor polimorfismo entre los padres y las que mostraron bandas específicas del parental GR19 y del bulk apomíctico, para emplearlos posteriormente con toda la población. Este procedimiento de elección de combinaciones de cierta manera sesgó la búsqueda de marcadores moleculares hacia aquellos posiblemente ligados al carácter apomixis lo cual resultó de suma utilidad al momento de caracterizar la región genómica en la que mapeó el carácter.

Luego, mediante la estrategia de mapeo selectivo (Vision et al., 2000) se seleccionaron 89 plantas  $F_1$  del total de 109 híbridos. Se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores E-M: E31M32, E31M35, E31M42, E34M32, E35M33, E35M34, E36M32. Mediante la función "*Similarity of individuals*" del programa computacional de mapeo genético JoinMap<sup>®</sup> 3.0 se comparó el perfil genético de las 109  $F_1$  obtenido con estas combinaciones. Para excluir o mantener a un individuo dentro de la población de mapeo fueron considerados los criterios mencionados en Material y Métodos. Además, fueron excluidas 12  $F_1$ , entre ellas 2 apomícticas, que presentaron menos de 10 bandas segregantes desde el genotipo paterno GR19. También fueron excluidos 4 genotipos sexuales que mostraron más de 10 datos perdidos. De esta manera, se excluyeron 20 plantas de los análisis posteriores y

la población de mapeo quedó conformada por 89 híbridos  $F_1$ : 55 sexuales y 34 apomícticos, manteniéndose la proporción de segregación 1,6:1 sexuales:apomícticos.

Finalmente, las combinaciones de cebadores E31M33, E32M33, E32M39, E33M32, E33M33, E34M35, E34M42, E35M32, E35M42, E36M33, E36M37 y E36M38 fueron ensayadas en las 89  $F_1$  de la población. De estas combinaciones, solamente 2 no amplificaron o dieron un patrón de amplificación inespecífico o muy poco informativo. A estos nuevos datos se le sumaron los de las 7 combinaciones mencionadas anteriormente. En la figura 7 se muestra un gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata donde se observan los productos de las amplificaciones selectivas obtenidos con la combinación de cebadores E34M42 en parte de la población de mapeo.



**Figura 7.** Marcadores de AFLP generados en la población de mapeo mediante la combinación de cebadores E34M42. M: marcador de peso molecular *Cien Marker*. 4PT: progenitor sexual, *P. plicatum* tetraploide sexual. GR19: progenitor apomítico, *P. guenoarum* tetraploide apomítico. F1 Sex: progenie híbrida F<sub>1</sub> sexual. F1 Apo: progenie híbrida F<sub>1</sub> apomítica. Las flechas rojas, azules y verdes indican algunos de los marcadores maternos, paternos y biparentales analizados, respectivamente. La flecha celeste indica un marcador que mapeó a 4 cM del carácter apomixis.

### *Análisis de segregación*

Debido a que la población de mapeo es una familia tipo F<sub>1</sub> derivada del cruzamiento de dos genotipos tetraploides altamente heterocigotos, distintas configuraciones alélicas para los diferentes loci examinados fueron esperadas (Ritter et al., 1990). Los marcadores de AFLP se analizaron con los datos obtenidos de la totalidad de la población de mapeo (89 individuos). Como se mencionó anteriormente, los datos de cada genotipo parental fueron analizados independientemente. Para cada combinación de cebadores se determinó la

presencia de: a) *marcadores maternos*, b) *marcadores paternos*, c) *marcadores maternos/paternos* o *biparentales*, fragmentos segregantes provenientes de ambos progenitores. En la tabla 15 se muestra el número de marcadores maternos, paternos y biparentales de AFLP obtenidos en la población de mapeo.

**Tabla 15.** Tipos de marcadores moleculares de AFLP generados en la población de mapeo tetraploide entre 4PT y GR19.

Tipo de marcador	AFLP
Materno	85
Paterno	140
Biparental	120
Total	345

En conjunto, las 17 combinaciones ensayadas generaron un promedio de 21 fragmentos de amplificación por combinación permitiendo la evaluación de 345 marcadores (marcadores maternos, paternos y biparentales). En promedio se obtuvieron 5 marcadores maternos, 8 paternos y 7 biparentales por cada combinación de cebadores de AFLP.

La configuración alélica de cada locus fue determinada comparando la segregación observada de los mismos con la segregación cromosómica esperada tanto para la herencia tetrasómica como disómica, por medio de la prueba de  $\chi^2$  con una probabilidad asociada  $p > 0,01$  (ver tabla 8 en Material y Métodos). De acuerdo a esto, los 85 marcadores maternos y los 140 paternos fueron clasificados como alelos en dosis simple (Aaaa, ADS) o alelos en dosis doble (AAaa, ADD). En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos y se indica la segregación y el número de marcadores presentes para cada tipo de segregación. En total, 51 marcadores (14 maternos y 37 paternos) mostraron distorsión de la segregación debido a que no se ajustaron a ninguno de los valores esperados. Entre los marcadores distorsionados paternos, 21 se ajustaron a una distorsión de la segregación de 1:1,6 (presencia:ausencia), coincidente con la distorsión del carácter apomixis.

**Tabla 16.** Relaciones de segregación observadas para los 85 marcadores maternos y los 140 paternos analizados en la población de mapeo.

Marcador	Segregación de marcadores						Totales
	ADS	ADD			Distorsionados <sup>a</sup>		
	1:1	5:1	5:1/3:1 <sup>b</sup>	3:1	1:1/1:1,6 <sup>b</sup>	1:1,6	
Maternos	44	3	14	10	-	-	14
Paternos	34	4	11	15	39	21	37

<sup>a</sup>: marcadores con segregación distorsionada.

<sup>b</sup>: marcadores que ajustan simultáneamente a las dos relaciones de segregación.

En la tabla 17 se muestran los datos de segregación de los 120 marcadores moleculares presentes en ambos genotipos parentales y que segregan en la población. Cincuenta y siete marcadores ajustaron a una relación 3:1 correspondiente a configuraciones del tipo Aaaa en ambos progenitores, 14 resultaron distorsionados y el resto (49) presentó relaciones de segregación para configuraciones AAaa x Aaaa (o viceversa) y AAaa x AAaa (ver tabla 8 en Material y Métodos) que en todos los casos ajustaron para uno de los dos tipos de herencia posibles 11:1/7:1 o 35:1/15:1, o ambos, según sea el tipo de herencia polisómica/disómica, respectivamente.

**Tabla 17.** Relaciones de segregación observadas para los 120 marcadores segregantes desde los dos genotipos 4PT y GR19 en la población de mapeo.

Marcador	Segregación de marcadores		Distorsionados
	3:1	(11:1/7:1)+(35:1/15:1)	
Maternos/Paternos	57	49	14

*Determinación del tipo de herencia de P. plicatulum tetraploide sexual y de P. guenoarum tetraploide apomítico mediante el análisis de marcadores moleculares*

La autoploidía frente a la aloploidía implica diferencias en la capacidad para intercambiar material genético entre los diferentes genomas que forman el poliploide. Si la arquitectura citogenética de la especie es desconocida, diferentes modelos de segregación deben ser considerados al estudiar el control genético de la apomixis (Sherwood et al., 1994; Pupilli et al., 1997). Aunque el análisis del apareamiento cromosómico puede dar una idea del tipo de herencia (disómica o polisómica), los estudios citogenéticos proveen sólo

información limitada acerca del potencial de los diferentes genomas de un autotetraploide para recombinar (Kimber, 1984). Se considera que las relaciones de segregación de marcadores moleculares son el método más exacto conocido actualmente para determinar el tipo de herencia e inferir así el origen del poliploide, con relaciones mayoritarias de segregación polisómicas o disómicas que sugieren autoploidía o aloploidía respectivamente (Soltis y Riesenber, 1986; Krebs y Hancock, 1989; Qu y Hancock, 1995).

Se realizaron análisis de segregación de los marcadores moleculares de AFLP obtenidos con el objetivo de aportar pruebas genéticas para determinar el tipo de herencia característico de *P. plicatum* tetraploide sexual y de *P. guenoarum* tetraploide apomítico. Los datos correspondientes a cada uno de los genotipos parentales, 4PT y GR19, se analizaron por separado y se examinaron las relaciones de segregación de los marcadores ADD, considerando que las relaciones de 5:1 y 3:1 son indicativas de herencia polisómica (posible indicador de autoploidía) o disómica (posible indicador de aloploidía), respectivamente.

Se analizaron los resultados obtenidos con 17 combinaciones de cebadores de AFLP. Del total de fragmentos obtenidos, 27 marcadores maternos y 30 marcadores paternos segregaron como alelos en doble dosis (ADD). De ellos, 3 y 4 marcadores ajustaron exclusivamente a una relación de segregación 5:1 en 4PT y en GR19, respectivamente (Tabla 16). Otro grupo de 25 marcadores (14 maternos y 11 paternos) segregó con valores que ajustaron a la relación 5:1 pero que no se pudieron distinguir estadísticamente de la relación 3:1 debido al tamaño de la población. Todos estos marcadores indican que ambos genotipos, sexual y apomítico, presentan herencia de tipo polisómica (son autoploides). Los valores de segregación 5:1 sólo pueden explicarse considerando los 4 cromosomas como homólogos y segregación al azar de los mismos en la meiosis. Por otro lado se observaron también 10 ADD maternos y 15 ADD paternos cuyas relaciones de segregación ajustaron exclusivamente a 3:1, lo que indica herencia de tipo disómica. Posiblemente dichos marcadores se localizan en regiones genómicas de 4PT y GR19, respectivamente, donde ocurre apareamiento preferencial de cromosomas ya que esta relación de segregación corresponde exclusivamente a una herencia disómica. Estos resultados están de acuerdo con la observación de un número importante de asociaciones de cromosomas en configuraciones bivalentes en estas especies.

Considerando estos datos de manera conjunta, es posible afirmar que *P. guenoarum* GR19 es de origen autotetraploide, como *P. plicatulum* 4PT y que algunos sectores del genoma presentarían herencia de tipo disómica (indicados por los marcadores 3:1). Es posible que en ambos genotipos (4PT y GR19) algunos de los homólogos se apareen de manera preferencial, presentando herencia disómica.

