



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

**Determinación taxonómica de accesiones  
de *Paspalum aff. umbrosum* y  
caracterización de su sistema genético**

Trabajo final de graduación - Modalidad Tesina

Alumna: Carla Ziegler

Directora: Dra. (Lic.) A. Verena Reutemann

Ciudad de Corrientes, Argentina

2023

# ÍNDICE

RESUMEN .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
HIPÓTESIS .....	9
OBJETIVOS.....	9
• <b>General</b> .....	9
• <b>Específicos</b> .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
<i>Material Vegetal</i> .....	10
<i>Recuentos cromosómicos</i> .....	10
<i>Análisis de la meiosis</i> .....	10
<i>Análisis citoembriológico</i> .....	11
<i>Viabilidad de polen</i> .....	11
<i>Fertilidad</i> .....	11
<i>Caracterización morfológica y establecimiento de identidad taxonómica</i> .....	12
<i>Análisis estadístico</i> .....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	16
CONCLUSIONES .....	33
BIBLIOGRAFÍA .....	34
ANEXOS .....	38
AGRADECIMIENTOS .....	42

## RESUMEN

*Paspalum* L. posee alrededor de 330 especies y es el mayor género de gramíneas de la subfamilia Panicoideae. Desde el punto de vista citológico la mayoría de las especies poseen el número básico  $x=10$ , y los números cromosómicos varían desde  $2n=20$  hasta  $2n=160$ . Generalmente, los diploides son sexuales autoestériles y los poliploides se reproducen por apomixis y son pseudógamos. El objetivo de este trabajo fue establecer la identidad taxonómica de accesiones de *Paspalum* provenientes de Misiones. Se propuso a *P. urvillei* como uno de los posibles parentales y a *P. umbrosum*, *P. juergensii* o *P. paniculatum* como el otro parental putativo. Para ello, se describió la morfología de la planta y de ejemplares de herbario, se determinó el número de cromosomas y su nivel de ploidía, se analizó el desarrollo de sacos embrionarios, viabilidad de los granos de polen y producción de semillas. El recuento cromosómico determinó que se trataba de un individuo triploide ( $2n=3x=30$ ). Las asociaciones cromosómicas más frecuentes en la meiosis fueron: 9I+9II+1III y 10II+10I, con irregularidades meióticas. La formación de trivalentes en la meiosis indicaría que existe una cierta homología entre los tres juegos de cromosomas, es decir que los parentales involucrados en la formación de este híbrido podrían tener cierta afinidad genética. El análisis del modo de reproducción realizado por citoembriología clásica reveló la ausencia de desarrollo de sacos embrionarios. La viabilidad del polen, determinada por el método de coloración con carmín-glicerina, fue nula. La fertilidad fue estimada por el número de semillas obtenidas en ensayos de polinización abierta y autopolinización. Los resultados fueron una escasa producción de semillas en ambas condiciones. Por consecuencia, el ejemplar en estudio resultó ser completamente estéril. Respecto al análisis morfológico de la accesión en estudio y los ejemplares de herbario de las especies parentales propuestas, considerando especialmente a los caracteres cualitativos analizados, la planta en estudio se asemeja principalmente a *P. urvillei*. Esto sugiere que esta especie probablemente actuó como el parental materno. Sin embargo, no se pudo determinar con exactitud qué especie del grupo Paniculata actuó como parental masculino.

## INTRODUCCIÓN

*Paspalum* L. posee alrededor de 330 especies y es el mayor género de gramíneas de la subfamilia Panicoideae (Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987; Zuloaga & Morrone, 2005). La distribución del género *Paspalum* se da mayormente en los pastizales naturales de las regiones templadas y cálidas del continente americano, con algunos representantes en el “viejo mundo” (Scataglini *et al.*, 2014). Es un género con especies dominantes en los campos abiertos, pero también están presentes en los bordes de los bosques, a lo largo de las costas arenosas o en ambientes salinos, y se encuentran desde el nivel del mar hasta los 4.600 m de altitud en los Andes; incluso algunas especies consideradas malezas son comunes en los bordes de las carreteras o en hábitats modificado (Zuloaga & Morrone, 2005).

