



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

# **Caracterización genética de híbridos interespecíficos entre *Paspalum plicatulum* y *Paspalum atratum***

Trabajo final de graduación

-Modalidad tesina-

**Autor:** Villalba, Augusto I.

**Asesora:** Lic. (Dra.) Novo Patricia E.

**Lugar de trabajo:** Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE.

Ciudad de Corrientes, Argentina 2022

## ÍNDICE

<b>1 RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 General.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Específicos .....</b>	<b>5</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>6</b>
<b>4.1 Material vegetal .....</b>	<b>6</b>
<b>4.2 Cruzamientos y obtención de la progenie .....</b>	<b>6</b>
<b>4.3 Origen híbrido.....</b>	<b>7</b>
• Extracción de ADN .....	7
• Calidad y concentración de ADN.....	8
• Estudio de RAPDs.....	9
<b>4.4 Estudios de meiosis.....</b>	<b>9</b>
<b>4.5 Determinación del modo reproductivo .....</b>	<b>10</b>
<b>4.6 Estudios de fertilidad .....</b>	<b>10</b>
<b>5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>5.1 Cruzamiento y obtención de la progenie.....</b>	<b>12</b>
<b>5.2 Origen híbrido.....</b>	<b>12</b>
<b>5.3 Estudios de meiosis.....</b>	<b>13</b>
<b>5.4 Determinación del modo reproductivo .....</b>	<b>15</b>
<b>5.5 Análisis de la fertilidad .....</b>	<b>16</b>
• Producción de semillas.....	16
• Sanidad de las semillas.....	18
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>20</b>

## 1 RESUMEN

*Paspalum* L. (Gramineae) incluye aproximadamente 400 especies, la mayoría de ellas se caracterizan por ser de reproducción apomíctica. El grupo subgenérico Plicatula contiene cerca de 30 especies, todas integrantes importantes de las pasturas naturales sudamericanas. Para varias de ellas solo se conocen razas tetraploides apomícticas y por lo tanto el mejoramiento genético está extremadamente restringido, ya que no existen en esas poblaciones naturales, plantas tetraploides de reproducción sexual que puedan usarse de madres en cruzamientos con plantas apomícticas. Para algunas especies del grupo se conocen citotipos diploides sexuales. A partir de semillas de especies diploides se han conseguido, mediante tratamiento con colchicina, plantas tetraploides de reproducción sexual. En base a estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue obtener híbridos interespecíficos provenientes del cruzamiento entre la planta de *Paspalum plicatulum* 4PT, tetraploide sexual, obtenida experimentalmente  $\times$  *P. atratum* cv. Cambá FCA, tetraploide apomíctico. Para ello se realizó el cruzamiento interespecífico entre estas especies, obteniéndose una progenie de 188 individuos llevados a campo, de los cuales sobrevivieron 101 individuos. De los mismos se tomó una muestra de 38 individuos para corroborar su origen híbrido mediante marcadores moleculares RAPDs, resultando efectivamente productos de una hibridación interespecífica. En *P. atratum* cv. Cambá FCA y en algunos híbridos se estudió las asociaciones cromosómicas, indicando el origen allotetraploide segmentario del parental masculino. Asimismo, en la progenie se determinó el modo reproductivo por citometría de flujo, observándose una segregación tanto para la reproducción sexual como apomíctica. Además, se analizó la producción de semillas tanto en autopolinización como en polinización libre. Tanto en el parental masculino como en los híbridos la producción fue mayor en polinización libre; observándose en los híbridos un promedio del 20,38% de espiguillas llenas (8,45% - 43,73%). Sin embargo, en autopolinización el promedio observado fue inferior 13,68% (1,68% - 42,85%). La obtención y caracterización de híbridos interespecíficos permitirá la selección de híbridos sexuales que van a ser utilizados para ampliar la base genética de la población sintética tetraploide sexual del grupo Plicatula.

## 2 INTRODUCCIÓN

El género *Paspalum* L. comprende alrededor de 400 especies distribuidas principalmente en áreas tropicales a templadas cálidas de todo el mundo (Chase, 1929), con una mayor diversidad en el continente americano, principalmente en países como Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina donde se encuentran presentes en numerosos hábitats, con una gran adaptabilidad ecológica que permite encontrarlas desde sabanas, pantanos y praderas, hasta ambientes con suelos halófitos o anegados (Zuloaga & Morrone, 2005). Esta amplia diversidad de adaptación a diferentes ambientes se lo puede atribuir, a la variedad de estrategias reproductivas observadas en las diferentes especies que la componen (Quarin, 1992), lo cual ha tenido una gran influencia en la evolución y distribución del género (Bashaw et al., 1970).

En cuanto al número cromosómico presente en estas especies, gran parte de ellas poseen un número básico de cromosomas de  $x=10$  (Quarin, 1992). Sin embargo, se conocen especies con  $x=6$  (Quarin, 1974) y  $x=9$  (Davidse & Pohl, 1974). Las especies se pueden agrupar en taxones que son diploides ( $2n=2x=20$ ), y en poliploides de distintos niveles, mayoritariamente tetraploides ( $2n=4x=40$ ), pero también hay taxones multiplíoides donde para una misma especie existen más de un nivel de ploidía (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013).

Dentro del género, muchas de las especies forman parte de complejos poliploides, cuyos citotipos  $2x$  son sexuales ( $2xS$ ), alógamos, autoincompatibles y presentan una meiosis regular con asociaciones cromosómicas del tipo bivalentes. Sin embargo, en los poliploides co-específicos, en donde predominan los  $4x$ , son de reproducción apomíctica ( $4xA$ ), pseudógamos y con meiosis irregular con asociaciones multivalentes (mayormente cuadrivalentes).

El “Grupo Plicatula” es una categoría botánica informal e infragenérica establecida por Chase (1929) que incluye aproximadamente 30 especies morfológicamente afines a *P. plicatulum* Michx., la cual fue la primera especie descripta para el grupo (Chase, inédito). Las especies del grupo son fácilmente reconocidas por presentar espiguillas con antecio superior de color castaño oscuro brillante y lemma inferior con pliegues o arrugas transversales, de ahí el nombre del grupo: *plicatulum* que proviene del latín *plicatus* que significa plegado.