El análisis citogenético de GR19 y de sus híbridos con 4PT indicó que una alta proporción de cromosomas formaron asociaciones cuadrivalentes. Esta evidencia también puede interpretarse como un fuerte indicativo del origen autotetraploide de la especie, como lo sugieren los resultados de Burson y Bennett (1971a) y también de que 4PT y GR19 comparten el mismo complemento genómico básico. Sin embargo, debido a que el número de configuraciones cuadrivalentes varió ampliamente (1 a 6 IV en GR19 y 1 a 7 en los híbridos F<sub>1</sub>) y a la presencia frecuente de cromosomas formando asociaciones bivalentes, en teoría es posible detectar ambos tipos de segregación, disómica o tetrasómica, en estas especies.

Como los ADD no se pueden mapear por la metodología convencional, no se los pudo asignar a ninguno de los grupos de ligamiento definidos en este trabajo y por lo tanto es aún desconocido si corresponden a regiones genómicas específicas o si se encuentran distribuidos a lo largo del genoma.

Estudios citogenéticos realizados en *Vaccinium corymbosum* L. (arándano azul) demostraron que si bien la especie exhibió un alto número de cromosomas en configuración de bivalentes, cuando se estudió el tipo de herencia usando marcadores moleculares ésta resultó ser de tipo polisómica (los bivalentes se formaban al azar en cada evento de meiosis) (Qu y Hancock, 1998). Este antecedente lleva a considerar el hecho que, por un lado la mera presencia de cromosomas formando una u otra configuración durante la meiosis no puede considerarse en sí como un indicador confiable de que las especies de origen aloploide presenten siempre herencia disómica y las autopoliploides herencia polisómica; por otro lado, el complemento de estudios empleando herramientas de distintas disciplinas, la citogenética y la biología molecular en este caso, puede proporcionar una visión más amplia de los procesos biológicos investigados.

El comportamiento cromosómico de los híbridos F<sub>1</sub> en meiosis se suma a la posibilidad de hibridación interespecífica y al grado de fertilidad observado entre los mismos

mencionado anteriormente, abriendo nuevas posibilidades para el mejoramiento vegetal a través de cruzamientos y transferencia de genes entre estas especies del grupo Plicatula.

### *Conclusiones*

*Paspalum plicatulum* 4PT y *P. guenoarum* GR19 presentan en general una herencia de tipo tetrasómica, corroborando el origen autoploiploide propuesto en base a las observaciones citogenéticas de ambas especies llevadas a cabo en este trabajo de tesis. Asimismo, estos datos citogenéticos permiten concluir que *P. plicatulum* y *P. guenoarum* comparten el mismo complemento genómico básico. Sin embargo, ciertas regiones de los genomas de estas especies exhiben herencia disómica, lo que sugiere que estarían atravesando por un proceso de diploidización.

## **Sobre la localización del locus de la apomixis en especies del grupo *Plicatula***

### **Los mapas de ligamiento genético a nivel tetraploide de *Paspalum plicatum* sexual y *P. guenoarum* tetraploide apomítico basados en marcadores moleculares de AFLP.**

El desarrollo de los mapas de ligamiento genético en especies del grupo *Plicatula* se llevó a cabo siguiendo la serie de pasos necesarios para la obtención de mapas en especies autopoliploides, como se detalla en Material y Métodos. Brevemente, a) determinación de la dosis alélica de cada marcador, b) selección de marcadores en simple dosis cuya segregación por presencia:ausencia es siempre 1:1, c) análisis de ligamiento y determinación de los grupos de cosegregación a un determinado LOD score, d) cálculo de las distancias y ordenamiento de los distintos loci, e) reunión de los grupos de ligamiento y asignación de posibles cromosomas homólogos, entre las especies (Ripol et al., 1999).

La importancia de determinar el modo de herencia de estas especies radica en el hecho de que diferentes estrategias de mapeo deberían ser adoptadas en caso de herencia disómica o tetrasómica cuando el objetivo es establecer la posición de un carácter particular en un mapa genético. Sin embargo, las dificultades que surgen del mapeo en poliploides pueden ser salteadas analizando aquellos fragmentos de ADN representados por una simple dosis (considerado un alelo simple) y que por lo tanto segrega en una proporción 1:1 en la población de plantas heterocigotas (Wu et al., 1992; Sorrels et al., 1992). La eficiencia del método depende del número de alelos en simple dosis detectables en la población de mapeo y, por lo tanto, del nivel de heterosis del genotipo a ser mapeado. Dado que se espera un alto nivel de heterosis en los poliploides apomíticos (Clausen, 1961; Pamilo, 1987) y que el fenotipo apomítico es detectable a nivel tetraploide (Quarin, 1992), la posición del carácter apomixis en los cromosomas de *P. guenoarum* puede identificarse mediante la construcción de un mapa genético a nivel tetraploide.

En primer lugar, los marcadores moleculares derivados de la meiosis materna y paterna fueron analizados por separado. Se confeccionaron dos archivos distintos conteniendo los datos de segregación de los marcadores de AFLP de cada genotipo parental, obtenidos con 17 combinaciones de cebadores en los 89 individuos de la población de mapeo. Un archivo contenía solamente los datos de los marcadores segregantes a partir de

la planta madre (marcadores maternos) y otro, solamente los marcadores que segregaron del padre (marcadores paternos); el carácter apomixis, segregante desde el progenitor GR19 y presente en proporción 1:1,6 en la población, se incluyó en éste último. Un tercer archivo independiente se confeccionó con los marcadores segregantes presentes en ambos progenitores denominados marcadores biparentales o puentes alélicos, presentes en dosis simple en los dos genotipos parentales y cuya segregación esperada es 3:1.

A partir de los marcadores maternos y paternos se seleccionaron solamente los marcadores de tipo ADS segregantes de uno u otro parental, en proporción 1:1 en la población. Luego, se sumaron al archivo paterno los marcadores paternos con distorsión en la segregación que se ajustaron a la proporción 1:1,6 al igual que el carácter apomixis. Finalmente, se agregaron a ambos archivos los marcadores de tipo puente alélico con segregación 3:1. A partir de estos tres tipos de marcadores moleculares se construyeron dos mapas de ligamiento (el mapa materno y el mapa paterno) correspondientes a cada progenitor utilizando el programa JoinMap 3.0 (Ooijen van y Voorrips, 2001). En aquellos casos donde el mismo marcador de tipo puente alélico se ubicó en grupos de ligamiento provenientes de los dos genotipos parentales se identificaron los cromosomas homólogos del progenitor sexual y del apomíctico.

Debido a que con JoinMap 3.0 los grupos de cosegregación se definen sobre la base de ligamientos en fase de acoplamiento solamente, cada grupo de cosegregación corresponde a un único cromosoma homólogo de los posibles cromosomas de cada juego (Ripol et al., 1999; Grivet et al., 1996). Es decir, tanto en el caso de *Paspalum plicatum* 4PT como de *P. guenoarum* GR19, los cuales son tetraploides con  $2n = 4x = 40$  cromosomas, el número teórico esperado de grupos de cosegregación en cada mapa de ligamiento completo es de 40.

#### *Construcción del mapa marco de 4PT*

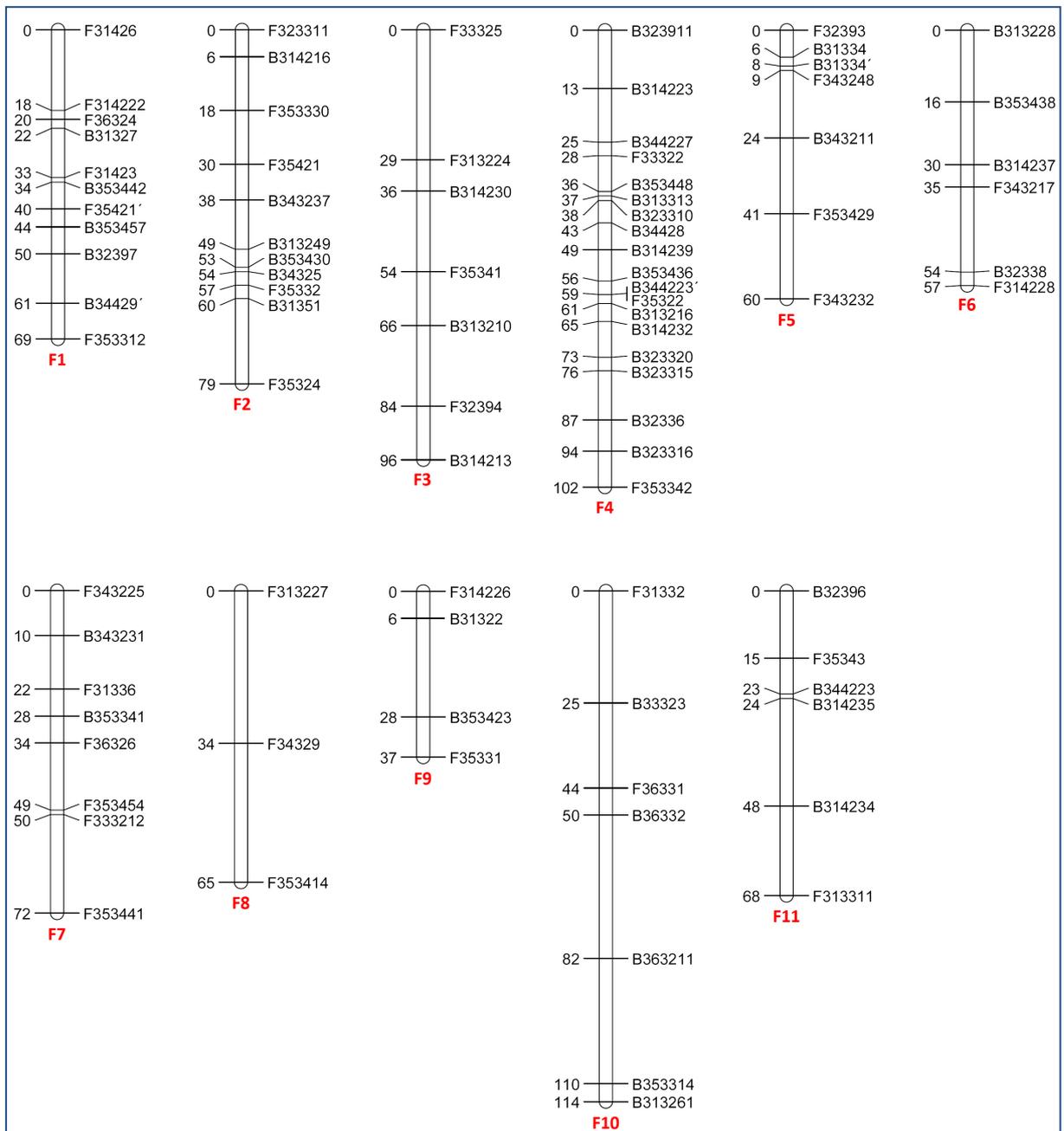
Los datos de segregación de 44 marcadores ADS (1:1) maternos (Tabla 16) y 57 marcadores tipo puente alélico (3:1) (Tabla 17) fueron utilizados para la construcción del mapa de ligamiento genético marco del genotipo tetraploide sexual de *P. plicatum*. Los grupos de ligamiento fueron definidos utilizando un LOD score = 4.0 – 3.0 y un valor máximo de recombinación ( $\theta$ ) = 0,45. Con estos valores umbrales fue definido un total de 11 grupos de cosegregación. Para la definición de los grupos de cosegregación se utilizó el comando

