



## Trabajo final: modalidad Tesina

“Análisis del sistema genético en híbridos interespecíficos obtenidos por cruzamiento de dos especies del grupo Plicatula de *Paspalum*.”

**Autor:** Lutz, Silvia Analía.

**Asesor:** Espinoza, Francisco

**Lugar de trabajo:** Catedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias – UNNE.

**Lugar y Fecha:** Corrientes, Argentina - 2020

Índice:

Resumen	2
Introducción y Antecedentes	3
Objetivos	5
Materiales y Métodos	6
Resultados y Discusión	9
Conclusiones	15
Bibliografía	16

Resumen:

*Paspalum glaucescens* Hack. es una especie forrajera nativa que pertenece al grupo Plicatula. El objetivo fue obtener nuevos híbridos interespecíficos entre esta especie y una planta autotetraploide sexual inducida (4PT) de *P. plicatulum* Michx. Se realizaron cruzamientos entre estas especies y se estudió la fertilidad, el modo reproductivo, y la meiosis del padre 4x y de los híbridos logrados. La fertilidad se analizó en algunos individuos de las F1 obtenida y en sus parentales, considerando la proporción de espiguillas que formaron granos en condiciones de autopolinización y polinización libre. El modo reproductivo se determinó observando el tipo de sacos embrionarios en los óvulos y el contenido relativo de ADN entre embrión y endospermo de cariopses maduros por Citometría de Flujo. El estudio de la meiosis se realizó observando en células madres del polen (CMP) las asociaciones cromosómicas de las células en las fases de diacinesis y metafase I. Los resultados obtenidos fueron la producción variable de semillas por parte de los híbridos, siendo la misma siempre mayor en polinización libre. El contenido relativo de ADN entre embrión y endospermo, revelaron que el citotipo 4x de *P. glaucescens* es apomíctico, carácter que segregó entre los híbridos logrados: 6 sexuales y 3 apomícticos. En la meiosis de *P. glaucescens* se observaron básicamente bivalentes (II) y cuadrivalentes (IV), similar a lo observado en el autotetraploide inducido 4PT 4xS. Del mismo modo, los cromosomas de los híbridos se asociaron principalmente como II y algunos IV, evidenciando el origen autopolíodo de *P. glaucescens* 4x, y la homología entre los genomas de ambas especies. Las asociaciones IV observadas en los híbridos y la fertilidad de los mismos permiten suponer que es posible la transferencia génica mediante hibridaciones en un programa de mejoramiento de estas forrajerías. La transmisión del carácter apomixis a la descendencia permitiría utilizar esta característica en dicho programa.

### Introducción y Antecedentes:

*Paspalum* L. es miembro de la tribu Paniceae de la familia Poaceae. De acuerdo con estudios filogenéticos recientes (Morrone et al., 2012), es uno de los géneros más numerosos dentro de las gramíneas, con aproximadamente 330 especies y una marcada variabilidad morfológica. Habitán principalmente en América, desde regiones tropicales hasta regiones templadas cálidas (Zuloaga y Morrone, 2005), con pocas especies en África y Asia. En América del Sur, el género presenta una mayor diversidad específica en Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Incluye hierbas perennes, rara vez anuales, cespitosas, bajas a muy robustas, a veces rastreras. Las especies de este género crecen en una amplia diversidad de hábitats y presentan una gran adaptabilidad ecológica. Preferentemente viven en sabanas o praderas abiertas con suelos húmedos, desde el nivel del mar hasta los 2500 m.s.n.m. aproximadamente, llegando en algunos casos hasta los 4200 m.s.n.m., (Cialdella et al., 1995; Morrone et al., 1995). Otras crecen en las márgenes de ríos o arroyos, en costas marinas o en terrenos periódicamente inundables, en algunos casos como plantas acuáticas flotantes de aguas poco profundas (Morrone et al., 1996). Mientras que otras especies prefieren suelos secos, arcillosos o arenosos, generalmente salinos (Burkart, 1969). Entre las ventajas económicas del género para la región se destacan el valor forrajero de muchas especies, la amplitud ecológica y las variaciones en caracteres morfológicos y reproductivos.

La mayoría de las especies de *Paspalum* se caracterizan por tener un número cromosómico múltiplo de 10, existiendo especies diploides ( $2x$ ) hasta  $16x$ . La poliploidía es frecuente en el género, encontrándose especies que son autopolíploides y otras son allopólipoles. Usualmente las especies que son autopolíploides, tienen citotipos tetraploides ( $4x$ ) que se reproducen por apomixis. En general, la mayoría de las especies apomícticas son tetraploides y usualmente tienen la contrapartida co-específica  $2x$  y de reproducción sexual (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013). Consecuentemente, se considera que los factores evolutivos que contribuyeron al éxito y dispersión de sus especies han sido básicamente la poliploidía y la apomixis (Quarin, 1992). Plantas  $4x$  que sean 100% sexuales aún no se han encontrado en poblaciones naturales. Para realizar hibridaciones a nivel  $4x$  es necesario contar con plantas  $4x$  sexuales, donde estas actúan como progenitores femeninos en cruzamientos con genotipos apomícticos. Plantas  $4x$  fueron generadas artificialmente a partir de plantas  $2x$  por la inducción con colchicina en especies como *P. notatum* (Forbes y Burton, 1961; Quarin et al., 2001; Quesenberry et al., 2010) *P. simplex* (Cáceres et al. 1999), *P. hexastachyum* (Quarin y Hanna, 1980), *P. rufum* (Quarin et al., 1998; Delgado et al., 2016). Sin embargo, al duplicar los cromosomas no siempre se obtienen plantas completamente sexuales (Quarin et al., 2001).