*Paspalum* es un género de gran interés económico ya sea porque comprende especies de importante calidad forrajera como *P. notatum* Flüggé, *P. dilatatum* Poir., *P. atratum* Swallen, *P. guenoarum* Arechav. y *P. urvillei* Steud., o porque son empleados en la alimentación como cereales menores (*ej.* Kodo millet, *Paspalum scrobiculatum* L.) (Zuloaga & Morrone, 2005). En Argentina viven aproximadamente 82 taxones (Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987; Zuloaga & Morrone, 2005) y la Mesopotamia es una de las regiones más biodiversas. En la provincia de Entre Ríos habitan cerca de 30 entidades, en Corrientes 54 y en la provincia de Misiones alrededor de 48 especies (Zuloaga *et al.*, 2001). El conocimiento de las especies forrajeras que son componentes naturales de los ecosistemas de Argentina y la disponibilidad de materiales nativos domesticados o mejorados genéticamente, adaptados a las condiciones ecológicas del nordeste del país, son requerimientos necesarios para lograr una mayor producción actual de carne (Honfi *et al.*, 2013).

Taxonómicamente, el género se define por un conjunto de caracteres tales como espiguillas dispuestas en inflorescencias unilaterales, plano-convexas, con la gluma inferior generalmente ausente, la flor inferior y la pálea inferior ausentes, y el flósculo superior indurado o membranoso, con los márgenes de la lema enrollados sobre la pálea superior (Zuloaga & Morrone, 2005). Estudios sistemáticos recientes consideran la existencia de cuatro

subgéneros en *Paspalum*: *Anachyris* (Nees) Chase, *Ceresia* (Pers.) Rchb., *Harpostachys* (Trin.) S. Denham y *Paspalum*; éste último incluye cerca de 39 grupos informales (Chase, 1929; Denham, 2005; Zuloaga & Morrone, 2005; Denham & Zuloaga, 2007). Los grupos informales reúnen a especies afines morfológicamente, y fueron definidos inicialmente por Chase (1929) en su monografía de *Paspalum*. La mayoría de las especies del género con potencial uso forrajero se encuentran en los grupos informales Notata, Dilatata y Plicatula, siendo importantes por incluir especies de excelente adaptación a la sequía, frío y defoliación (Valls & Pozzobon, 1987; Batista & Godoy, 2000; de Souza, 2019).

Desde el punto de vista citológico, la mayoría de las especies poseen el número básico  $x=10$ , y los números cromosómicos varían desde  $2n=20$  hasta  $2n=160$  (Quarin, 1992; Hojsgaard *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2013; Reutemann *et al.* 2019; 2020). Generalmente, los diploides son sexuales autoestériles y los poliploides se reproducen por apomixis y son pseudógamos (Quarin, 1992; Ortiz *et al.*, 2013). El gran número de especies y la variación en los sistemas genéticos convierten a *Paspalum* en un género modelo de relevancia para estudios biológicos en general y a la vez, en un reservorio de recursos genéticos para Sudamérica en general, y el norte de Argentina en particular. *Paspalum* posee especies que resultan fuente de germoplasma de utilidad, sin embargo, solo el 20% de las especies poseen el sistema genético completamente descrito (Ortiz *et al.*, 2013).

*Paspalum umbrosum* Trin. pertenece al grupo informal Paniculata de *Paspalum*, se distribuye por Brasil, Paraguay, Argentina y Uruguay, siendo un forraje apetecido (Rosengurtt *et al.*, 1970; Zuloaga & Morrone, 2005). En Argentina, está presente principalmente en Corrientes y Misiones; donde habita sitios modificados, bordes de selvas y sotobosques (Zuloaga & Morrone, 2005). En la provincia de Misiones se la puede hallar en potreros, espacios productivos en los que se desarrolla la agricultura familiar, por ejemplo, en sitios donde se observan algunos ejemplares de árboles remanentes o cultivados con el objeto de proporcionar sombra y resguardo al ganado (Furlan *et al.*, 2015). La cualidad de interés de *P. umbrosum* radica en la capacidad de tolerar deficiencias lumínicas, condición de importancia en sistemas forrajeros silvo- y agro-pastoriles. *Paspalum umbrosum* es una gramínea megatérmica (Burkart, 1969),