“Calculate” del programa JoinMap 3.0, luego de lo cual se seleccionaron solamente los agrupamientos de marcadores a LOD = 3.0 y 4.0 con más de dos marcadores. Posteriormente mediante el comando “Population”, “Create Groups for Mapping” se definieron los grupos de ligamiento. El ordenamiento de los marcadores dentro de cada grupo de cosegregación se determinó mediante el comando “Mapping”. Finalmente se asignaron 28 marcadores a LOD = 3.0 a 6 grupos de cosegregación ya establecidos y 33 marcadores a LOD = 2.0 a 11 de estos grupos, con un valor máximo de recombinación ( $\theta$ ) = 0,49.

El mapa materno consistió en 89 marcadores (88,11 % del total) de los cuales 39 fueron de tipo materno y 50 de tipo puente alélico (Fig. 8). Estos marcadores fueron asignados a 11 grupos de cosegregación cubriendo una distancia total de 819 cM. Para identificar a cada marcador materno, se agregó la letra F (femenino) precediendo a los cuatro números que indican la combinación de cebadores de AFLP empleada; un quinto y eventualmente un sexto número indicaron el orden de migración en el gel del marcador registrado para esa combinación. Los grupos de cosegregación fueron nombrados con la letra F, y numerados de 1 a 11. La distancia promedio entre marcadores fue de 10,50 cM, y la distancia entre los mismos varió en un rango de 0 a 34 cM. El tamaño de los grupos de ligamiento varió entre 37 y 114 cM, con un promedio de 74,45 cM. El número promedio de marcadores por grupo fue 8,09, con un rango de 3 a 19 marcadores (Fig. 8). Doce marcadores (11,88 %) permanecieron sin asociarse a ninguno de los grupos establecidos.

Para la estimación del largo del genoma esperado [E(G)] se utilizó el método de Hulbert modificado por Chakravarti (Chakravarti et al., 1991) según se describe en Material y Métodos  $\{E(G) = [n(n-1)d] / k\}$ . El cálculo se realizó a LOD = 2.0, se consideraron los 89 marcadores posicionados en el mapa (n) que generaron un total de 289 pares de marcadores ligados en acoplamiento (k) y cuya mayor distancia fue de 34 cM (d), resultando  $E(G) = [89(89-1)34] / 289 = 921,41$  cM. Por lo tanto, el porcentaje del genoma mapeado hasta el momento para el progenitor sexual sería aproximadamente del 88,88 %. Sin embargo, la cantidad de grupos de cosegregación detectados con respecto al máximo teórico esperado fue baja. Esto puede ser debido a que posiblemente muchos sectores del genoma presentan herencia polisómica y por consiguiente marcadores en múltiples dosis, lo cual disminuiría la eficiencia en la detección de los grupos de cosegregación. Es de esperar

que la generación de un mayor número de marcadores y la detección de nuevos ADS permita una mayor cobertura del genoma (Wu et al., 1992; Qu y Hancock, 2001).



**Figura 8.** Mapa de ligamiento genético del genotipo tetraploide sexual ( $2n = 2x = 40$ ) 4PT de *P. plicatum*. Los nombres de los marcadores y las distancias en cM (función de Kosambi) se indican a la derecha y a la izquierda, respectivamente. Los grupos de cosegregación fueron establecidos a LOD score = 4.0 – 3.0.

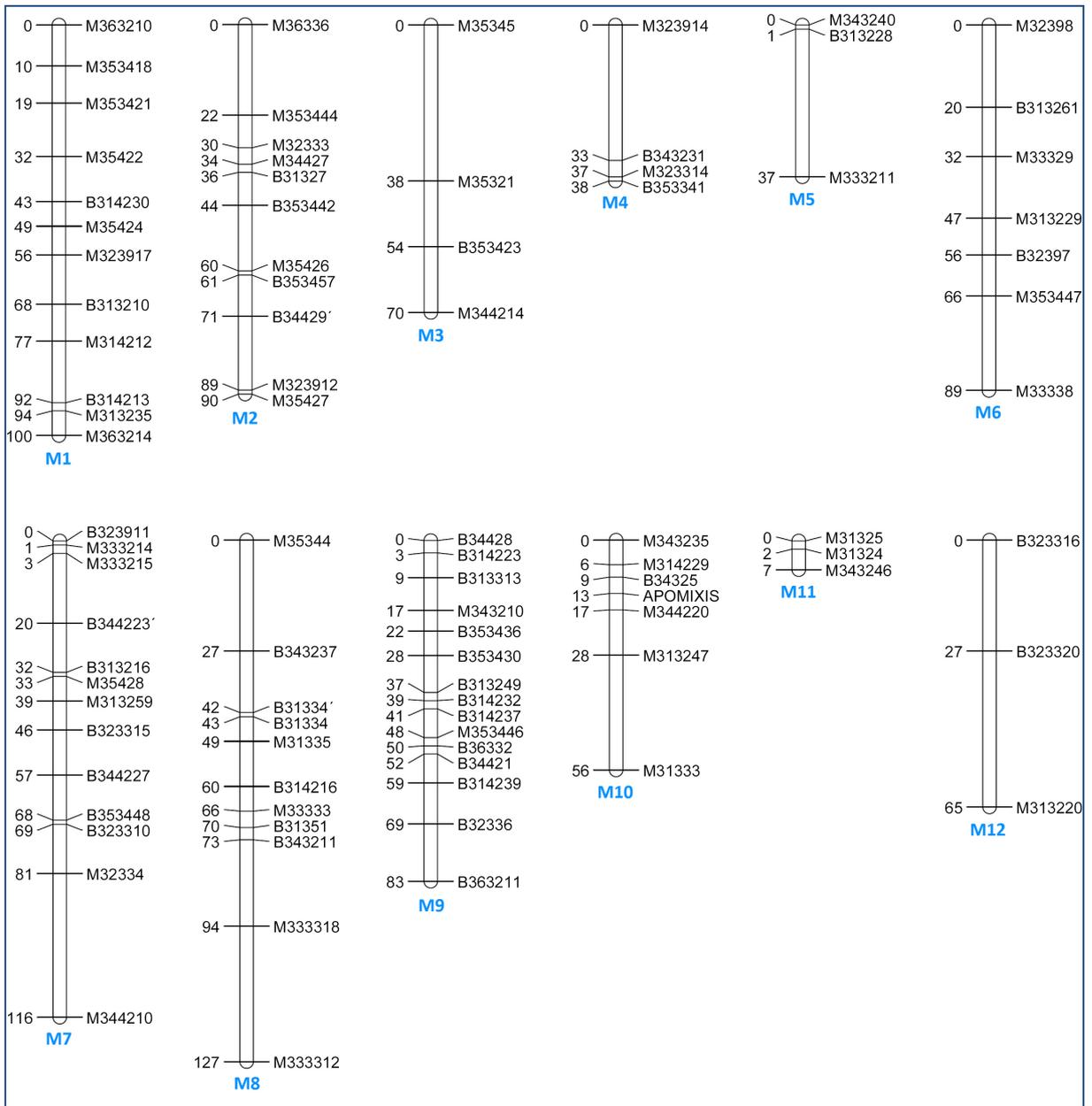
### *Construcción del mapa marco de GR19*

Para la construcción del mapa de ligamiento genético marco de *Paspalum guenoarum* tetraploide apomíctico se utilizaron los datos de segregación de 34 marcadores ADS (1:1), 39 marcadores que no pudieron distinguirse de 1:1 o 1:1,6, 22 marcadores con distorsión de la segregación (1:1,6) incluido el carácter apomixis (Tabla 16) y 57 marcadores tipo puente alélico (3:1) (Tabla 17). El análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa JoinMap 3.0 en forma similar a lo descrito anteriormente. Los grupos de cosegregación fueron establecidos a un LOD score = 4.0 – 2.0 y un valor máximo de recombinación ( $\theta$ ) = 0,45. Finalmente se asignaron 44 marcadores a LOD = 3.0 a 7 grupos y 30 marcadores a LOD = 2.0 a 13 grupos de cosegregación ya establecidos, con un valor máximo de recombinación ( $\theta$ ) = 0,49.

El mapa de ligamiento genético de GR19 quedó definido por 127 marcadores (84,76 % del total) de los cuales, 76 fueron de tipo paterno y 51 de tipo puente alélico (Fig. 9). Estos marcadores se distribuyeron en 23 grupos de cosegregación de dos o más marcadores, excepto uno solo definido por un único marcador (M15). Para identificar a cada marcador paterno, se agregó la letra M (masculino) precediendo a los cuatro números que indican la combinación de cebadores empleada; un quinto y eventualmente un sexto número indicaron el orden de marcador registrado para esa combinación. Los grupos de cosegregación fueron nombrados con la letra M, y numerados de 1 a 23. La distancia total cubierta fue de aproximadamente 1393 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 13,14 cM en un rango de 0 a 49 cM entre marcadores. (Fig. 9). El tamaño de los grupos de ligamiento varió entre 1 y 127 cM, con un promedio de 60,57 cM. El número promedio de marcadores por grupo fue 5,57 con un rango de 1 a 15 marcadores. Veintitrés marcadores (15,23 %) permanecieron sin asociarse a ninguno de los grupos establecidos.