Las especies del grupo presentan una amplia variabilidad en sus caracteres vegetativos y reproductivos, por lo tanto, constituye un grupo heterogéneo sin una delimitación clara (Oliveira, 2004). El centro geográfico de variabilidad se encuentra en el centro y oeste de Brasil, el este de Bolivia y Paraguay (Quarin et al., 1997). Al igual que en el género, dentro del “grupo Plicatula” la mayoría de las especies son  $4xA$ , pero también se conocen citotipos  $2x$  de reproducción sexual como, por ejemplo: *P. plicatulum* (Espinoza & Quarin, 1997), *P. wrightii* Hitchc. & Chase (Martínez & Quarin, 1999, sub *P. hydrophylum* Henrard), *P. glaucescens* Hack. (Pritchard 1962, sub *P. yaguaronense* Henrard), *P. compressifolium*

Swallen (Quarin et al., 1996), *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001; sin. *P. limbatum*). En cambio, para algunas especies como ser: *P. nicorae* Parodi (Burson & Bennett, 1970), *P. guenoarum* Arech. (Pritchard, 1970), *P. atratum* Swallen (Quarin et al., 1997), y *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001), solo se conocen citotipos 4xA.

Muchas de estas especies tienen un alto valor forrajero (Quarin et al., 1997), por lo que es de gran importancia el estudio de la variabilidad genética, para poder lograr la introducción al cultivo de variedades mejoradas, que podrían incrementar notablemente el potencial ganadero de la región. Sin embargo, teniendo en cuenta la ausencia de genotipos 4x sexuales en la naturaleza, es un obstáculo que se genera para el mejoramiento genético por la vía de los cruzamientos, pero esta barrera es posible superar mediante el uso de agentes mutagénicos como ser la colchicina, para la duplicación de diploides sexuales, y así obtener tetraploides sexuales (4xS) que se puedan usar de madres en cruzamientos con tetraploides apomicticos.

Investigadores del Laboratorio de Genética de Pastos del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) y de la Facultad de Ciencias Agrarias UNNE (FCA-UNNE), han logrado duplicar el número cromosómico de genotipos 2x sexuales de *P. plicatulum* (Sartor et al., 2009) y de *P. chaseanum* (Carrizo, 2019), obteniendo genotipos 4xS. Una de las plantas duplicadas de *P. plicatulum* 4xS identificada como 4PT, se caracteriza por ser totalmente autoincompatible y permitió utilizarla como madre en varios cruzamientos intra e interespecíficos con especies tetraploides apomicticas, en donde se obtuvieron híbridos fértiles (Aguilera et al., 2011; Novo et al., 2013; 2015; 2017; 2019; Novo, 2020; Lutz, 2020). Sin embargo, existe un número interesante de especies, como *P. atratum* cv. Cambá FCA, *P. atratum* U44, *P. guenoarum* cv. Chané FCA de este grupo con las que no se pudieron realizar los cruzamientos, debido a que tienen un periodo de floración muy tardío (otoño), mientras que la floración de *P. plicatulum* 4PT ocurre en pleno verano (enero-febrero). No obstante, se logró modificar el periodo de floración de *P. plicatulum* 4PT, por medio de la modificación del fotoperiodo y el uso de giberelinas (Ruiz Díaz, 2020), y así se logró sincronizar la floración con las especies mencionadas anteriormente.

*Paspalum atratum*, es una especie que crece en suelos ácidos, infértilles y anegados de los trópicos y subtrópicos (Evers & Burson, 2004). Es una especie tetraploide apomictica, nativa de Brasil, con alto potencial de rendimiento forrajero, buena palatabilidad y buen rendimiento de semillas (Quarin et al., 1997). Se caracteriza por ser rizomatosa, con cañas de entre 1-1,5 m de alto, erectas, simples o ramificadas, glabros, pajizos o con tintes purpúreos; vainas largas, glabras a cortamente pilosas y los márgenes membranáceos. Láminas linear-lanceoladas, planas, glabras en ambas caras y pilosas hacia la porción basal de la cara abaxial, con márgenes usualmente con tintes violáceos. Inflorescencias terminales, racimos divergentes, ascendentes, alternos a subopuestos; espiguillas en pares, imbricadas, dispuesta en 4 series y anchamente elipsoides, con gluma inferior ausente, lemma inferior tan larga como la espiguilla, glabra y con pliegues transversales hacia la porción apical (Zuloaga & Morrone, 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 General

Obtener híbridos interespecíficos provenientes del cruzamiento entre la planta de *Paspalum plicatulum* 4PT × *Paspalum atratum* cv. Cambá FCA.

#### 3.2 Específicos

- Realizar cruzamientos interespecíficos utilizando como madre a la planta sexual de *P. plicatulum* y como padre al cultivar Cambá FCA de *P. atratum*.
- Determinar el origen híbrido de la F<sub>1</sub> con la utilización de marcadores moleculares.
- Establecer el grado de fertilidad de la progenie.
- Determinación del modo reproductivo de la F<sub>1</sub> a través del método de citometría de flujo.
- Analizar el comportamiento de los cromosomas en diacinesis y metafase I de la meiosis de los híbridos, en relación a sus parentales.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Se utilizó la planta 4PT de *P. plicatulum* 4xS (Figura 1 A), la cual se obtuvo experimentalmente a partir de un citotipo 2xS de *P. plicatulum*, mediante la duplicación cromosómica utilizando colchicina (Sartor et al., 2009). Asimismo, se utilizaron clones de *P. atratum* cv. Cambá FCA 4xA (Figura 1 B), el cual es uno de los cultivares logrados por el Laboratorio de Genética de Pastos, de la FCA-UNNE, inscripto en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas (INASE). Resolución N° 382 – SAGPyA.



Figura 1: Plantas parentales. A) *P. plicatulum* 4PT; B) *P. atratum* cv. Cambá FCA.