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 *Paspalum plicatulum*, especie emblemática del grupo. Este grupo incluye unas 30 especies (Chase, 1929), la mayoría de ellas importantes forrajerías nativas con citotipos  $2x$  y de reproducción sexual y citotipos poliploides (principalmente  $4x$ ) que se reproducen por apomixis. Dentro del mismo existen plantas perennes o anuales, terrestres o palustres, inflorescencias usualmente con numerosos racimos, rígidos, espiguillas marcadamente plano-convexas, lemmas con arrugas transversales y antecio superior castaño-oscuro (Zuloaga y Morrone, 2005). 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. Mediante selección de genotipos con buenas características agronómicas, se han inscriptos en el INASE cultivares 4x apomícticos (4xA) de las especies *P. atratum* (cv. Cambá FCA) y *P. guenoarum* (cv. Chané FCA).

Por otra parte, investigadores de nuestro grupo han logrado plantas 4x sexuales (4xS) a partir de una especie 2x de *P. plicatulum* mediante duplicación cromosómica con colchicina (Sartor et al., 2009). Estas plantas permitieron realizar una serie de cruzamientos inter e intraespecíficos a nivel 4x dentro del grupo Plicatula (Aguilera et al., 2011; 2015; Novo et al., 2013; 2016; 2019; 2020). Los resultados obtenidos hasta el momento permitieron iniciar los estudios genéticos relacionados con la herencia de la apomixis (Aguilera, 2013) y el establecimiento de una población sintética dentro del grupo constituida exclusivamente por individuos 4x sexuales con diferentes combinaciones genotípicas (Novo et al., 2020). Sin embargo, es necesario avanzar con nuevos cruzamientos incluyendo otras especies como parentales masculinos a los efectos de verificar capacidad de hibridación, fertilidad y comportamiento reproductivo de los nuevos híbridos y análisis citogenético a los efectos de establecer el origen de estos poliploides naturales.

*Paspalum glaucescens* Hack. (= *P. yaguaronense* Henrard.) es una especie forrajera nativa que pertenece al grupo Plicatula y habita en campos, sabanas o bajos pantanosos de Argentina, Uruguay, Paraguay y Brasil. Son plantas perennes, cespitosas, con rizomas de entrenudos cortos y cañas erectas. Entre sus características morfológicas, se destaca la presencia de un pseudopécíolo de la ½ a ¾ del largo de la lámina. Además, se lo clasifica como un forraje apetecido, medianamente productivo (Zuloaga y Morrone, 2005). Esta especie cuenta con citotipos diploides ( $2n=2x=20$ ), de reproducción sexual y alógamos por autocompatibilidad (Pritchard, 1962). Se han descripto citotipos tetraploides ( $2n=4x=40$ ), de reproducción apomíctica y autofértil, donde se ha observado una alta frecuencia de II durante la meiosis, sugiriendo un origen alloploide. Mientras que en otras accesiones fueron observados un mayor número de IV, lo que sugiere que estos individuos son allotetraploides segmentarios, presentando los genomas de esta especie una homología parcial, siendo este comportamiento común en el género *Paspalum* (Pagliarini et al., 2001). También se han encontrado citotipos hexaploides de esta especie ( $2n=6x=60$ ), coincidiendo con los respectivos tetraploides en modo de reproducción y asociaciones cromosómicas (Takayama et al., 1998), reafirmando una correlación entre número cromosómico y modo reproductivo frecuente en este género (Burson y Quarín, 1992). Estudios acerca de la distribución geográfica de diferentes especies de *Paspalum* revelaron una relación entre nivel de ploidía y condiciones ambientales (Cabrera y Willink, 1973; Quarín y Lombardo, 1996; Norrmann et al., 1989). Esto fue observado para esta especie en Brasil, encontrando una mayor proporción de citotipos 2x en planicies, mientras que los citotipos 4x claramente predominaban en las alturas (Pozzobon y Valls, 2000).

Cruzamientos interespecíficos con la planta sexual de *P. plicatulum* permitirían establecer el verdadero origen genético y liberar la diversidad contenida de esta especie apomíctica, así como también ampliar la base genética de la población sintética sexual existente.