El largo del genoma esperado [E(G)] fue de 2529,34 cM. El cálculo se realizó a LOD score 2,00, se consideraron los 128 marcadores posicionados en el mapa (n) que generaron un total de 310 pares de marcadores ligados en acoplamiento (k) y cuya mayor distancia fue de 49 cM (d) ( $E(G) = [127 (127-1) 49] / 310 = 2529,34$  cM). Por lo tanto, el porcentaje del genoma mapeado hasta el momento para el progenitor apomíctico es aproximadamente del 54,21 %. El hecho de que se detectó un mayor número de grupos de cosegregación paternos comparados con el mapa materno y a su vez, más cercano al máximo número de grupos esperados (40) podría deberse a mayor número de entrecruzamientos en la meiosis

masculina y por lo tanto a una mayor eficiencia para detectar ligamientos entre los marcadores.



**Figura 9.** Mapa de ligamiento genético del genotipo tetraploide apomítico (2n = 4x = 40) GR19 de *P. guenoarum* cv. Rojas. Los nombres de los marcadores y las distancias en cM (función de Kosambi) se indican a la derecha y a la izquierda, respectivamente. Los grupos de cosegregación fueron establecidos a LOD score = 4.0 – 2.0.



### *Caracterización del grupo de ligamiento que incluye al control de la aposporia (grupo apo)*

Con el objetivo de identificar marcadores moleculares ligados al carácter apomixis y localizar la región genómica responsable de este modo de reproducción, se empleó una estrategia inicial de selección de marcadores polimórficos mediante un análisis BSA (Michelmore et al., 1991). Los marcadores asociados al modo de reproducción fueron incorporados en el mapa genético mediante su análisis en todos los individuos de la población de mapeo. Para la localización de este carácter en el mapa genético, los datos fenotípicos del modo de reproducción de cada individuo de la población de mapeo fueron incluidos en el archivo de datos paterno. El sistema de notación binaria permitió codificar a los individuos apomícticos con el número 1 (uno) y a los sexuales con 0 (cero).

Luego del análisis de ligamiento, el grupo de ligamiento M10 o *grupo apo* quedó constituido por 7 marcadores: 6 marcadores moleculares (5 paternos y uno biparental) y el carácter apomixis sobre unos 56 cM (Fig. 9). Tanto la apomixis como los 5 marcadores segregantes del padre mostraron distorsión de la segregación, en proporción 1:1,6 (apomixis vs. sexualidad y presencia vs. ausencia, respectivamente). El análisis de ligamiento a LOD score = 4.0 y  $\theta = 0,45$  determinó que el locus de la apomixis y 5 marcadores mapean juntos formando un único grupo de ligamiento en fase de acoplamiento. Un sexto marcador fue incorporado a este grupo a LOD = 2.0 y  $\theta = 0,49$ . Los 6 marcadores se localizaron a ambos lados del carácter apomixis mostrando valores de recombinación con éste de entre 4 y 43 cM, siendo la distancia extrema superior observada entre el locus apomixis y el sexto marcador incorporado a este grupo a LOD = 2.0 y  $\theta = 0,49$ . Dos marcadores parentales, M314229 y M344230, mapearon a ambos lados del carácter, a 7 cM y 4 cM respectivamente en el grupo M10.

La estrategia de BSA permitió una búsqueda de marcadores asociados a la apomixis más eficiente e hizo posible la identificación de marcadores moleculares ligados al carácter apomixis a ambos lados del mismo. Es decir que esta estrategia de búsqueda de marcadores en bulks no es completamente al azar en este caso sino con un sesgo hacia la región genómica de la apomixis. Por esta razón, el *grupo apo* es relativamente denso en cuanto al número de marcadores que mapean en él, con respecto al resto del genoma donde los marcadores en ocasiones mapean más separadamente, por ejemplo, con hasta 2 marcadores por grupo de ligamiento. De esta manera es posible incrementar la densidad de marcadores en un área determinada del genoma, sin necesidad de saturar todo el mapa

genético (Michelmore et al., 1991). Este método fue utilizado con éxito en la identificación de marcadores ligados a la apomixis en *Paspalum notatum* (Martínez et al., 2003) y en otras gramíneas como *Tripsacum* (Leblanc et al., 1995), *Brachiaria* (Pessino et al., 1997 y 1998), *Cenchrus ciliare* L. [como *Pennisetum ciliare* (L.) Link (Gustine et al., 1997)], *Cenchrus squamulatus* (Fresen.) Morrone [como *Pennisetum squamulatum* Fresen. (Ozias-Akins et al., 1998)] y *Poa* (Barcaccia et al., 1998).

#### *Determinación de cromosomas homólogos de 4PT y GR19 en base a marcadores de tipo puente alélico*

Los datos de los 57 marcadores segregantes desde ambos genotipos y que ajustaron a una relación 3:1 (Aaaa x Aaaa) (Tabla 17) fueron incorporados a los archivos de datos de los alelos en dosis simples (ADS) correspondientes a cada progenitor, utilizados para construir los mapas materno y paterno, a fin de identificar posibles grupos homólogos. Los análisis de ligamiento se realizaron empleando el programa JoinMap 3.0 y se determinó la asociación de 50 y 51 marcadores de tipo puente alélico a los grupos de ligamiento establecidos en 4PT y GR19, respectivamente. Para identificar a cada marcador puente alélico, se agregó la letra B (biparental) precediendo a los cuatro números que indican la combinación de cebadores empleada; un quinto y eventualmente un sexto número indicaron el orden de marcador registrado para esa combinación. Se consideró la existencia de verdadera homología entre dos grupos de ligamiento cuando se observaron dos o más marcadores biparentales comunes a ambos. En el progenitor sexual, los 50 marcadores se distribuyeron en 10 grupos de cosegregación maternos (Fig. 8, marcadores precedidos por la letra B). En el progenitor apomíctico los 51 marcadores se distribuyeron en 17 grupos de cosegregación paternos (Fig. 9, marcadores precedidos por la letra B).

Cuarenta y ocho marcadores biparentales mapearon en grupos de cosegregación pertenecientes a ambos parentales permitiendo la identificación de los cromosomas homólogos entre los dos genotipos. La tabla 18 resume los resultados obtenidos.

**Tabla 18.** Cromosomas homólogos identificados en 4PT y GR19.

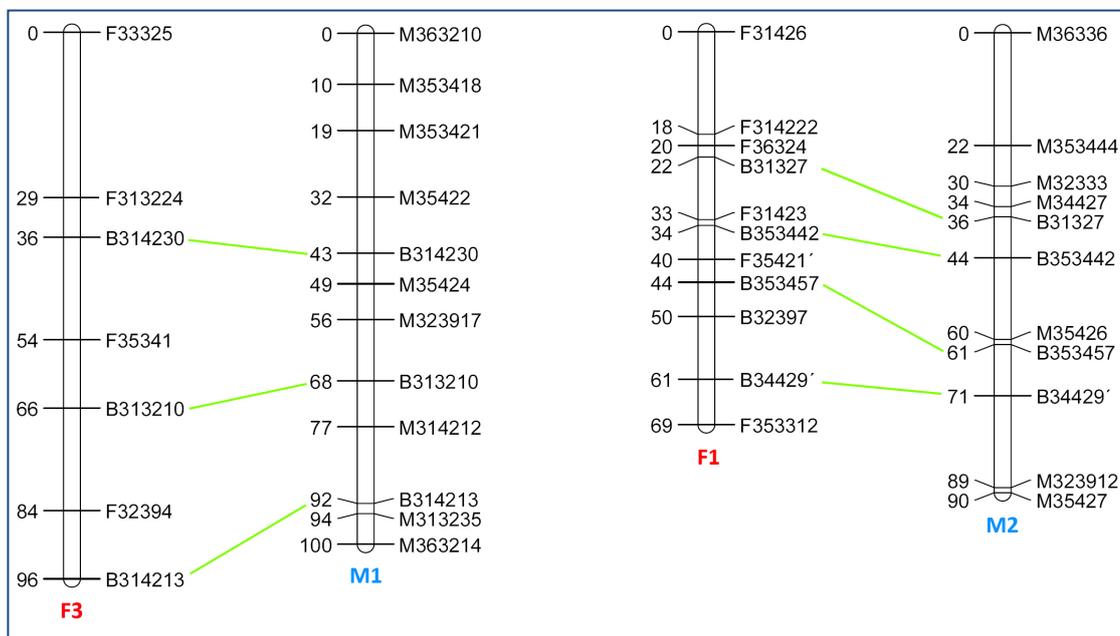
<b>Marcador puente alélico</b>	<b>Grupo de ligamiento de 4PT</b>	<b>Grupo de ligamiento de GR19</b>
B314230; B313210; B314213	F3	M1
B31327; B353442; B353457; B34429'	F1	M2
B353423	F9	M3
B343231; B353341	F7	M4
B313228	F6	M5
B313261	F10	M6
B32397	F1	M6
B323911; B344223'; B313216; B323315;	F4	M7
B344227; B353448; B323310		
B31334'; B31334; B343211	F5	M8
B343237; B314216; B31351	F2	M8
B34428; B314223; B313313; B353436;	F4	M9
B314232; B314239; B32336		
B314237	F6	M9
B36332; B363211	F10	M9
B353430; B313249	F2	M9
B34325	F2	M10
B323316; B323320	F4	M12
B353314	F10	M13
B314234; B344223	F11	M14
B32338	F6	M14
B32396; B314235	F11	M17
B 33323	F10	M18

Catorce grupos de cosegregación del parental masculino mostraron homología con 10 grupos femeninos (Tabla 18). La homología no siempre fue estricta de un cromosoma con otro ya que, en varios casos se observó homología de un cromosoma parental repartida en más de un cromosoma en el otro parental.