### 4.2 Cruzamientos y obtención de la progenie

Se realizaron cruzamientos interespecíficos en el mes de mayo de 2019, utilizándose como parental femenino a la planta tetraploide sexual de *P. plicatulum* 4PT obtenida experimentalmente por Sartor et al. (2009), y como parental masculino a *P. atratum* cv. Cambá FCA 4xA. Cabe destacar que teniendo en cuenta que el periodo de floración de ambas especies no coincide; *P. plicatulum* 4PT florece en pleno verano (enero-febrero), mientras que *P. atratum* cv. Cambá FCA es de floración tardía (abril-mayo), fue necesario realizar la sincronización de las floraciones de ambas especies. Para ello se logró retrasar la floración de la planta 4xS de *P. plicatulum* a través del control del fotoperiodo y el uso de giberelina (Ruiz Díaz, 2020), y así se pudo realizar el cruzamiento con entre ambas especies.

El cultivar Cambá FCA es una forrajera perenne que se obtuvo por selección a partir de una población natural, se implanta por semillas y es especialmente utilizada para terrenos con anegamiento temporario, característico del nordeste argentino. Vegeta durante el período primavero-estival; florece y fructifica en el otoño.

La planta 4PT de *P. plicatulum* se caracteriza por ser totalmente autoincompatible y, por lo tanto, no fue necesario realizar la emasculación antes de hacer la polinización. En la misma, se ensobraron las inflorescencias antes del inicio de la antesis usando sobres de papel sulfito, para evitar la contaminación con polen extraño. Luego se colectó el polen del parental masculino y se polinizó las inflorescencias aisladas del parental femenino, este procedimiento se repitió durante 4 a 6 días, hasta que la planta madre completó la antesis de todas sus espiguillas, las cuales permanecieron ensobradas durante 30 días hasta el momento de la cosecha. Una vez cosechadas, fueron colocadas en estufa a 37°C durante 24 horas, para luego separar las espiguillas de las inflorescencias manualmente y separar las llenas de las vacías mediante el uso de un soplador mecánico de semillas (Seedburo Equipment Company 1022W. Jackson Blvd.Chicago. IL 60607 1-800-284-5779).

De las semillas llenas obtenidas, se tomó una muestra, y fueron puestas a germinar en bandejas plásticas con suelo estéril en el mes de junio de 2019. Después de un mes aproximadamente de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a macetas que permanecieron en invernáculo hasta fines de la primavera, cuando se las llevó al campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

#### 4.3 Origen híbrido

Para corroborar el origen híbrido de la progenie se utilizó marcadores moleculares RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), siguiendo la metodología descripta en Aguilera et al. (2011). Se utilizaron aquellos cebadores (primers) de la Universidad de British Columbia (UBC), Canadá, que presentaron bandas exclusivas del parental masculino. La presencia de bandas exclusivas en el perfil de cualquier planta de la progenie es un indicador de su origen híbrido.

- Extracción de ADN

Se realizaron microextracciones de ADN genómico a partir de hojas jóvenes de la F<sub>1</sub> y de sus parentales, siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983). Se cortaron pequeñas porciones de hojas frescas, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido para luego molerlas en un mortero con pilón de porcelana, enfriados previamente con nitrógeno líquido. La molienda de las hojas obtenida se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml y se mantuvo en nitrógeno líquido hasta el momento de procesar las muestras, siguiendo la metodología descripta en Novo (2016).

A cada tubo Eppendorf se le agregó 1,3 ml de “buffer” de extracción [Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 50 mM (pH 8), NaCl 500 mM, SDS 2% y Polivinilpirrolidona 1% PM 360.000], el cual fue previamente precalentado a 68°C y al que se le agregó 100μl de β- mercaptoetanol por cada 10 ml de “buffer”. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 68°C. Luego se añadieron 250μl de acetato de potasio 5M y se incubaron en hielo durante 60 minutos. Los tubos Eppendorf se centrifugaron 10 minutos a 13000rpm en centrífuga Eppendorf 5407 refrigerada a 4°C. Se tomaron 900μl del

sobrenadante y se transfirieron a otro tubo Eppendorf de 2ml, se agregaron 1100 $\mu$ l de isopropanol frío y permanecieron toda la noche a -20°C.

Al día siguiente estos tubos fueron centrifugados nuevamente durante 10 minutos a 13000rpm a 4°C, se descartaron los sobrenadantes, se secaron los pellets a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Estos pellets se re suspendieron en 250 $\mu$ l de TE [Tris-HCl 10mM (pH 8) y EDTA 1mM (pH 8)] y se agitaron durante aproximadamente una hora para disolver los pellets. Luego se agregó a cada tubo 1 $\mu$ l de ARNasa (10mg/ml) y fueron mantenidos en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Cada una de las muestras fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1,5ml, conteniendo el mismo volumen de una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo. Los tubos fueron agitados durante algunos segundos y luego se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Luego, se transfirieron 150 $\mu$ l de la fase superior a tubos Eppendorf con 10 $\mu$ l de NaCl 5M y se le agregaron 500 $\mu$ l de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó durante toda la noche a -20°C. Luego al tercer día del proceso se centrifugaron las muestras a 13000rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartaron los sobrenadantes y los pellets fueron lavados con 1ml de etanol al 70%. Las muestras se volvieron a centrifugar a 13000rpm durante 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y los pellets fueron secados en estufa a 37°C. Una vez secos se disolvieron en 25 $\mu$ l de agua ultra pura estéril y se guardó a -20°C.

- Calidad y concentración de ADN

La concentración del ADN de cada una de las muestras se realizó mediante el uso un espectrofotómetro (Thermo Fisher NanoDrop 2000) (Figura 2), el cual estima la concentración mediante mediciones de absorbancia a 260nm (Sambrook et al., 1989).



Figura 2: Espectrofotómetro Thermo Fisher NanoDrop 2000.