que florece y fructifica entre noviembre y marzo (Zuloaga & Morrone, 2005), desarrolla como mínimo entre tres a cuatro inflorescencias que producen cada una, según el número de racimos, aproximadamente entre 900 a 1000 espiguillas. También es higrófila y sus hojas anchas de lámina lanceolada o lineal lanceoladas, verde-oscuros, le permiten vivir bajo condiciones de sombra. En la actualidad, solo se han reportados diploides ( $2n=2x=20$ ) para accesiones de la especie provenientes de Argentina y Paraguay (Hunziker *et al.*, 1998, Hojsgaard *et al.*, 2009; Reutemann *et al.*, 2020). Sin embargo, el modo reproductivo, el sistema de apareamiento y la fertilidad de esta especie aún no están descritos.

*Paspalum paniculatum* L. es una gramínea perenne que florece entre noviembre y mayo, perteneciente al grupo Paniculata (Zuloaga & Morrone, 2005). Presenta inflorescencias terminales con 10-50 racimos, cañas que pueden llegar a los 1,2 m de altura (Zuloaga & Morrone, 2005). Sus entrenudos tienen una longitud de entre 7 y 25 cm, los nudos son comprimidos, castaños con pelos blanquecinos a pajizos de hasta 5 mm de longitud (Zuloaga & Morrone, 2005). La longitud de las vainas varía entre 6-17 cm y pueden ser glabras o densamente hirsutas (Zuloaga & Morrone, 2005). Las lígulas son membranáceas de 0,4-2 mm de longitud, con pseudolígulas formadas por largos pelos blanquecinos de hasta 1 cm de largo (Zuloaga & Morrone, 2005). Las láminas son linear-lanceoladas a lanceoladas de 9-41 x 1-2,5 cm, glabras a densamente híspidas en ambas caras (Zuloaga & Morrone, 2005). Es un diploide ( $2n=2x=20$ ) sexual y posee meiosis regular con 10 bivalentes (Moraes-Fernandez *et al.*, 1974; Hojsgaard *et al.*, 2009). Esta especie es considerada como una maleza nativa de América del Sur con una amplia distribución (Burson, 1979). Es común en sotobosques y borde de selvas, en lugares modificados, siendo frecuente en bordes de caminos y lugares bajos (Zuloaga & Morrone, 2005). Falta información sobre su relación con otras especies de *Paspalum* porque nunca se han producido híbridos en cruzamientos experimentales interespecíficos (Burson, 1979).

*Paspalum juergensii* Hack. también es una especie del grupo Paniculata, dentro del cual es afín a *P. umbrosum*. Su distribución geográfica va desde Colombia y Ecuador hasta Bolivia, Brasil, Uruguay y nordeste de Argentina. Habita en bordes de selvas o sotobosques, en lugares sombríos y húmedos. Es

una planta perenne, semidecumbente con cañas de 0,8-1,5 m de alto. Posee entrenudos de 7-35 cm de largo, nudos castañosos, comprimidos, densamente pilosos a glabros. El largo de las vainas varía entre 9-20 cm de largo con pelos rígidos. Posee láminas linear-lanceoladas de 13-28 x 0,5-1,8 cm, glabras a esparcidamente pilosas, con lígulas membranáceas de 4-8 mm de largo. Presenta inflorescencias terminales solitarias con 4-14 racimos y eje principal de 6-13 cm de largo, racimo inferior de 6-10 cm de largo, y espiguillas anchamente elipsoides 1,6-1,8 x 1-1,2 mm pubescentes ferrugíneas o con tintes violáceos (Zuloaga & Morrone, 2005). Es un diploide ( $2n= 2x= 20$ ) con formación de 10 bivalentes y que se reproduce sexualmente (Burson & Quarin, 1982; Hojsgaard *et al.*, 2009).