Particularmente, dos grupos de ligamiento del parental femenino mostraron sintenia y colinearidad con respectivos grupos de ligamiento del parental masculino. Por definición, dos grupos de ligamiento son sinténicos cuando comparten los mismos marcadores; mientras que existe colinearidad entre ellos cuando el orden de los marcadores se mantiene. El grupo de ligamiento F3 de 4PT es el homólogo femenino del grupo de ligamiento M1 de GR19: tres marcadores biparentales, B314230; B313210; B314213, mapearon en el cromosoma M1 y en el cromosoma F3, conservando el orden y manteniendo distancias similares entre los marcadores en ambos grupos de cosegregación. Lo mismo ocurrió con los marcadores B31327; B353442; B353457; B34429', que se ubicaron en los cromosomas F1 y M2, indicando la homología existente entre estos grupos de ligamiento. La figura 10 muestra

las relaciones de homología entre estos grupos de ligamiento. A su vez, el grupo de ligamiento F1 contiene un marcador biparental que mapeó en M6. Los cromosomas F7 y M4 mostraron ser homólogos, con dos marcadores biparentales que mapearon en ellos, manteniendo además la colinearidad, aunque las distancias entre ellos son bastante más diferentes en uno y otro cromosoma. El cromosoma F4 mostró homología con M7, M9 y M12: los tres grupos de cosegregación mostraron, mediante distintos marcadores biparentales, sintenia con el grupo F4 aunque en ningún caso se mantuvo la colinearidad completa. Similares relaciones se establecieron entre F5 y F2 con M8, y F11 con M14 y M17 sin conservación de la colinearidad.

Interesantemente, el marcador B34325 se asoció al *grupo apo* M10 en el mapa de GR19 y al grupo F2 en el mapa de 4PT, indicando que es posible que exista homología entre el cromosoma F2 materno y el cromosoma paterno que contiene el carácter apomixis, M10. Además, en el cromosoma F2 mapearon marcadores biparentales que también mapearon en M8 y M9, pero no mostraron relaciones de colinearidad.



**Figura 10.** Relaciones de homología observadas entre el grupo de ligamiento materno F3 y el paterno M1 (izquierda) y el grupo F1 con M2 (derecha). Las líneas de color verde indican los marcadores biparentales que permitieron establecer las homologías.

La construcción de mapas de ligamiento genético de especies poliploides es, por varias razones, más compleja que la de especies diploides: se necesita identificar ciertos marcadores moleculares que aseguren una determinada constitución genética de los individuos (los ADS que segregan 1:1, dado un cruzamiento Aaaa x aaaa o viceversa); además, el mapeo en poliploides necesita de métodos estadísticos más elaborados y poblaciones segregantes de gran número de individuos a fin de obtener estimaciones de distancias confiables. También, cuenta el hecho de que la constitución genética de muchas especies poliploides naturales permanece aún desconocida (Qu y Hancock, 2001).

La estrategia para la construcción de los mapas de ligamiento genético de los genotipos tetraploides de *Paspalum plicatulum* y *P. guenoarum* se basó en la utilización de una población de mapeo tetraploide segregante para el modo de reproducción y de marcadores moleculares de AFLP segregantes como alelos en dosis simple (ADS). Esta población derivó de genotipos altamente heterocigotas y se la considera como una pseudo-retrocruza (*pseudo-testcross*) de doble entrada, ya que cada genotipo parental se comporta como *tester* o control del otro parental, y viceversa, a pesar de que la configuración de los genotipos sea desconocida (Ritter et al., 1990; Grattapaglia y Sederoff, 1994). La utilización como progenitores de la población de dos individuos tetraploides con distinto modo de reproducción y de diferente origen, permitió contar con un alto grado de polimorfismo en ambos progenitores y esto facilitó la obtención de marcadores moleculares informativos y de un número suficiente de alelos en dosis simple como para cubrir una proporción importante de los genomas materno y paterno. Se desarrollaron dos mapas genéticos independientes, el femenino materno y el masculino paterno, a partir de la información de segregación derivada de la meiosis de ambos progenitores.

El mapa de ligamiento genético del genotipo GR19 de *Paspalum guenoarum* es, junto a los mapas de *P. notatum*, *Cenchrus ciliaris* y *Panicum maximum*, uno de los primeros antecedentes de mapas genéticos en gramíneas apomícticas apospóricas (Burrow et al., 2001; Ebina et al., 2005; Stein et al., 2007). En todos estos casos fue posible identificar el grupo de ligamiento en el que mapeó el carácter apomixis. En *Poa pratensis* L., otra gramínea apospórica, también se construyeron los mapas de ligamiento para un genotipo sexual y para uno apomíctico de la especie. Sin embargo, no se identificó el grupo de ligamiento donde se localiza el o los factores responsables de la aposporia ya que la población de mapeo no fue clasificada por el modo de reproducción (Porceddu et al., 2002).

Asimismo, el mapa de ligamiento genético de GR19 desarrollado durante este trabajo de tesis, junto al de 4PT son los primeros mapas disponibles para especies del grupo *Plicatula*. El mapa de *P. guenoarum* es el segundo mapa de ligamiento obtenido para una raza tetraploide apomíctica de *Paspalum*: *P. notatum* cuenta con el mapa de ligamiento genético desarrollado para una raza tetraploide apomíctica (Stein et al., 2007) además de los mapas disponibles para razas tetraploides y diploides sexuales de la especie (Ortíz et al, 2001; Stein et al., 2007).

El mapa de 4PT y el de GR19 mostraron claras diferencias en cuanto al número de marcadores detectados y mapeados, al número de grupos de cosegregación y a la longitud del genoma cubierta por el mapeo. El análisis de ligamiento de los marcadores de AFLP permitió la detección de 11 y 23 grupos de ligamiento en fase de acoplamiento (grupos de cosegregación) en los mapas femenino y masculino, respectivamente, de los 40 grupos teóricos esperados ( $2n = 4x = 40$ ) para ambas especies. Esto es debido a que no fue posible hasta el momento, saturar los grupos de ligamiento como para detectar cada cromosoma esperado (un mapa saturado es aquél que contiene marcadores situados a distancias pequeñas en toda su longitud). Así también lo indican los marcadores maternos y paternos que permanecieron sin asociarse a alguno de los grupos de ligamiento formados en los respectivos mapas, lo cual sugiere que estos marcadores se localizan en regiones de los genomas que aún no fueron cubiertas.

El número de marcadores mapeados en el genotipo paterno fue mayor que en el materno (127 vs. 89) y su distribución comprende un número también mayor de grupos de cosegregación (23 vs. 11). Es posible que esta diferencia entre ambos mapas en el número de grupos de cosegregación detectados, se deba al origen diferente de cada uno de los parentales. Por un lado, la planta 4PT es un tetraploide sexual que proviene de la duplicación por colchicina de los cromosomas de una planta diploide sexual de *Paspalum plicatulum*. Debido al origen experimental de 4PT, es posible considerar que su constitución poliploide sea muy reciente. De acuerdo a lo observado en este trabajo, en base a las asociaciones meióticas IV y II, así como la segregación de marcadores ADD, en teoría es posible detectar ambos tipos de segregación, disómica o tetrasómica, en 4PT y GR19. Por ello, es probable que parte de los cromosomas de 4PT aún no se haya diferenciado, que los cuartetos de cromosomas posean alta homología y por lo tanto puedan asociarse al azar formando un número relativamente elevado de cuadrivalentes en la meiosis. Esto podría estar reflejado

en el número de cuadrivalentes y bivalentes (formados al azar entre los grupos de cada juego homólogo). Este tipo de configuración disminuye la eficiencia de detección de marcadores ADS en grupos de cosegregación en acoplamiento. Es posible que la técnica de marcadores utilizada esté cubriendo mayoritariamente regiones que presentan herencia tetrasómica. Por el contrario, el genotipo GR19 es una planta tetraploide apomíctica natural cuyo origen puede remontarse a innumerables generaciones y por lo tanto, podría estar en proceso de diploidización. Es decir que, en este caso los sectores con apareamiento preferencial (herencia disómica) son más frecuentes que en el caso de la madre y por lo tanto la eficiencia de detección de grupos de cosegregación fue mayor en este genotipo. Estos resultados concuerdan con las consideraciones hechas para estas especies en base al análisis citogenético y de marcadores ADD segregantes desde cada uno de los parentales. De ser así, es posible que dentro de los cuartetos de cromosomas homólogos de GR19, pares de cromosomas se apareen entre sí con mayor frecuencia que con el resto del grupo homólogo, con el que habrían perdido parte de su homología. Este hecho da la posibilidad de detectar un mayor número de marcadores y de grupos de cosegregación en GR19.

La longitud del genoma de los mapas femenino y masculino (819 cM vs. 1393 cM, respectivamente) calculado como la sumatoria de la longitud de cada grupo de cosegregación, también fue diferente entre ambos parentales. Asimismo, el largo total del genoma estimado para el genotipo apomíctico (2569,49 cM) resultó superior que el estimado para el genotipo sexual (921,41 cM), indicando que la frecuencia de recombinación sería mayor en los gametos masculinos. Esta diferencia también puede tener relación con los orígenes de estos genotipos. Los mapas de los genotipos tetraploides sexual y apomíctico de *P. notatum* (Stein et al., 2007) también arrojaron diferencias de esta índole. El análisis de ligamiento de marcadores de AFLP permitió detectar un mayor número de grupos de cosegregación en fase de acoplamiento para el parental masculino (39) que para el femenino (26), aún cuando los marcadores maternos mapeados superaron significativamente en número a los paternos. En este caso tampoco fue posible detectar los 40 grupos de cosegregación teóricos esperados para cada parental. Los autores lo atribuyeron al origen diferente (uno natural y otro experimental) de ambos padres (Stein et al., 2007). Paralelamente a lo observado en *Plicatula*, el largo del genoma del mapa masculino apomíctico de *P. notatum* resultó notablemente superior al del genotipo femenino sexual. Diferencias importantes en la longitud de los genomas parentales fueron también

observadas en varias especies vegetales como *Lolium multiflorum* Lam. y *L. perenne* L. (ryegrass; Warnke et al., 2004), *Fragaria x ananassa* (Lerceteau-Kölher et al., 2003), *Festuca arundinaceae* Schreb. (Saha et al., 2005) y *Cynodon dactylon x transvaalensis* (bermudagrass, Bethel et al., 2006), aunque en todos los casos fue el mapa femenino el de mayor longitud, lo que llevó a concluir a los autores que este hecho sería reflejo de una mayor frecuencia de recombinación en los gametos maternos. Al igual que en *P. guenoarum*, el caso de *P. notatum* justamente se contrapone al de las especies recién nombradas, por lo que los autores consideraron la ocurrencia de mayor frecuencia de recombinación en los gametos masculinos (Stein et al., 2007).