La calidad del ADN se chequeó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% disuelto en “buffer” TAE 1X [Tris-acético 40mM y EDTA 1mM (pH 8)], en el cual se realizó la

siembra de 1 $\mu$ l de cada muestra con “buffer” de siembra 1X (azul de bromofenol 0,25%, xilen-cianol 0,25% y glicerol 30%). La electroforesis fue realizada a 50V durante aproximadamente 2 horas, luego fueron teñidas con una solución de bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml) por 30 minutos aproximadamente y visualizadas mediante un transluminador de luz ultravioleta (GelDoc Imaging System Ultraviolet Tranluminator Biolmaging Systems).

Una vez determinada la concentración y calidad de ADN de todas las muestras, se realizaron las diluciones correspondientes para estandarizar a una concentración de 300ng/ $\mu$ l para cada una de las muestras. Posteriormente, las mismas fueron conservadas a -20 °C.

- Estudio de RAPDs

Las amplificaciones de RAPDs se realizaron mediante PCR, siguiendo la metodología descripta por Williams et al. (1990). Para las amplificaciones por PCR, inicialmente se realizó un “screening” usando ADN de los parentales y primers adquiridos de la Universidad de British Columbia (Vancouver, BC, Canadá), seleccionando aquellos que amplificaron bandas exclusivas del progenitor masculino. Las amplificaciones de RAPDs se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 20 ng de ADN genómico, 15 $\mu$ M de cada dNTP’s, 30 ng de cebador, 1 unidad de ADN polimerasa Go Taq (Promega) y 1X de “buffer” de la enzima. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Biometra UNO-Thermoblock).

Una vez finalizada las amplificaciones se procedió a la siembra de las muestras en gel de agarosa al 2%. La electroforesis se realizó en una cuba con TAE 1X durante 2:30hs a 60A, luego se tiñeron los geles con bromuro de etidio (10  $\mu$ g/ml) durante aproximadamente 30 minutos. Mediante un transluminador UV se observaron los fragmentos amplificados y a través de un digitalizador de imagen (GelDoc Imaging System Ultraviolet Tranluminator Biolmaging Systems) se documentaron las amplificaciones.

#### 4.4 Estudios de meiosis

El análisis de la meiosis se llevó a cabo en el parental masculino, y en 8 individuos de la F<sub>1</sub>, los cuales fueron seleccionados al azar. Sin embargo, en el parental femenino *P. plicatulum* 4PT no fue necesario realizar el estudio, debido a que la misma ya fue analizada por Sartor et al. (2009).

Se realizaron preparados a partir de espiguillas de inflorescencias inmaduras, fijadas en solución 5:1 (v/v) de etanol absoluto: ácido láctico durante 24 horas y luego fueron conservadas en etanol al 70% a 4°C. Se prosiguió con el aplastado de las anteras jóvenes en carmín acético al 2%. En los preparados que se observaron células madres del polen (CMP) en fase de diacinesis y metafase I, se realizaron preparados citológicos permanentes con una solución de terpentina de Venecia (Wilson, 1945). Luego de un mes aproximadamente, los mismos fueron analizados mediante un microscopio óptico de luz transmitida (Leica Leitz DMRB).

#### 4.5 Determinación del modo reproductivo

El modo reproductivo se determinó en 101 individuos de la F<sub>1</sub>, por medio de la técnica de citometría de flujo utilizando un citómetro (Sysmex CyFlow® Space, Görlitz, Germany), 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: endospermo se consideran de reproducción sexual, el 2 proviene del embrión (n + n) y el 3 de la fusión de los dos núcleos polares reducidos (n + n) más el gameto masculino también reducido (n). En cambio, aquellas plantas que producen semillas con una proporción de embrión: endospermo de 2:5 son consideradas de reproducción apomíctica, ósea que se formaron por un proceso de apospacia, seguido de partenogénesis y pseudogamia. El contenido 2 corresponde al embrión originado por partenogénesis de la ovocélula no-reducida de un saco apospórico; y el contenido 5 corresponde al endospermo que surgió, en el mismo saco, por la fusión de dos núcleos polares no-reducidos y un gameto masculino reducido aportado por el polen en un proceso pseudogámico. Sin embargo, aquellas plantas que producen semillas con una proporción de embrión: endospermo 2:3 y 2:5, son consideradas apomícticas facultativas.

Para cada individuo se analizaron entre 10 y 30 cariopses, en grupos (“bulks”) de 5 a 10 cariopses, que 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). La adquisición y el análisis en tiempo real se realizan mediante el software FloMax, el cual genera histogramas con los datos de las muestras. Los “buffers” de extracción y tinción son parte de un kit comercial CyStain UV Precise P Sysmex, Görlitz, Germany.

#### 4.6 Estudios de fertilidad

La fertilidad se analizó en el parental masculino y en 20 individuos de la F<sub>1</sub> tomados al azar, considerando la proporción de espiguillas que formaron granos en condiciones de autopolinización y polinización libre. Para ambas condiciones se ensobraron 3 inflorescencias de cada planta con sobres de papel sulfito. Para autopolinización, se ensobraron un día antes del inicio de la antesis, para prevenir el ingreso de polen extraño y así obligar a las espiguillas a autopolinizarse. Sin embargo, para polinización libre las inflorescencias fueron ensobradas una vez finalizada la antesis de todas las espiguillas. En ambas condiciones permanecieron ensobradas hasta la maduración de las semillas (aproximadamente 30 días).

Posteriormente, se recolectaron los sobres y fueron colocados en estufa a 37°C durante 24 horas, para luego separar las espiguillas de las inflorescencias manualmente y separar las llenas de las vacías mediante el uso de un soplador mecánico de semillas (Seedburo Equipment Company 1022W. Jackson Blvd. Chicago. IL 60607 1-800-284-5779).