**Objetivos:**

- General:

Obtener nuevos híbridos interespecíficos entre la planta autotetraploide sexual de *P. plicatulum* y *P. glaucescens*, una especie tetraploide apomíctica natural.

- Específicos:

- ✓ Realizar cruzamientos utilizando como madre a la planta sexual 4PT de *P. plicatulum* y como parental masculino a *P. glaucescens*.
- ✓ Determinar el origen híbrido de la progenie F1.
- ✓ Determinar la fertilidad y modo reproductivo de los híbridos.
- ✓ Determinar del origen genético de *P. glaucescens*.
- ✓ Seleccionar híbridos sexuales para la incorporación a la población sexual sintética existente.

## Materiales y Métodos:

### Material vegetal:

Se utilizaron ejemplares de *Paspalum plicatulum* 4PT (4xS) y de *P. glaucescens* (4xA) que se encuentran creciendo en parcelas experimentales y en macetas dentro de un invernáculo, ambos ubicados en la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias.

### Cruzamientos y obtención de las progenies:

Se realizaron cruzamientos interespecíficos, utilizándose como parental femenino a la planta tetraploide sexual 4PT de *P. plicatulum* obtenida previamente mediante duplicación cromosómica de una planta diploide sexual (Sartor et al., 2009), y como parental masculino al genotipo Q4337 de *P. glaucescens* (Figura 1). La planta madre 4PT se caracteriza por ser totalmente autoincompatible y, por lo tanto, no fue necesario hacer emasculación antes de hacer la polinización. Antes del inicio de la floración, las inflorescencias de la planta madre fueron aisladas usando sobres de papel sulfito para evitar la contaminación con polen de genotipos extraños. Se colectó el polen y se polinizaron las inflorescencias aisladas. Este proceso se repitió durante 4 a 6 días hasta que la planta madre completó la antesis de todas las espiguillas de la inflorescencia. Las inflorescencias polinizadas permanecieron ensobradas durante aproximadamente 30 días hasta el momento de la cosecha. Una vez cosechadas, fueron secadas en estufa a 37°C durante 24 horas y luego se separaron manualmente las espiguillas y se clasificaron como llenas o vacías utilizando un soplador de semillas (Seedburo Equipment Company 1022W. Jackson Blvd. Chicago. IL 60607 1-800-284-5779).



**Figura 1:** Parentales utilizados para realizar el cruzamiento, *P. plicatulum* 4PT (izquierda) y *P. glaucescens* (derecha).

#### Origen de los híbridos:

El origen híbrido de la progenie se determinó utilizando marcadores moleculares RAPD con electroforesis en geles de agarosa al 2% siguiendo la metodología descripta en Novo et al. (2013). Esta técnica permite detectar cualquier desviación genotípica de la F1 producto de un evento de hibridación. Los patrones de bandeo de los descendientes pueden ser comparados con los correspondientes a sus progenitores con la finalidad de establecer el origen genético de los mismos. Se realizaron extracciones de ADN a partir de hojas jóvenes de los individuos F1 y de ambos padres. Las amplificaciones de ADN de los parentales por PCR utilizando oligonucleótidos de la Universidad de British Columbia (UBC), Canadá, permitieron seleccionar aquellos oligonucleótidos polimórficos y especialmente seleccionar aquellos que presentaban bandas específicas del progenitor masculino. La presencia de estas bandas específicas en el perfil de cualquier planta F1 es un indicador de su origen híbrido.

#### Estudios de fertilidad:

La fertilidad se analizó en algunos individuos de las F1 obtenida y en sus parentales, considerando la proporción de espiguillas que formaron granos en condiciones de autopolinización y polinización libre. La autopolinización se realizó ensobrando 2 o 3 inflorescencias de cada planta con sobres de papel sulfito, un día antes del inicio de la antesis, para prevenir el ingreso de polen extraño y así obligar a las espiguillas a autopolinizarse. Estas permanecieron ensobradas hasta la maduración de las semillas (aproximadamente 30 días). En las polinizaciones libres las inflorescencias fueron ensobradas una vez finalizada la antesis de todas las espiguillas y permanecieron así hasta completar su maduración. Posteriormente, se colectaron los sobres y se cosecharon las semillas.

#### Determinación del modo reproductivo:

El modo reproductivo de las F<sub>1</sub> se determinó por citometría de flujo utilizando un citómetro Partec PAII (Ploidy Analiser II, Partec GmgH, Münster, Alemania) de acuerdo a la metodología descripta por Matzk et al. (2000), el cual cuantifica la relación del contenido relativo de ADN entre el embrión y el endospermo de semillas maduras. Las plantas que producen semillas con una proporción de contenido de ADN de 2:3 para el embrión y el endospermo se consideran de reproducción sexual, en cambio aquellas plantas que producen semillas con una proporción de embrión:endospermo de 2:5 son consideradas apomícticas. Sin embargo, aquellas plantas que producen semillas con una proporción de embrión:endospermo 2:3 y semillas con una proporción de 2:5, son consideradas apomícticas facultativas. Para cada planta, el análisis se realizó en grupos ("bulks") de 2 a 5 cariopses. Los cariopses fueron finamente cortados con una hoja de afeitar en 0,5 ml de "buffer" para extracción nuclear, dejando incubar durante 2 minutos, para luego ser filtrada y transferida a un tubo con 1,5 ml del "buffer" de tinción fluorescente 4 $\alpha$ 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los "buffers" de extracción y tinción son parte de un kit comercial CyStain UV Precise P Partec, Münster, Germany.