Más de la mitad de los marcadores ADS que segregaron a partir del genotipo materno 4PT (51,76%), lo hicieron en proporción 1:1. Considerando que las configuraciones alélicas posibles para diferentes regiones genómicas de la planta diploide de la que se originó 4PT son: AA, Aa y aa, por duplicación del genoma en la planta tetraploide esos mismos loci tendrían las siguientes constituciones genotípicas: AAAA, AAaa y aaaa respectivamente. Para explicar estos resultados puede contemplarse la posibilidad de que, como consecuencia de la poliploidización, la planta 4PT haya experimentado alteraciones genéticas que fueron reveladas por los marcadores de AFLP (revisado en Martelotto et al., 2007). Por otra parte, sumado al elevado porcentaje de marcadores ADS 1:1, se observó también por cada par de cebadores ensayado un número llamativo de bandas polimórficas entre los individuos de la progenie pero que no derivaron ni del progenitor femenino ni del masculino (datos no mostrados). Esto puede ser debido al encuentro de los 2 genomas parentales en los híbridos interespecíficos. Existe evidencia de que en alopoliploides de *Triticum* y *Aegilops* de reciente formación, ocurren cambios genómicos que incluyen la aparición de nuevos marcadores moleculares en los nuevos poliploides que no estaban presentes en los parentales (Liu et al., 1998).

La incorporación de marcadores tipo puente alélico a ambos mapas permitió la identificación de cromosomas homólogos entre los genotipos materno y paterno. Solamente uno de los grupos de cosegregación (F2) del genotipo 4PT correspondería al homólogo materno del grupo apo (M10). Sin embargo, es necesario saturar la región con marcadores de tipo biparental, a fin de comprobar la homología entre F2 y M10 con dos o más de dos marcadores tipo puente alélico que mapeen en ambos grupos. El grupo F2 mostró además homología con M8 y M9, por lo que sería posible considerar que M8, M9 y M10 conformen

un set de homólogos en GR19. Sin embargo, para confirmarlo es necesario realizar un análisis de ligamiento de los marcadores en repulsión. El grupo de ligamiento femenino F3 resultó homólogo al masculino M1, donde 3 marcadores biparentales conservaron la sintenia y la colinearidad entre ambos grupos, sin involucrar a otros cromosomas. Exceptuando este caso, se detectaron los cromosomas homólogos femenino y masculino, pero en todos los casos en que se consideró más de un marcador biparental, no hubo conservación estricta de la colinearidad ni de la sintenia, por lo que un solo cromosoma resultó ser el homólogo de más un grupo de ligamiento en el otro parental, y viceversa. En general, no se observó una similitud en la longitud o la densidad de marcadores entre los grupos homólogos identificados en ambos genotipos.

Los marcadores paternos distorsionados se distribuyeron a lo largo de todo el genoma de GR19 y en el grupo de ligamiento M10, en el que mapeó el carácter apomixis, se ubicaron 5 de los 60 marcadores que mostraron distorsión en la segregación (1:1,6 ó 1:1 + 1:1,6), además de un marcador biparental. Esta concentración de marcadores con segregación distorsionada en la *región apo* confirma la distorsión en la transmisión del carácter observada en la progenie F<sub>1</sub> y de la región genómica asociada. Al igual que en *P. guenoarum*, una alta concentración de marcadores con distorsión de la segregación se observó en *P. notatum* para la región genómica donde mapeó el carácter apomixis. Sin embargo, esta especie mostró además un patrón característico para la distribución en el genoma de este tipo de marcadores de segregación distorsionada, hecho que no se registró en *P. guenoarum*. Por otra parte, y a diferencia de lo observado para otras especies apospóricas de *Paspalum* y otras gramíneas apomícticas, hasta el momento, el análisis de ligamiento realizado en *P. guenoarum* no ha revelado marcadores completamente ligados a la apomixis. Los marcadores paternos que mapearon a menor distancia de dicho marcador genético lo hicieron a 4 cM y a 7 cM. Esto difiere de lo conocido para las especies de *Paspalum* estudiadas hasta ahora. Dado que es poco probable que con el número de pares de cebadores ensayados se haya conseguido saturar con marcadores los mapas materno y paterno, no es posible afirmar que no existan marcadores que cosegreden estrictamente con el carácter en especies de *Panicum*. Un caso similar al de *Panicum* es el reportado en *Brachiaria* (Pessino et al., 1998). Un mapa genético de la región que controla la aposporia fue construido en híbridos interespecíficos derivados del cruzamiento entre *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C. M. Evrard) Crins [como *Brachiaria ruziziensis* R. Germ. & C. M.

Evrard] tetraploide sexual inducido y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) R. D. Webster [como *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf] tetraploide apomítico. Tres marcadores de RFLP y dos de AFLP mapearon en la *región apo*, junto a marcadores de RFLP y RAPD reportados previamente y que contribuyeron a caracterizar esta región (Pessino et al., 1998). El grupo de ligamiento formado mostró estrecha sintenia con regiones del cromosoma 5 de maíz y del cromosoma 2 de arroz. Llamativamente, no se identificaron marcadores completamente ligados al carácter pero sí se observó que ambos marcadores de AFLP se localizan a 1,2 cM y 5,7 cM respectivamente a cada lado del carácter (Pessino et al., 1998). Por otra parte, en *P. notatum* se han identificado al menos 20 marcadores moleculares de diferente naturaleza (RAPD, AFLP y RFLP) completamente ligados al carácter (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004; Pupilli et al., 2004; Stein et al., 2007; Rebozzio et al., 2012). Los mismos definen un bloque de ligamiento que corresponde a la región genómica donde mapea la apomixis. Esta región correspondería a un segmento cromosómico de aproximadamente 36 Mpb, sinténico a segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz, así como a los cromosomas 3 y 5 de maíz (Pupilli et al., 2004; Calderini et al., 2006). Estos marcadores definen un área de represión de la recombinación en un cromosoma con apareamiento preferencial con uno de los tres homólogos (Stein et al., 2004). Pupilli et al. (2001) determinaron que en *P. simplex* la apomixis cosegrega estrictamente con un grupo de marcadores que se localiza en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 12 de arroz. Estos marcadores cubren una distancia de 15 cM en el mapa de arroz, mientras que en *P. simplex* cosegregan estrictamente con la apomixis. Además, Lombarda et al. (2002) observaron que un conjunto de marcadores homólogos de AFLP cosegregó estrictamente con la apomixis en esta misma especie.

En otras especies de reproducción apomítica también se ha observado una fuerte restricción o supresión de la recombinación en la región genómica donde mapea el carácter (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Una posible explicación para la ausencia de recombinación observada es la localización hipotética de esta región en una posición pericentromérica heterocromática (Ozias-Akins et al., 1998). Sin embargo, las relaciones sinténicas con arroz y maíz sugieren que la posición del locus en *Paspalum* es subdistal con respecto al centrómero (Pupilli et al., 2001) así como en *Brachiaria* (Pessino et al., 1997). Más aún, el análisis de FISH en *P. simplex* apomítico, empleando como sonda un BAC seleccionado a partir de un SCAR específico de la apomixis, mostró que este segmento está localizado en una región no

pericentromérica y pobre en heterocromatina (Calderini et al., 2006) donde los genes son transcripcionalmente activos (Polegri et al., 2010).

Recientemente, Hojsgaard et al. (2011) identificaron un pequeño grupo de marcadores que cosegregan con el carácter en *P. notatum*, *P. simplex*, *P. malacophyllum* y *P. procurrents*. Sin embargo, no todos los marcadores ligados al carácter en *P. notatum*, *P. simplex* y *P. malacophyllum* lo estuvieron en *P. procurrents*, lo cual fue atribuido a rearrreglos en pequeña escala en la región genómica en la que mapea el carácter en *P. procurrents*, lo que según los autores contribuyó a acotar la región.

Dada la ambigüedad de las evidencias y puesto que se comprobó que en *Paspalum* la recombinación está fuertemente restringida (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004; Pupilli et al., 2004), es necesario considerar que, en aquellos casos en que el segmento cromosómico que porta el carácter está inmerso en una región rica en heterocromatina, las distancias entre los marcadores y el carácter están siendo sobre o subestimadas. En esos casos, para conocer las verdaderas distancias físicas será necesario realizar un mapeo físico. Es decir, puede existir un bloque muy grande de heterocromatina entre dos marcadores pero dado que no ocurre recombinación aparecen como ligados, cuando en verdad no lo están.

El caso de *Plicatula* puede ser diferente a los descritos anteriormente. Dado que se utilizó una estrategia de BSA y al menos 17 combinaciones de cebadores de AFLP, es probable que no se hayan detectado marcadores completamente ligados y si marcadores con bajos valores de recombinación. Es posible que en esta especie la apomixis no se encuentre en una zona donde la recombinación está restringida. Sería necesario realizar experimentos con marcadores anclados (RFLP o EST-SSR) en las especies modelo para determinar qué segmentos de los cromosomas de arroz y/o maíz están relacionados con el carácter apomixis en *P. guenoarum*. Asimismo, es posible pensar que en *Plicatula* los bloques de heterocromatina sean menos significativos o no existan en la región del grupo M10 que fue posible cubrir con el mapeo, razón por la cual no se detectó la represión de la recombinación, tan característica para otras especies de apomícticas de *Paspalum*.

Respecto a la observación de marcadores ligados al carácter apomixis, las especies de *Plicatula* parecen ser un caso especial dentro del género. Es por ello que, si bien puede resultar útil la realización de estudios comparativos con las especies modelo, es necesario recordar que no necesariamente deben extenderse las conclusiones ya obtenidas para las

mismas hacia las nuevas especies estudiadas. Posiblemente, *P. guenoarum* sea un modelo distinto dentro del género para el estudio del carácter.