También se analizó que porcentaje de las mismas estaban libres de *Claviceps paspali*, conocido vulgarmente como ergot o cornezuelo, hongo parásito altamente específico de las gramíneas del género *Paspalum*, el cual se presenta en los meses otoñales en la región y que genera secreciones melosas cargadas de conidios que con el tiempo se transforman en una masa esclerotial que se alojan y reemplazan el contenido de las semillas (D' Esposito et al., 2001). El análisis se realizó mediante la observación de las espiguillas bajo una lupa (Leica EZ4).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Cruzamiento y obtención de la progenie

Del cruzamiento entre *P. plicatulum* 4PT 4xS × *P. atratum* cv. Cambá FCA 4xA, se obtuvieron 647 semillas llenas de un total de 3668 espiguillas polinizadas. Alrededor del 18% de las espiguillas resultaron llenas y 212 semillas fueron sembradas en bandejas con suelo esterilizado (Figura 3). Este porcentaje de llenado, es semejante a lo observado en cruzamientos interespecíficos del grupo Plicatula, donde también se usó a *P. plicatulum* 4PT 4xS como madre y como parentales a diferentes especies tetraploides apomícticas (Novo et al., 2013, 2016; 2017; Novo, 2020; Lutz, 2020).

De las 212 semillas que fueron puestas a germinar se lograron 188 plántulas, las que luego fueron trasplantadas a maceta donde permanecieron en invernáculo hasta ser llevada a campo a finales de noviembre. (Figura 4), de estos individuos sobrevivieron 101 plantas.



Figura 3: Germinación de las semillas obtenidas del cruzamiento *P. plicatulum* 4PT × *P. atratum* cv. Cambá FCA.



Figura 4: Progenie del cruzamiento *P. plicatulum* 4PT × *P. atratum* cv. Cambá FCA en el campo experimental de la FCA-UNNE.

### 5.2 Origen híbrido

El análisis con marcadores RAPDs fue realizado en los parentales y en una muestra de 38 individuos de la progenie. Primero se realizó un “screening” con los parentales, utilizando 14 primers con el objetivo de seleccionar los que amplificaban bandas específicas del parental masculino. Los primers seleccionados fueron 5 (UBC709, UBC721, UBC723, UBC719 y UBC716), estos permitieron demostrar que 37 de los individuos analizados son efectivamente productos de una hibridación interespecífica. Sin embargo, en el individuo restante #49 no se pudo corroborar su origen híbrido con ninguno de los primers utilizados, lo cual lo atribuimos a una baja concentración de ADN en la muestra lo que no permitió la amplificación de bandas.

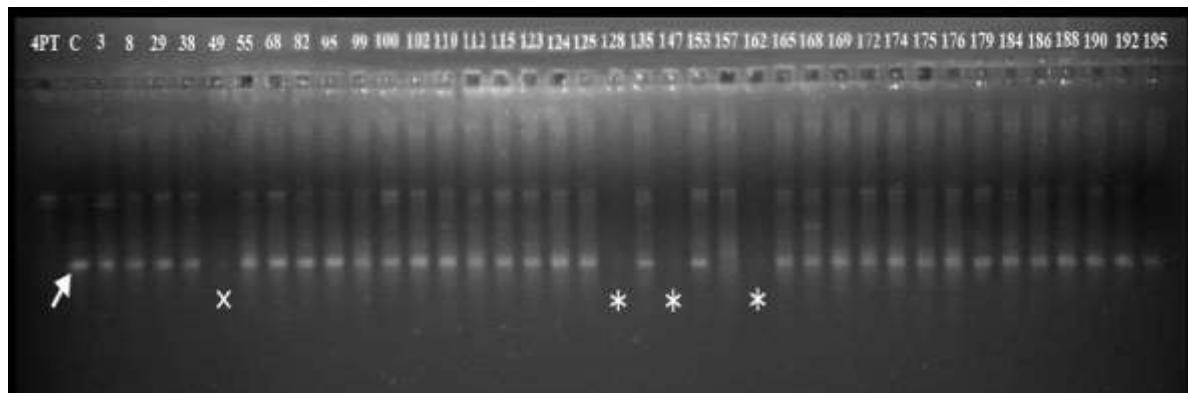


Figura 5. Productos de amplificación de *P. plicatulum* 4PT, *P. atratum* cv. Cambá FCA y de la F<sub>1</sub> generados por el cebador UBC716. La flecha indica la banda específica del parente. Los \* indican los híbridos no identificados con este cebador. La x muestra el individuo que no pudo ser corroborado su origen.

En la figura 5 se observan los resultados de la amplificación de los parentales y de la progenie, realizados con el cebador UBC716, con el cual se pudo corroborar el origen híbrido de 34 de los individuos, debido a que amplificaron la banda exclusiva del parental masculino, los 3 individuos restantes (#128, #147, #162) fueron caracterizados con los otros primers seleccionados.

### 5.3 Estudios de meiosis

Los análisis de las asociaciones cromosómicas se realizaron en el parental masculino y en la progenie, teniendo en cuenta que la planta utilizada como madre 4PT ya fue estudiada previamente por Sartor et al. (2009) (Tabla 1).

Tabla 1: Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis de *P. plicatulum* 4PT, *P. atratum* cv. Cambá FCA y de la progenie.

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. atratum</i> cv. Cambá FCA	1	68	0,74 (0-4)	17,87 (12-20)	0,00 (0-0)	0,88 (0-4)
Híbridos	8	132	1,96 (0-6)	15,81 (11-20)	0,22 (0-2)	1,44 (0-4)

\*Sartor et al., 2009.

El promedio y el rango de asociaciones, principalmente de los multivalentes (cuadrivalentes IV y trivalentes III), comúnmente se tiene en cuenta para determinar si el origen de las diferentes especies poliploides es autopoliploide o alloplopoliploide. Son autopoliploides cuando el complemento cromosómico consiste de más de dos copias completas del genoma de una sola especie y todos los juegos son homólogos entre sí

(provienen de la misma especie ancestral). En cambio, los alopoliploides tienen más de dos juegos haploides de cromosomas heredados de especies diferentes. También puede ocurrir que un alopoliploide sea considerado segmentario cuando los juegos de cromosomas presentan una homología parcial entre ellos y es por esto que se consideran que son cromosomas heredados de especies diferentes, pero con una cierta relación evolutiva.