#### Estudios de la meiosis:

El análisis se realizó en algunos individuos de la población F1 y en sus parentales. Los preparados de meiosis se realizaron a partir de espiguillas tomadas de inflorescencias inmaduras, fijadas en solución 5:1 (v/v) de etanol absoluto:ácido láctico por 24 horas y luego fueron almacenadas en

etanol al 70 % a 4°C. A partir del aplastado de anteras jóvenes en carmín acético al 2%, se realizaron preparados citológicos permanentes con una solución de terpentina de Venecia en los que se observaron células madres del polen (CMP). Los preparados permanentes fueron observados con un microscopio óptico de luz transmitida y eventualmente con contraste de fases para estudiar las asociaciones cromosómicas de las células en las fases de diacinesis y metafase I.

#### Selección de híbridos:

La selección de híbridos que ingresaron a la población sintética de plantas sexuales existentes en el IBONE se realizó entre las F1, teniendo en cuenta el modo reproductivo, la fertilidad y otros caracteres de interés agronómico.

## Resultados y Discusión:

Cruzamientos y obtención de las progenies:

Un total de 413 flores de la planta 4PT de *P. plicatulum* fueron polinizadas con polen de *P. glaucescens* y se obtuvieron 26 semillas llenas (6,3%), el porcentaje de germinación fue de 38,4% obteniéndose 10 plantas que fueron trasplantadas a campo (Figura 2). La cruzabilidad de este cruzamiento fue del 2,42%.



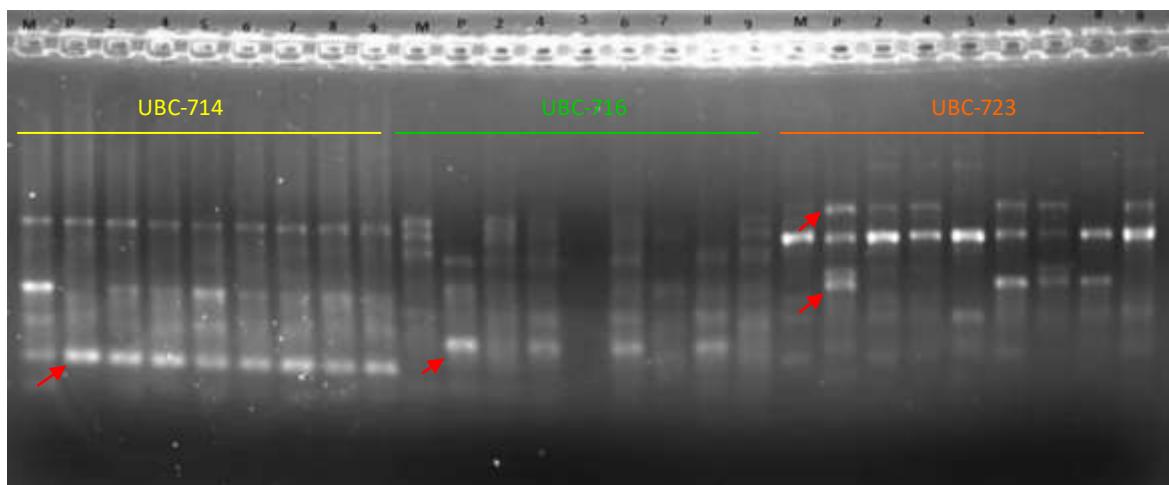
**Figura 2:** Progenie obtenida del cruzamiento *P. plicatulum* 4PT  
x *P. glaucescens* Q4337.

Si bien la cruzabilidad fue baja, se confirmó la posibilidad de cruzamientos entre estas especies, lo cual confirma que es posible movilizar los genes fijados por la apomixis en *P. glaucescens* 4x, tal como ocurrió con otras especies del grupo Plicatula (Aguilera et al., 2011; Novo et al., 2013; 2016; 2017; 2020).

Origen de los híbridos:

El origen híbrido de la progenie se determinó mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. Previamente se realizó la búsqueda de oligonucleótidos que mostraron polimorfismos entre los padres. Fueron analizados un total de 24 primers y fueron seleccionados 6 (UBC406, UBC428,

UBC434, UBC714, UBC716, UBC723) porque produjeron un buen perfil de los fragmentos amplificados por PCR y especialmente porque eran polimórficos entre ambos parentales. Se consideró que los individuos de la progenie se originaron por un evento de hibridación cuando presentaron algún marcador específico del padre y/o mostraron una desviación del perfil de bandas materno como consecuencia de la segregación. Con este estudio se pudo comprobar que toda la progenie se originó por hibridación ya que las mismas presentaron al menos un marcador específico del parental masculino con algunos de los primers utilizados (Figura 3).