Entre las especies del grupo *Plicatula* que crecen naturalmente en las praderas de América del Sur, sobresale por su valor como forrajera *Paspalum guenoarum*. Esta especie crece en Bolivia, Paraguay, sur de Brasil, Argentina y Uruguay, y se encuentra entre las primeras especies subtropicales perennes de ciclo estival usadas como especie forrajera cultivada en el NE de Argentina. A partir de selección por métodos clásicos practicada entre poblaciones naturales, las cátedras de Forrajicultura y Genética y Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste lograron, en el año 2002 la obtención del cultivar Chané FCA de *P. guenoarum*. Esta variedad es muy bien considerada por su buena producción de forraje y de semilla, por su resistencia al ataque de ciertos insectos, por su muy buen vigor, por ser muy palatable para bovinos y equinos y por ser de reproducción apomíctica, lo que le permite multiplicarse por semillas con elevada uniformidad en la progenie (Urbani et al., 1996). Este cultivar surgió como una alternativa productiva para el nordeste argentino, mostrando resultados muy buenos en cuanto al uso por parte de los animales. Por otra parte, el Pasto Cambá es una variedad de *P. atratum* lograda también por las cátedras ya mencionadas en 1997. Cambá FCA es una excelente forrajera que se encuentra en franca expansión en el nordeste de Argentina y al igual que *P. guenoarum* es una especie del grupo *Plicatula*. Estos ejemplos bastan para ilustrar la enorme importancia actual y potencial de las especies de *Plicatula* para la producción ganadera de la región. Los mapas obtenidos para los genotipos tetraploides sexual y apomíctico de *Plicatula* podrán ser empleados como base para la construcción de mapas genéticos más saturados y como marco genético para estudios básicos y aplicados en estas especies. La disponibilidad de estos mapas para especies de *Plicatula* facilitará el anclado de marcadores de RFLP y SSR ya disponibles en otras especies del género, marcadores que son más apropiados para realizar estudios comparativos, tanto dentro del género *Paspalum* como con otras gramíneas. Además, proveen la base para el desarrollo de mapas funcionales a partir de la localización de marcadores de secuencias expresadas (EST-SSR) (Kantety et al., 2002) que han sido desarrollados en otras especies de gramíneas relacionadas.

### Conclusiones

Los mapas de ligamiento genético del genotipo GR19 de *Paspalum guenoarum* y de *P. plicatum* 4PT, desarrollados durante este trabajo de tesis, son los primeros mapas disponibles para especies del grupo Plicatula. En el mapa del parental masculino GR19 se identificó el único grupo de ligamiento donde se ubica el carácter apomixis, M10. La densidad de marcadores con segregación distorsionada en la *región apo* confirma la distorsión en la transmisión del carácter observada en la progenie F<sub>1</sub> y de la región genómica asociada.

A diferencia de lo conocido para las demás especies de *Paspalum* estudiadas hasta el momento, GR19 no mostró marcadores moleculares que cosegreden estrictamente con el carácter apomixis por lo que posiblemente *P. guenoarum* sea un modelo distinto dentro del género para el estudio del carácter. Fue posible asimismo identificar el presunto cromosoma homólogo de *P. plicatum*, al cromosoma que contiene el locus responsable de la apomixis en *P. guenoarum* mediante la localización de un marcador biparental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE, Hanna WW. 2011. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica* 179:227-235.
- Aguilera PM, Sartor ME, Galdeano F, Espinoza F, Quarín CL. 2011. Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatum* and apomictic *P. guenoarum*. *Crop Sci* 51:1544-1550.
- 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 11<sup>th</sup> Intl Grassl Congr Surfers, Paradise, Queensland University of Queensland Press, St Lucia. pp 245-248.
- Bashaw EC, Hanna WW. 1990. Apomictic reproduction. In: Chapman GP (ed). Reproductive versatility in the grasses. Cambridge University Press, Cambridge. pp 100-130.
- Bethel CM, Sciara EB, Estill JC, Bowers JE, Hanna W, Paterson AH. 2006. A framework map of bermudagrass (*Cynodon dactylon* x *transvaalensis*) based on single-dose restriction fragments. *Theor Appl Genet* 112:727-737.
- Brown WV. 1950. A cytological study of some Texas gramineae. *Bull Torrey Bot Club* 77:63-76.
- Brown TA. 2000. Mapping genomes by genetic techniques. Chapter 2. In: Genomes Wiley & Son Inc, New York, USA.
- Brown LY, Brown SA. 2004. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genets* 20:51-58.

- Barcaccia GA, Mazzucato E, Albertini J, Zethof A, Gerats M, Pezzotti M, Falcinelli M. 1998. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. *Theor Appl Genet* 97:74-82.
- Barcaccia G, Lucchin M, Parrini P. 2000. Analisi del genoma mediante marcatori molecolari: i fondamenti metodologici. *Sementi Elette* 5:5-15.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331.
- Burrow GB, Jessup RW, Bowers JE, Schulze SR, Li Z, Wang YW, Burson BB, Hussey MA, Patterson AH. 2001. Alignment of Pennisetum ciliare and sorghum bicolor chromosomes based on EST-enriched genetic maps.
- Burson BL, Bennett HW. 1971a. Chromosome numbers microsporogenesis and mode of reproduction of seven *Paspalum* species. *Crop Sci* 11:292-294.
- Burson BL, Bennett HW. 1971b. 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 GWM, Forbes I. 1960. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügge). Proc 8th Int Grassland Cong, Reading, England, 11-21 Jul 1960. pp 66-71.
- Cáceres ME, Pupilli F, Quarin CL, Arcioni S. 1999. Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica* 110:161-167.
- Calderini O, Chang SB, Jong H, Busti A, Paolucci F, Arcioni S, de Vries SC, Abma-Henkens MHC, Klein Lankhorst RM, Donnison IS, Pupilli F. 2006. Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theor Appl Genet* 112:1179-1191.
- Calderini O, Donnison I, Polegri L, Panara F, Thomas A, Arcioni S, Pupilli F. 2011. Partial isolation of the genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex*. *Mol Breed* 28:265-276.
- Chakravarti A, Lasher LK, Reefer JE. 1991. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128:175-182.

- Chase A. 1929. The North American species of *Paspalum*. *Contr U S Natl Herb* 28:1-310.
- Chase A. 1939. *Paspalum* of South America. Unpublished manuscript. Hitchcock and Chase Library, Botany Department, Smithsonian Institution, Washington DC.
- Clausen J. 1961. Introgression facilitated by apomixis in polyploid Poas. *Euphytica* 10:87-94.
- 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): 5. *Ann Mo Bot Gard* 65:637-649.
- de Oliveira RC. 2004. O genero *Paspalum* L., grupo *Plicatula* (Poaceae:Paniceae), no Brasil. Tesis Doctoral, Universidade Estadual de Campinas.
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahra M, Nakayima K. 2005. Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq). *Grassland Sci* 51:71-78.
- Espinoza F, Quarin 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, Quarin CL. 2001. The breeding system of three *Paspalum* species. *Tropical Grassl* 35:211-217.
- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM, Quarin CL. 2006. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Pl Syst Evol* 258:147-159.
- Evers GW, Burson BL. 2004. Dallisgrass and other *Paspalum* species. pp 681-713. In: Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (Eds.). Warmseason (C4) grasses. *Agron Monogr* 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
- Fernandes MIM, Barreto IL, Salzano FM, Sacchet AMOF. 1974. Cytological and evolutionary relationship in Brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). *Caryologia* 27:455-465.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. Introducción al usos de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ra Edición. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN. pp 220.
- Forbes I, Burton GW. 1961a. Induction of tetraploidy and a rapid field method of detecting induced tetraploidy in Pensacola bahiagrass. *Crop Sci* 1:383-383.
- Forbes I, Burton GW. 1961b. Cytology of diploids natural and induced tetraploids and intraespecies hybrids of bahiagrass *Paspalum notatum* Flüggé. *Crop Sci* 1:402-406.

- Gates RN, Quarin CL, Pedreira CGS. 2004. Bahiagrass. pp 651-680. In: Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (Eds.). Warmseason (C4) grasses. *Agron Monogr* 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
- Gilles A, Randolph LF. 1951. Reduction of quadrivalent frequency in autotetraploid maize during a period of 10 years. *Am J Bot* 38:12-17.
- Giussani LM, Zuloaga FO, Quarín CL, Cota-Sánchez H, Ubayasena K, Morrone O. 2009. 1. Phylogenetic Relationships in the Genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): An Assessment of the Quadrifaria and Virgata Informal Groups. *Syst Bot* 34:32-43.
- Grattapaglia D, Sederoff R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-test cross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137.
- Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC. 2008. *Genetica*. Editorial Mc Graw Hil, Madrid.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U. 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends Genet* 17:597-604.
- Grivet L, D'Hond A, Roques D, Feldman P, Lanaud C, Glazmann JC. 1996. RFLP mapping incultivated sugarcane (*Sacharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142:987-1000.
- 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, Mexico.
- Gustine DL, Sherwood RT, Huff DR. 1997. Apospory-linked molecular markers in Buffelgrass. *Crop Sci* 37:947-951.
- Haldane JBS. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genetics* 8:299-309.
- Hanna WW. 1995. Use of apomixis in cultivar development. *Adv Agron* 54:333-350.
- Harlan JR, Brooks MH, Borgaonkar DS, de Wet JMJ. 1964. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Bot Gaz* 125:41-46.
- Hojsgaard DH, Martínez EJ, Acuña CA, Quarin CL, Pupilli F. 2011. A molecular map of the apomixis-control locus in *Paspalum procurrens* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. *Theor Appl Genet* 125:959-971.
- Honfi AI, Quarin CL, Valls JFM. 1990. Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. *Darwiniana* 30:87-94.

- Hulbert SH, Ilott TW, Legg EJ, Lincoln SE, Lander ES, Michelmore RW. 1988. Genetic analysis of the fungus *Bremia lectucae* using restriction fragment length polymorphism. *Genetics* 120:947-958.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucl Acids Res* 16:10053-10971.
- Judziewicz EJ. 1990. Poaceae (Gramineae). En: Flora of the Guianas, Görts-Van Rijn ARA (Ed.). Koeltz, Koenig-stain.
- Kantety RV, Rota ML, Mathius DE, Sorrels ME. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Pl Mol Biol* 48:501-510.
- Kearsey MJ, Pooni HS. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. In: Kearsey MJ, Pooni HS (Eds.). Chapman & Hall, London, UK.
- Killeen TJ. 1990. The grasses of Chiquitania, Santa Cruz, Bolivia. *Ann Mo Bot Gard* 77:125-201.
- Koltunow AM. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Pl Cell* 5:1425-1437.
- Kosambi DD. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12:172-175.
- Krebs SL, Hancock JF. 1989. Tetrasomic inheritance of isoenzyme markers in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L. *Heredity* 63:11-18.
- Lacadena JR. 1988 Genética. 4ta Edición. Editorial Agesa, España.
- Lacadena JR. 1996. Citogenética. Editorial Complutense S.A., Madrid. Pp 931.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Laspina NV, Vega T, Seijo JG, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JP, Echenique VC, Quarín CL, Pessino SC. 2008. Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol* 67:615-628.
- Leblanc O, Grimanelli D, González de León D, Savidan Y. 1995. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theor Appl Genet* 90:1198-1203.