En el genotipo 4PT de *P. plicatulum*, debido a su origen experimental, se considera que es un autotetraploide y en el cual predominan principalmente las asociaciones bivalentes (II) y IV (Sartor et al., 2009) (Tabla 1). En tanto, en el cultivar Cambá FCA que se utilizó como parental masculino se analizaron 68 CMP, en las cuales se observaron principalmente asociaciones del tipo II, con un promedio de 17,87 II, seguido en menor medida por IV y univalentes (I) con un promedio de 0,88 y 0,74 respectivamente, sin la presencia de asociaciones III (Tabla 1, Figura 6). Estos resultados presuponen que *P. atratum* cv. Cambá FCA es una especie alotetraploide segmentaria, originado por genomas que eran parcialmente homólogos.

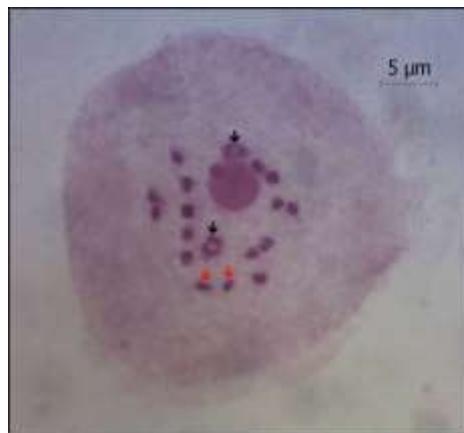


Figura 6: Asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis de *P. atratum* cv. Cambá FCA. Las flechas rojas señalan los I y las flechas negras señalan los IV.

En los 8 híbridos estudiados, se analizaron 132 CMP, en donde se observó que la mayoría de los cromosomas se asociaron principalmente como II y IV; sin embargo, también se observaron I y escasos III.

El promedio de las asociaciones cromosómicas fue de 1,96 univalentes, 15,81 bivalentes, 0,22 trivalentes y 1,44 cuadrivalentes (Tabla 1, Figura 7). En algunas CMP se observó hasta un máximo de 6 I y 4 IV. Este comportamiento de las asociaciones cromosómicas ha sido observado en otras especies del género *Paspalum* (Aguilera et al., 2011; Novo, 2016; Novo, 2020), donde la presencia de cuadrivalentes nos muestra homología entre los cromosomas que se combinan, pero también dichas asociaciones se encuentran en menor proporción incluso en relación con los univalentes, es por esto que se trataría de una homología parcial

entre los cromosomas y nos permitiría en cierta medida reafirmar el origen allotetraploide segmentario de *P. atratum* cv. Cambá FCA.

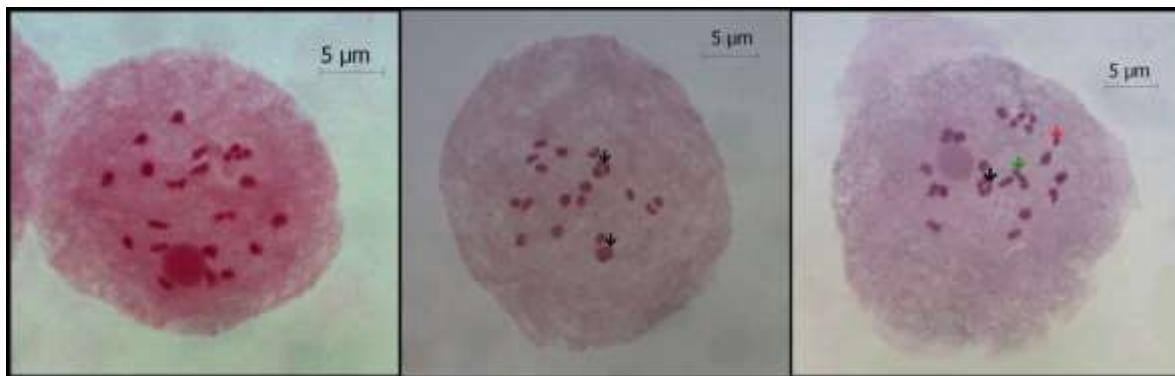


Figura 7: Asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis de la progenie. La flecha roja señala I, la flecha verde un III y las flechas negras señalan los IV.

#### 5.4 Determinación del modo reproductivo

Los resultados mostraron que 49 de los individuos analizados fueron catalogados como sexuales, debido a que presentaron una relación de contenido relativo de ADN de 2:3 entre embrión: endospermo, representado en el histograma por los picos 4C y 6C (Figura 8 a). No obstante solamente en 41 individuos se analizaron los 30 cariopses previstos, debido a que en los 8 restantes se analizaron 10 cariopses en cada uno.

De los 101 individuos, 8 fueron clasificados como apomícticos obligados, por presentar una relación 2:5 embrión: endospermo, lo que se manifiesta por los picos 4C y 10C (Figura 8 b), en 6 de estos individuos se analizaron solamente 10 cariopses.

Los restantes 42 híbridos resultaron ser apomícticos facultativos, debido que algunas cariopses tuvieron una relación de 2:3 y otros una relación de 2:5.

En los individuos que se analizaron solamente 10 cariopses, cabe aclarar que su modo reproductivo podría variar al aumentar el número de muestra, lo que queda para un análisis futuro completar el número de muestra pre establecido.