**Figura 3:** Gel de agarosa donde se pueden observar los patrones de amplificación por PCR de ambos parentales y los híbridos, utilizando los primers 714, 716 y 723. M: progenitor femenino, P: progenitor masculino. Las flechas indican el marcador molecular presente en el padre.

Esta técnica molecular de RAPD, mediante la combinación de diferentes decámeros, permitió comprobar el origen híbrido de todos los individuos de esta progenie, ya sea porque heredaron la banda específica del progenitor masculino, o porque mostraron una segregación en el perfil de bandas de la planta madre consecuencia de algún evento de recombinación. Resultados similares fueron obtenidos en estudios previos con otras especies del grupo (Aguilera et al., 2015; Novo et al., 2017).

#### Estudios de fertilidad:

El resultado de la fertilidad de los híbridos demostró que en todos los individuos produjeron semillas (Tabla 1). Dicha producción fue siempre mayor en polinización libre, con un promedio de 9,06% (4,63 - 12,96 %). En cambio, en autopolinización el promedio observado fue de 2,89% (1,08 - 6,53). Estos resultados sin similares a los obtenidos en el parental masculino (Tabla 1).

**Tabla 1:** Fertilidad determinada por la producción de semillas en los parentales y sus híbridos

Identificación	Producción de semillas en porcentaje	
	Autopolinización	Polinización libre
<b>Parental femenino (<i>Paspalum plicatulum</i> 4PT) *</b>	0	24,7
<b>Parental masculino (<i>P. glaucescens</i> Q4337)</b>	1,37	4,08
<b>Híbrido #1</b>	**	4,89
<b>Híbrido #2</b>	1,08	4,63
<b>Híbrido #4</b>	2,48	9,28
<b>Híbrido #5</b>	1,51	9,47
<b>Híbrido #6</b>	4,89	9,12
<b>Híbrido #7</b>	1,96	11,41
<b>Híbrido #8</b>	1,79	12,96
<b>Híbrido #9</b>	6,53	10,73

\* Sartor et al., 2009.

\*\*No se obtuvieron datos.

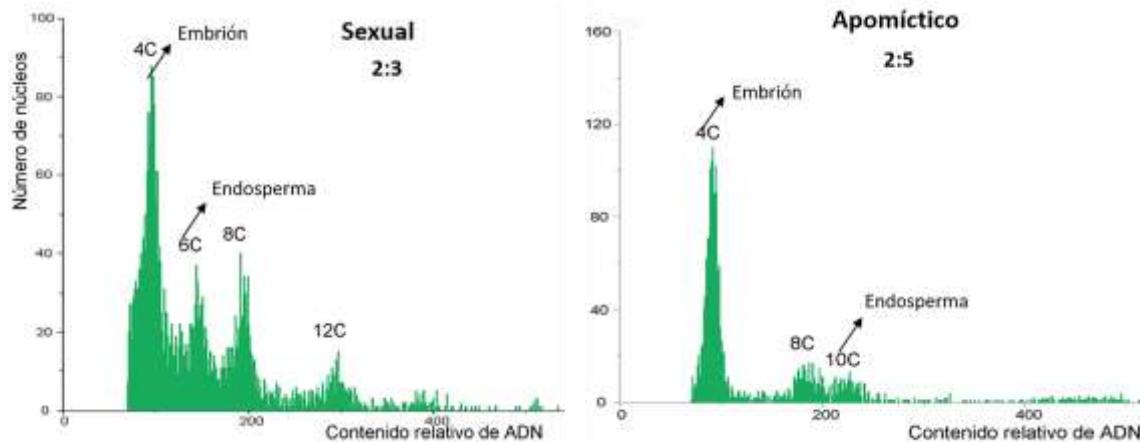
La mayor producción de semillas llenas en polinización libre que en autopolinización, puede deberse a cierto grado de autoincompatibilidad en los híbridos, carácter también observado en el parental masculino. Sin embargo, estos resultados indican que a pesar de ser bajo el porcentaje de semillas llenas en los híbridos (entre 4,6 y 12,9 % en polinización libre), es posible el intercambio genético entre estas 2 especies. La movilización de genes fijados por la apomixis en *P. glaucescens* permitió la obtención de híbridos fértiles con nuevas combinaciones génicas, tal como fuera demostrado en otros cruzamientos interespecíficos de especies del grupo Plicatula (Novo et al., 2017).