- Lerceteau-Kölher E, Guerin G, Laigret F, Denoges-Rothan B. 2003. Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance of octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theor Appl Genet* 107:619-628.
- Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:398-401.
- Liu B, Vega JM, Feldman M. 1998. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low copy coding DNA sequences. *Genome* 41:535-542.
- Lombarda P, Busti A, Cáceres ME, Pupilli F, Arcioni S. 2002. An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemizyosity in a portion of the apomixis-controlling locus in *Paspalum simplex*. *Genome* 45:513-519.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC. 2007. Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. *Plant Sci* 172:970-977.
- Martínez EJ, Quarín 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, Quarín CL, Hayward MD. 1999. Genetic control of apospory in apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 64: 425-433.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA. 2001. Inheritance of apospory in bahiagrass *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135:19-25.
- Martínez EJ, Hopp HE, Stein J, Ortiz JPA, Quarín CL. 2003. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Mol Breed* 12:312-327.
- Martínez EJ, Acuña CA, Hojsgaard DH, Tcach MA, Quarín CL. 2007. Segregation for asexual seed production in *Paspalum* achieved by male gametes of apomictic triploid plants. *Ann Bot* 100:1239-1247.
- Mather K. 1957. The measurement of linkage in heredity. Methuen & Co., London.
- Matzk F, Meister A, Schubert I. 2007. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J* 21:97-108.

- Michelmore RW, Paran I, Kesselli V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *PNAS* 88:9828-9832.
- Miles JW. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Sci* 47:238-249.
- Nicora EG, Rúgolo de Agrasar ZE. 1987. Los géneros de gramíneas de América Austral: Argentina, Chile, Uruguay y áreas limítrofes de Bolivia, Paraguay y Brasil. First ed. Hemisferio Sur Ed., Buenos Aires.
- Nogler GA. 1982. How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Bot Helv* 92:13-22.
- Nogler GA. 1984. Gametophytic apomixis. In: *Embryology of angiosperms*. Johri BM Ed. Springer: Berlin, Heidelberg, New York. pp 475-518.
- Normann GA, Quarin CL, Burson BL. 1989. Cytogenetics and reproductive behaviour of different chromosome races in six *Paspalum* species. *J Hered* 80:24-28.
- Noyes RD, Reiseberg LH. 2000. Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155:379-390.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Bhat V, Hayward MD, Quarin CL. 2001. A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop Sci* 41:823-830.
- Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña CA, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F. 2012. Comparative genomics of apomixis in *Paspalum* (en preparación).
- Ozias-Akins P, Roche D, Hanna WW. 1998. Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *PNAS* 95:5127-5132.
- Ozias-Akins P, van Dijk PJ. 2007. Mendelian genetics of apomixis. *Annu Rev Genet* 41:509-537.
- Pamilo P. 1987. Heterozygosity in apomictic organisms. *Hereditas* 107:95-101.
- Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, Do Valle CV, Hayward MD. 1998. A genetic map of the apospory region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128:153-158.

- Pessino SC, Ortiz JPA. 2010. Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. pp 403-420. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Levitus G et al. (Eds.). Ediciones INTA.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Leblanc O, do Valle CB, Evans C, Hayward MD. 1997. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor Appl Genet* 94:439-444.
- Pessino SC, Espinoza F, Martinez EJ, Ortiz JPA, Valle EM, Quarin CL. 2001. Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134:35-42.
- Pichot C, El Maataoui M, Raddi S, Raddi P. 2001. Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* 412:39.
- Podio M, Rodríguez MP, Felitti S, Stein J, Martínez EJ, Siena LA, Quarin CL, Pessino SC, Ortiz JPA. 2012. Sequence characterization *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genet Mol Biol* (in press).
- Pohl RW, Davidse G. 1971. Chromosome numbers in Costa Rican grasses. *Brittonia* 23:293-324.
- Polegri L, Calderini O, Arcioni S, Pupilli F. 2010. Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong. Flowers. *J Exp Bot* 61:1869-1883.
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia E, Falistocco E, Falcinelli M. 2002. Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-test cross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor Appl Genet* 104: 273-280.
- 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. *Aus 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.
- Pupilli F, Labombarda P, Cáceres ME, Quarin CL, Arcioni S. 2001. The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Mol Breed* 8:53-61.

- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarin CL, Arcioni S. 2004. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol Genet Genomics* 270:539-548.
- Qu L, Hancock JF. 1995. Nature of 2n gamete formation and mode of inheritance in interspecific hybrids of diploid *Vaccinium darrowi* and tetraploid *V. corymbosum*. *Theor Appl Genet* 91:1309-1315.
- Qu L, Hancock JF. 1998. Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrowi* and autotetraploid *V. corymbosum*. *Am J Bot* 85:698-703.
- Qu L, Hancock JF. 2001. Detecting and mapping repulsion-phase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theor Appl Genet* 103:136-143.
- Quarin CL. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsl* 5:8-15.
- Quarin CL. 1999. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 11:331-335.
- 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, Lombardo EP. 1996. Niveles de ploidia y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Graminae). *Mendeliana* 7:101-107.
- 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.
- Quesenberry KH, Dampier JM, Lee YY, Smith RL, Acuña CA. 2010. Doubling the chromosome number of Bahiagrass via tissue culture. *Euphytica* 175:43-50.
- Ramsey J, Schemske DW. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Ann Rev Ecol Syst* 29:467-501.

- Rebozzio RN, Rodríguez MP, Stein J, Ortiz JPA, Quarín CL, Espinoza F. 2012. Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass *Paspalum notatum* Flügge. *Mol Breed* 29:189-198.
- Reeder JR. 1967. Notes on Mexican grasses VI. Miscellaneous chromosome numbers. *Bull Torr Bot Club* 94:1-17.
- Ripol MI, Churchill GA, Da Silva JAG, Sorrels M. 1999. Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids. *Gene* 235:31-41.
- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F. 1990. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125:645-654.
- Rodríguez MP, Cervigni GDL, Quarín CL, Ortiz JPA. 2012. Frequencies and variation in cytosine methylation patterns in diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum notatum*. *Biol Plantarum* 56:276-282.
- Rosenberg O. 1908. Cytological studies on the apogamy in *Hieracium*. *Bot Tidsskr* 28:143-170.
- Rosenberg O. 1930. Apogamie und parthenogenesis bey pflanzen. En: Baur E et al. (Eds.), Berlin.
- Russel PJ. 1996. Linkage, crossing-over, and gene mapping in eukaryotes. En: Russel PJ (Ed.). *Genetics*. New York.
- Russel PJ. 2005. *iGenetics: a molecular approach*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cummings B (Ed.).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sartor ME, Quarín CL, Espinoza F. 2009. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Sci* 49:1270-1276.
- SAS Institute. 2004. *SAS/STAT user's guide release*. Release 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Saura F. 1941. Cariología de algunas especies del género *Paspalum*. *Inst Genét Fac Agron Vet Univ Buenos Aires* 2:41-48.
- 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. 2000. Apomixis: Genetics and breeding. *Pl Breed Rev* 18:13-86.

- Selva SB. 1976. Some preliminary observations on a new basic number in *Paspalum convexum* (Gramineae). *Canadian J Bot* 54:385-394 .
- Sherwood RT, Berg CC, Young BA. 1994. Inheritance of apospory in Buffelgrass. *Crop Sci* 34:1490-1494.
- Soltis DE, Riesenbergh LH. 1986. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insides from enzyme electrophoresis. *Am J Bot* 73:310-318.
- Sorrells ME. 1992. Development and application of RFLPs in polyploids. *Crop Sci* 32:1086-1091.
- Spillane C, Steimer A, Grossniklaus U. 2001. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. *Sex Plant Reprod* 14:179-187.
- Spillane C, Curtis MD, Grossniklaus U. 2004 Apomixis technology development—virgin births in farmers' fields? *Nature Biotech* 22:687-691.
- Saha MC, Mian R, Zwonitzer JC, Chekhovskiy K, Hopkins AA. 2005. An SSR and AFLP based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor Appl Genet* 110:323-336.
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J* 3:739-744.
- Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA. 2004. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet* 109:186-191.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarín CL, Ortiz JPA. 2007. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flügge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breed* 20:153-166.
- Sturtevant AH. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by mode of association. *J Exp Zool* 14:43-59.
- Suzuki DT, Griffiths AJF, Miller JH, Lewontin RC 1996. Introducción al análisis genético. Cuarta ed. Interamericana Mc Graw Hill. Madrid.
- 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.

- 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.
- Urbani MH. 1996. Estudios sobre citología sistema reproductivo y compatibilidad polen-pistilo de *Panicum dichotomiflorum* y *Paspalum fasciculatum* (Gramineae:Paniceae). *Darwiniana* 34:193-198.
- Valle CB, Glenke C. 1993. Towards defining the inheritance of apomixis in *Brachiaria*. *Apomixis Newsl* 6:24-25.
- Van Ooijen JW, Voorrips RE. 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vision TJ, Brown DG, Shmoys DB, Durrett RT, Tanksley SD. 2000 Selective mapping: a strategy for optimizing the construction of high-density linkage maps. *Genetics* 155:407-420.
- Vos PR, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23:4407-4414.
- Warmke HE. 1954. Apomixis in *Panicum maximum*. *Am J Bot* 41:5-11.
- Warnke SE, Barker RE, Jung G, Sim S-C, Mian MAR, Saha MC, Brilman LA, Dupal MP, Foster JW. 2004. Genetic linkage mapping of an annual x perennial ryegrass population. *Theor Appl Genet* 109:294-304
- 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.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor Appl Genet* 83:294-300.
- 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.