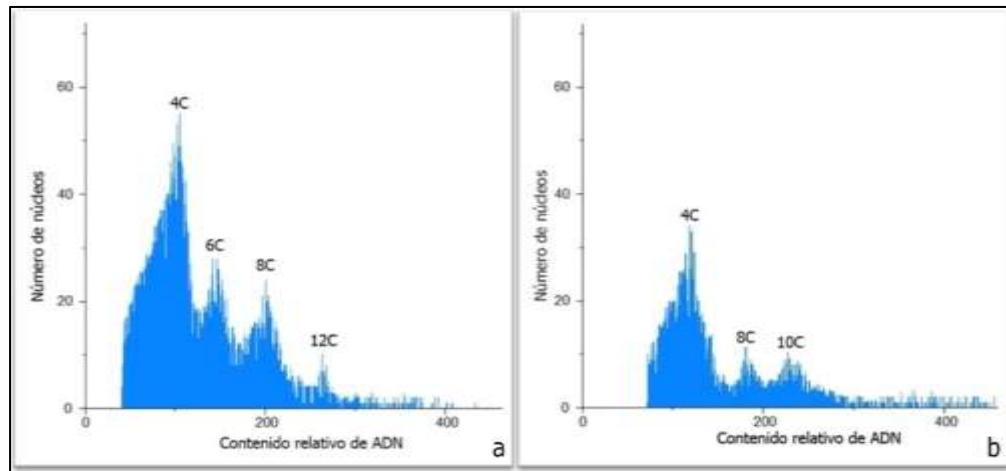


Figura 8. Histogramas de contenido relativo de ADN obtenidos por citometría de flujo en semillas de los híbridos. a) Híbrido sexual, 4C corresponde al embrión y 6C al endospermo, (relación 2:3); b) Híbrido apomíctico, 4C es del embrión y 10C del endospermo, (relación 2:5).

De acuerdo a estos resultados pudimos observar que la mayoría de los individuos analizados (47,52%) resultaron ser de reproducción sexual, lo que resulta ser de gran importancia para hacer una selección por caracteres agronómicos de interés e incorporarlos a un programa de mejoramiento genético en un futuro.

### 5.5 Análisis de la fertilidad

Los resultados del análisis de fertilidad, considerando la producción de semillas en condiciones de autopolinización y polinización libre en el parental masculino *P. atratum* cv. Cambá FCA y en la progenie se presentan en la Tabla 2.

- Producción de semillas

En *P. atratum* cv. Cambá FCA la producción de semillas fue mayor en polinización libre 61,64%, mientras que en autopolinización fue alrededor del 32% (Tabla 2).

En los 20 híbridos seleccionados al azar, se pudo observar que todos produjeron semillas tanto en autopolinización como en polinización libre (Tabla 2), siendo en esta última condición, la que mayor producción tuvo, con un promedio del 20,38% de espiguillas llenas (8,45% - 43,73%) (Tabla 2). Los individuos #161 y #174 presentaron valores cercanos al 50% (Tabla 2), que son niveles de fertilidad que pueden considerarse normales en muchas especies silvestres y apomícticas facultativas de *Paspalum* (Burson, 1997).

En cambio, en autopolinización el promedio observado fue del 13,68% (1,68% - 42,85%) (Tabla 2). Sin embargo, en dos individuos (#137 y #192), se observó que presentaron una mayor producción de semillas llenas en autopolinización que en polinización libre (Tabla 2). La menor producción de semillas en autopolinización, con relación a la polinización libre se asemeja a lo observado en híbridos interespecíficos, en el cual se utilizó a *P. plicatulum* 4PT también como parental femenino (Novo et al., 2013; 2016; 2017; 2020; Novo, 2020; Lutz, 2020,), lo que podría deberse a un cierto grado de autoincompatibilidad

heredada del parental femenino, que es completamente autoincompatible (Sartor et al., 2009).

En los individuos #29, #99, #147 se observó una baja producción de semillas, con baja fertilidad tanto en autopolinización como en polinización libre con valores inferiores al 10%, valores por encima de este porcentaje puede ser considerado aceptable principalmente por tratarse de híbridos de un cruzamiento interespecífico.

Tabla 2: Fertilidad en *P. plicatulum* 4PT, *P. atratum* cv. Cambá y en ocho híbridos, determinada por la producción de semillas en condiciones de autopolinización y polinización libre. Porcentaje de semillas con presencia de *Claviceps paspali*.

Individuos	Autopolinización			Polinización libre		
	Semillas analizadas (n°)	Semillas llenas (%)	Semillas con <i>claviceps</i> (%)	Semillas analizadas (n°)	Semillas llenas (%)	Semillas con <i>claviceps</i> (%)
<b>Parentales</b>						
<i>P. plicatulum</i>						
4PT *	3792	0,0	n/e	1535	25,0	n/e
<i>P. atratum</i> cv. Cambá FCA**	4743	31,84	0,34	7163	61,64	0,57
<b>Híbridos</b>						
8**	3394	14,73	0,12	5491	19,40	0,21
29**	5602	2,32	1,02	6354	9,16	2,09
55**	6532	4,16	0,29	6424	16,61	0,52
65**	5301	12,62	0,06	3395	19,35	2,38
68**	5419	3,49	0,09	5983	11,70	1,85
93**	5112	10,17	0,00	5455	18,41	2,43
99**	6128	2,56	0,00	7015	9,61	2,09
102**	4696	13,16	0,13	5517	22,40	0,87
115**	5956	14,04	0,02	4540	25,00	0,25
126**	5880	1,68	0,00	5338	10,19	0,68
137	2726	22,30	0,00	1733	16,73	0,51
147	2218	9,02	0,00	2958	8,45	0,09
153	2320	17,37	0,00	2752	17,48	0,00
157	3359	16,17	1,22	1478	28,48	0,12
161	3775	16,34	0,00	2056	43,73	0,26
174	2273	42,85	0,04	2879	39,01	0,00
181	2755	6,53	0,00	2477	19,78	0,07
184	3696	9,39	0,11	1610	16,77	0,46
189	4469	11,46	0,00	2311	24,49	0,07
192	3543	43,30	0,00	2773	29,90	0,45

\* Sartor et al., 2009.

\*\* Individuos analizados por dos años consecutivos. n/e: no evaluado.

Teniendo en cuenta que todos los híbridos analizados produjeron semillas, demuestra que es posible el intercambio genético entre *P. plicatulum* 4PT 4xS y *P. atratum* cv. Cambá FCA, en donde se obtuvieron híbridos fértiles con una nueva combinación genética tal como fue descripto para otros cruzamientos interespecíficos de especies del grupo Plicatula (Novo et al., 2017).