Determinación del modo reproductivo:

Solo se lograron analizar 9 de las 10 plantas obtenidas en el cruzamiento inicial, debido a que una de ellas no sobrevivió al primer año de crecimiento a campo y no se logró obtener semillas. Los resultados obtenidos del análisis del contenido relativo de ADN entre embrión y endospermo mediante citometría de flujo de las 9 plantas analizadas fueron: 6 plantas fueron clasificadas de reproducción sexual (66,6%) debido a que presentaron una relación de contenido relativo de ADN de 2:3 entre embrión:endospermo; mientras que las 3 plantas restantes fueron clasificadas como apomícticas facultativas (33,3%), al igual que el parental masculino, ya que algunos cariopses

tuvieron una relación de 2:3 y otros cariopses de la misma planta presentaron una relación de 2:5 (Figura 4, Tabla 2).

La segregación por el modo de reproducción de esta progenie fue de 1:3 entre individuos apomícticos y sexuales. Si bien es muy bajo el número de la progenie F1 para hacer un análisis de la segregación, estos resultados fueron similares a los observados en otros casos (Martínez et al., 2001; Aguilera et al., 2015).



**Figura 4:** Histogramas de contenido de ADN obtenidos por citometría de flujo en semillas de los híbridos. Izquierda: híbrido sexual; Derecha: híbrido apomíctico.

**Tabla 2:** Análisis del contenido relativo de ADN entre embrión y endospermo mediante citometría de flujo.

Individuos	Contenido de ADN del Embrión + (endospermo)			Modo reproductivo
	Nº de semillas	2C+(3C) (%)	2C+(5C) (%)	
<i>P. plicatulum</i> 4c-4x*	50	100	0	Sexual
<i>P. glaucescens</i> Q4337	50	92	8	Apomíctico facultativo
Híbrido #1	20	100	0	Sexual
Híbrido #2	50	94	6	Apomíctico facultativo
Híbrido #3	13	100	0	Sexual
Híbrido #4	50	100	0	Sexual
Híbrido #5	50	98	2	Apomíctico facultativo
Híbrido #6	50	100	0	Sexual
Híbrido #7	50	100	0	Sexual
Híbrido #8	50	100	0	Sexual
Híbrido #9	50	94	6	Apomíctico facultativo

\* Sartor et al., 2009

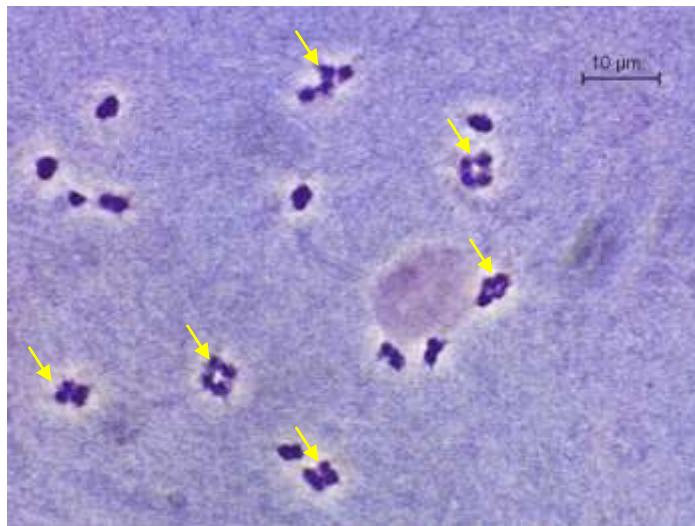
### Estudios de la meiosis:

En el análisis de la meiosis del parental masculino (Q4337) se observaron principalmente II y IV (Figura 5). En algunas CMP se observaron algunos monovalentes (I) (Tabla 3). El promedio de II fue de 12,74, mientras que el de IV fue de 3,26. Estos resultados son muy similares a lo observado por Sartor et al. (2009) en el autotetraploide inducido de la planta 4PT de *P. plicatulum*. Del mismo modo, los cromosomas de los híbridos analizados se asociaron principalmente como II y algunos IV (Figura 6), variando en rangos de 11 a 20 y de 0 a 4 respectivamente, evidenciando el origen autoploide de *P. glaucescens*, y cierto grado de homología entre los genomas de ambas especies (Tabla 3).