- Sanidad de las semillas

Tanto en autopolinización como en polinización libre el porcentaje promedio de semillas con presencia de ergot no superó el 1% (Figura 5). En autopolinización vario de 0% a 1,22%, y en polinización libre de 0% a 2,09% (Tabla 2). Estos datos muestran una baja susceptibilidad a la enfermedad por parte de *P. atratum* cv. Cambá FCA y de los híbridos, en comparación a lo observado en híbridos producto de cruzamientos interespecíficos del grupo Plicatula (Novo et al., 2020).



Figura 5. Presencia de esclerocio de *Claviceps paspali* en semilla de la progenie.

## 6 CONCLUSIONES

- Fue posible realizar el cruzamiento interespecífico entre *P. plicatulum* tetraploide sexual y *P. atratum* cv. Cambá FCA tetraploide apomíctico, dos especies pertenecientes al grupo Plicatula.
- Se logró la obtención de híbridos interespecíficos que fueron fértiles y segregaron para el modo reproductivo sexual y apomíctico.
- El análisis de la meiosis de los híbridos y del parental masculino permitió determinar el origen allotetraploide segmentario de *P. atratum* cv. Cambá FCA.
- Este estudio permitirá la selección de híbridos sexuales que van a ser utilizados para ampliar la base genética de la población sintética tetraploide sexual del grupo Plicatula, e incorporarlos en futuros programas de mejoramiento genético.

## 7 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. guenoiarum*. *Crop Science* 51: 1544-1550.
- Bashaw EC, Hovin AW & Holt EC. 1970. Apomixis its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Norman MJT Ed. Proceed11thIntl Grassl Congr Surfers, Paradise, Queensland University of Queensland Press, St Lucia. pp 245-248.
- Burson BL & Bennett HW. 1970. Cytology, method of reproduction and fertility of Brunswickgrass, *Paspalum nicrae* Parodi. *Crop Science* 10: 184-187.
- Burson BL. 1997. Apomixis and sexuality in some *Paspalum* species. *Crop Science* 37: 134-1351.
- Carrizo JM. 2019. Obtención de poliploides de reproducción sexual en dos especies del género *Paspalum* L. Trabajo final de graduación. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.
- Chase A. 1929. The North American species of *Paspalum*. Contributions from the United States National Herbarium 28:1-310.
- Chase A. 1929. Manuscrito inédito. Hitchcock & Chase Library, Smithsonian Institution, Washington DC.
- Davidse G & Pohl RW. 1974. Chromosome numbers meiotic behavior and notes on tropical American grasses (Gramineae). *Canadian Journal of Botany* 52: 317-328.
- Dellaporta SL, Wood J & Hicks JB. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- D' Esposito R & López C. 2001. Características biológicas de *Claviceps paspali* Stev & Hall. *Boletín micológico* 16: 1-8.
- Espinoza F & Quarín CL. 1997. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. *Australian Journal of Botany*.
- Espinoza F, Urbani MH, Martínez EJ & Quarín CL. 2001. The breeding system of three *Paspalum* species. *Tropical Grasslands* 35: 211-217.
- Evers GW & Burson BL. 2004. Dallisgrass and other *Paspalum* species In: Moser LE, Burson BL, Sollenberger LE (Eds.). Warm season (C4) grasses. *Agronomy Monographs* 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. pp 681-713.

Lutz SA. 2020. Análisis del sistema genético en híbridos interespecíficos obtenidos por cruzamiento de dos especies del grupo Plicatula de *Paspalum*. Trabajo final de graduación. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

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.

Novo PE, Espinoza F & Quarín CL. 2013. An apomictic tetraploid *Paspalum chaseanum* cytotype and its cytogenetic relationship with *P. plicatulum* (Poaceae): taxonomic and genetic implications. *Australian Journal of Botany* 61: 538-543.

Novo PE, Valls JFM, Galdeano F, Honfi AI, Espinoza F & Quarín CL. 2015. Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. *Scientia Agricola* 73: 356-362.

Novo PE. 2016. Tesis Doctoral. Transferencia génica desde especies tetraploidoides apomicticas hacia híbridos tetraploidoides sexuales de origen experimental en el grupo Plicatula de *Paspalum*. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

Novo PE, Acuña CA, Quarín 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 & Quarín CL. 2019. 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, Quarín CL. 2020. Genetic transfer from several apomictic tetraploid *Paspalum* species to an elite group of sexual plants. *Crop Science* 60: 1-11.

Novo S. 2020. Evaluación genética de una progenie de *Paspalum plicatulum* × *Paspalum wrightii*, dos especies del grupo Plicatula, del género *Paspalum*. Trabajo final de graduación. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

Oliveira RC. 2004. O gênero *Paspalum* L., grupo Plicatula (Poaceae: Paniceae), no Brasil. Thesis. Universidade Estadual de Campinas.

Ortiz JPA, Quarín CL, Pessino SC, Acuña CA, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME & Pupilli F. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals Botany* 112: 767-787.

Pritchard AJ. 1962. The cytology and reproduction of *Paspalum yaguaronense* Henr. *Australian Journal of Agricultural Research* 13: 206-211.

- Pritchard AJ. 1970. Meiosis and embryo sac development in *Urochloa mosambicensis* and three *Paspalum* species. Australian Journal of Agricultural Research 21: 648-652.
- Quarin CL. 1974. Relaciones citotaxonomicas entre *Paspalum alnum* Chase y *P. hexastachyum* Parodi (Gramineae). Bonplandia 3: 115-127.
- Quarin CL. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. Apomixis Newsletter 5: 8-15.
- 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 Grasslands 31: 114-116.
- Ruiz Diaz GS. 2020. Inducción a la floración en *Paspalum plicatulum* Michx., una planta tetraploide y sexual. Trabajo final de graduación. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.
- Sambrook J, Fritsh EF & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2° ed. New York, Cold Spring Harbor.
- Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F. 2009. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. Crop Science 49: 1270-1276.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
- Wilson GB. 1945. The Venetian Turpentine Mounting Medium. Stain Technology 20(4): 133-135.
- 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.