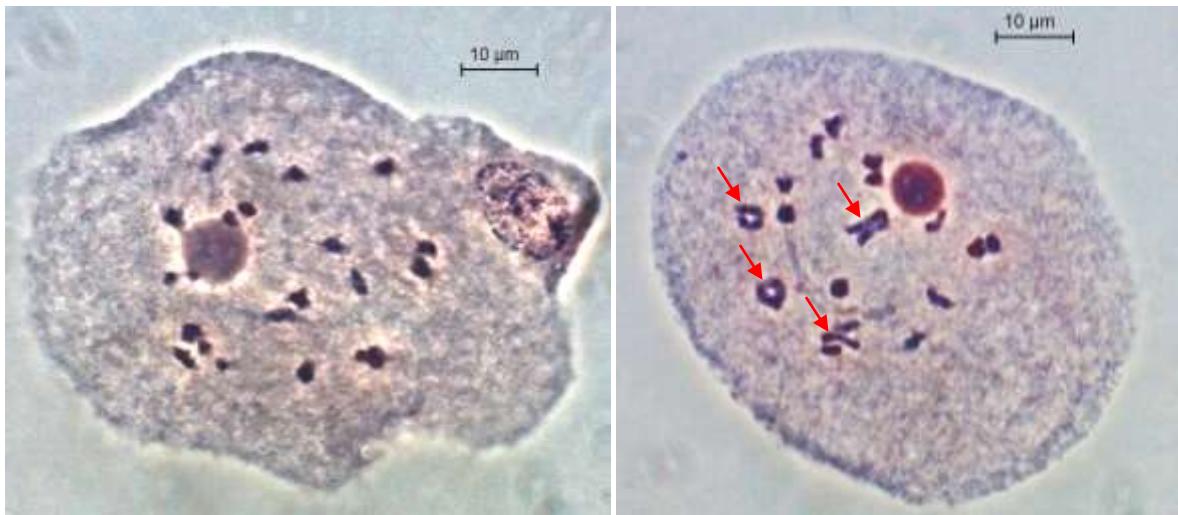
**Tabla 3:** Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de *P. plicatulum* (4PT), *P. glaucescens* (Q4337) y en dos híbridos interespecíficos entre ambas

Individuos	Nº de plantas	Nº de células	Promedio y rango por célula			
			I	II	III	IV
<i>P. plicatulum</i> (4PT) *	1	53	0,1 (0-1)	14,2 (8-18)	0,1 (0-1)	2,8 (1-7)
<i>P. glaucescens</i> (Q4337)	1	31	1,23 (0-4)	12,74 (8-17)	0,0 (0-0)	3,26 (1-6)
Híbridos	2	45	1,76 (0-6)	15,93 (11-20)	0,02 (0-1)	1,58 (0-4)

\*Sartor et al., 2009



**Figura 5:** Asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis del parental masculino. Las flechas señalan los IV.



**Figura 6:** Asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis de los híbridos. Izquierda: Híbrido #3; derecha: Híbrido #4. Las flechas señalan los IV.

Las observaciones obtenidas en este estudio respecto a las asociaciones cromosómicas son similares a los datos descriptos para otras accesiones 4x de *P. glaucescens* por Takayama et al. (1998), y Pagliarini et al. (2001). Sartor et al. (2009) observó en la planta 4xS de *P. plicatulum* rangos promedios de 1 a 7 IV por CMP, lo que sugiere que también es una especie autotetraploide. El alto porcentaje de cromosomas asociados como II y IV en los híbridos reafirman el origen autoploide de *P. glaucescens*, y cierta homología entre los genomas de ambas especies. Resultados similares fueron obtenidos por Aguilera et al. (2011) tras analizar la meiosis de híbridos interespecíficos entre *Paspalum plicatulum* y *P. guenoarum*. Estudios posteriores, realizados en individuos 4x de *P. guenoarum* y *P. lenticulare* (especies pertenecientes al grupo Plicatula) indicaron que las mismas son de origen autotetraploides. El origen autoploide ha sido sugerido para varias especies de *Paspalum* (Norrmann et al., 1989; Quarín, 1992) y fue demostrado por análisis citológico y/o genético en *P. notatum* (Forbes y Burton, 1961; Stein et al., 2004), *P. rufum* (Quarín et al., 1998) y en *P. simplex* (Pupilli et al., 1997).

#### Selección de híbridos para incorporarse a la población sintética sexual

De los híbridos que se reproducen por sexualidad, aquellos que presentaron mayor fertilidad (híbridos #6; #7 y #8) fueron seleccionados para integrar la población sintética tetraploide sexual existente para el grupo Plicatula. Estos nuevos híbridos serán próximamente incluidos en la población sintética (Novo et al. 2020).

Conclusiones:

1. Fue posible realizar cruzamientos interespecíficos entre *P. plicatulum* (4xS) y *P. glaucescens* (4xA), dos especies pertenecientes al grupo Plicatula.
2. Fue posible la obtención de híbridos interespecíficos que fueron fértiles y segregaron para el modo reproductivo.
3. Se determinó origen autoploide para *P. glaucescens*.
4. Este estudio permitió la selección de nuevos híbridos sexuales que será utilizados para ampliar la base genética de la población sintética tetraploide sexual del grupo Plicatula.

Bibliografía:

- Aguilera PM, Sartor ME, Galdeano F, Espinoza F, Quarín CL. (2011). Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. *Crop Science*, 51: 1544-1550.
- Aguilera PM. (2013). Genética y localización del locus de la apomixis en especies del grupo Plicatula de *Paspalum* L. reveladas por técnicas moleculares. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- Aguilera PM, Galdeano F, Quarín CL, Ortiz JPA, Espinoza F. (2015). Inheritance of Aposporous Apomixis in Inter-specific Hybrids Derived from Sexual *Paspalum plicatulum* and Apomictic *Paspalum guenoarum*. *Crop Science*, 55: 1947-1956.
- Burkart A. (1969). Gramíneas. *Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina)*, 6 (2), 1-551.
- Burson BL, & Quarín CL. (1992). Cytological relationship between *Paspalum dilatatum* and diploid cytotypes of *P. brunneum* and *P. rufum*. *Genome*, 35(2), 332-336.
- Cabrera AL, Willink A. (1973). *Biogeografía de América latina* (p. 117). Washington DC: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
- Cáceres ME, Pupilli F, Quarín CL, Arcioni S. (1999). Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica*, 110: 161-167.
- Chase, A (1929). The North American species of *Paspalum*. *Contr. U. S. Natl. Herb.* 28:1-310.
- Cialdella AM, Morrone O, Zuloaga FO. (1995). Revisión de las especies del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae), grupo Bonplandiana. *Darwiniana*, 67-95.
- Delgado L, Sartor ME, Espinoza F, Soliman M, Galdeano F, Ortiz JP. (2016). Hybridity and autoploidy increase the expressivity of apospory in diploid *Paspalum rufum*. *Plant Systematics and Evolution*, 302: 1471-1481.
- Forbes I jr, Burton GW. (1961). Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Science*, 1: 402-406.
- Martinez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA. (2001). Inheritance of apospory in Bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Matzk F, Meister A & Schubert I. (2000). An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant J* 21:97-108.
- Morrone O, Zuloaga FO y Carbono E. (1995). Revisión del grupo Racemosa del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Anales del Jardín Botánico de Missouri*, 82-116.
- Morrone O, Vega A, Zuloaga FO. (1996). Revisión de las especies del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae), grupo Dissecta (s. str.). *Candollea*, 51(1), 103-138.

- Morrone O, Aagesen L, Scataglini MA., Salariato DL, Denham SS, Chemisquy MA, Zuloaga FO. (2012). Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics*, 28(4), 333-356.
- Norrmann GA, Quarin CL, Burson BL. (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *J. Hereditas*, 80:24–28.
- Novo PE, Espinoza F, Quarin CL. (2013). An apomictic tetraploid *Paspalum chaseanum* cytotype and its cytogenetic relationship with *P. plicatum* (Poaceae): taxonomic and genetic implications. *Australian Journal of Botany*, 61:538–543.
- Novo PE, Valls JFM, Galdeano F, Honfi AI, Espinoza F, Quarin CL (2016). Interspecific hybrids between *Paspalum plicatum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. *Scientia Agricola*, 73: 356-362.
- Novo PE, Acuña CA, Quarin CL, Urbani MH, Marcon F, Espinoza F. (2017). Hybridization and heterosis in the Plicatula group of *Paspalum*. *Euphytica*, 213, 198.
- Novo PE, Galdeano F, Espinoza F, Quarin CL. (2018). Cytogenetic relationships, polyploid origin and taxonomic issues in *Paspalum* species: inter- and intraspecific hybrids between a sexual synthetic autotetraploid and five wild apomictic tetraploid species. *Plant Biology*, 21:267-277.
- Novo PE, Acuña CA, Urbani MH, Galdeano F, Espinoza F, Quarin CL. (2020). Genetic transfer from several apomictic tetraploid *Paspalum* species to an elite group of sexual plants. *Crop Science*, 60:1–11.
- Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ, Espinoza F, Pupilli F. (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany*, 112: 767-787.
- Pagliarini MS, Carraro LR, de Freitas PM, de Victor Adamowski E, Batista LAR, Valls JFM. (2001). Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. *Hereditas*, 135: 27-34.
- Pritchard AJ (1962). The cytology and reproduction of *Paspalum yaguaronense*. *Australian Journal of Agriculture Research*, 13:206-211.
- Pozzobon MT, Valls JFM. (2000). Cytogeography and variation of stomatal size of *Paspalum glaucescens* (Gramineae; Paniceae) in Southern Brazil. *Euphytica*, 116(3), 251-256.
- Pupilli EF, Cáceres ME, Quarin CL, Arcioni S. (1997). Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40:822–828.
- Quarin CL, Hanna WW (1980). Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science*, 20: 69-75.
- Quarin CL. (1992). The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter*, 5: 8-15.

- Quarin CL. (1994). A tetraploid cytotype of *Paspalum durifolium*: cytology, reproductive behavior and its relationship to diploid *P. intermedium*. *Hereditas*, 121(2), 115-118.
- 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 behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica*, 90:345-349.
- Quarín CL, Norrmann, GA, & Espinoza, F. (1998). Evidence for autoploidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Hereditas*, 129: 119-124.
- Quarin CL, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC, Bovo OA. (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*, 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.
- Sartor ME, Quarín CL, Espinoza F. (2009). Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Science*, 49: 1270-1276.
- Stein J, Quarín CL, Martinez 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.
- Takayama SY, Freitas PM, Pagliarini MS, Batista LAR. (1998) Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum* (Plicatula group) from different regions in Brazil. *Euphytica*, 99, 89.
- Zuloaga FO, Morrone, O. (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral. *Annals of the Missouri Botanical Garden; Monographs in Systematic Botany*, 102: 1–297.