*Paspalum urvillei* Steud. pertenece al grupo informal Dilatata, es un alotetraploide ( $2n= 4x= 40$ ) con 20 bivalentes en la meiosis, se reproduce sexualmente y es autofértil (Burson, 1972; Hojsgaard *et al.*, 2009; Schedler, 2019). Es una planta perenne que florece desde septiembre hasta mayo. Es de porte cespitoso, con cañas que pueden llegar a los 1,5 m. Posee entrenudos de 11-25 cm de largo y nudos castaños, glabros a cortamente pilosos. Las vainas son de 10-30 cm de largo, glabras a hirsutas, y las láminas son lineares de 10-45 x 0,3-1 cm y de pilosidad variable. Posee lígulas membranáceas de 2,4-4,5 mm y la pseudolígula está formada por un arco de pelos densos y rígidos de hasta 7 mm de longitud. Presenta entre 10-17 racimos, en inflorescencias terminales de 15-30 cm de longitud, y espiguillas anchamente elipsoides, de 1,8-2,8 x 1-1,4 mm de color verde pálido a cobrizas o con tintes purpúreos y pilosas (Zuloaga & Morrone, 2005). Esta especie es una gramínea de estación cálida autóctona del sur de Brasil y el norte de Argentina, aunque crece desde el sur de los EE. UU. hasta Argentina en suelos húmedos y arenosos (Chase, 1929). Se desarrolla en campos bajos, esteros y en bordes de caminos y vías férreas; y es común como maleza de diversos cultivos (Zuloaga y Morrone, 2005). Con un manejo adecuado, *P. urvillei* es una gramínea forrajera aceptable y produce heno de excelente calidad (Burson, 1979). *Paspalum urvillei* se considera el tetraploide sexual implicado en el origen de nuevos triploides y pentaploides interespecíficos, principalmente cuando actúa de planta madre (Burson & Bennet, 1972; Burson, 1979; 1992; Sawasato *et al.*, 2008). Dado que *P. urvillei*

es una especie ampliamente adaptada, y aparentemente hibrida fácilmente con otras especies de este género, se cree que desempeñó un papel importante en la evolución de otras especies de *Paspalum* (Burson, 1972). Estudios anteriores mostraron que *P. urvillei* comparte uno de sus genomas con *P. juergensii* y el otro genoma con *P. intermedium* (Burson & Bennett, 1972; Burson, 1979). El genoma de *P. juergensii* ha sido designado “J” y el de *P. intermedium* se denominó “I” (Burson & Quarin, 1982). Así, *P. urvillei* tiene la constitución genómica IIJJ (Burson, 1979).

La introducción de especies exóticas y el manejo inadecuado han conducido a la disminución de especies nativas, por ello son necesarias investigaciones que contribuyan, inicialmente, al rescate y la conservación, y posteriormente al mejoramiento de estos recursos genéticos nativos. En este contexto cobra relevancia la colección y conservación de germoplasma (Herrera Cedano *et al.*, 2010). La reciente incorporación de accesiones de *Paspalum*, provenientes de Misiones, a la colección viva del Banco de Germoplasma del Instituto de Botánica del Nordeste y la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, requiere caracterizar sus atributos morfológicos, cromosómicos y reproductivos, como así también aquellos vinculados a la producción de semillas, para optimizar la preservación de germoplasma e introducción a planes de mejoramiento. Por ello, se propone la caracterización taxonómica de estas nuevas contribuciones al banco de germoplasma, así como la determinación del sistema genético, su modo reproductivo, si genera gametos viables capaces de transferir información genética, y si produce semillas.



## HIPÓTESIS

El material vegetal (CZ1) estudiado es un híbrido triploide ( $2n= 3x= 30$ ) sexual entre *Paspalum urvillei* ( $2n= 4x= 40$ , sexual, genoma IIJJ) con algunas de estas tres especies: *P. umbrosum* ( $2n= 2x= 20$ , sexual, genoma JJ); *P. juergensii* ( $2n= 2x= 20$ , sexual, genoma JJ) o *P. paniculatum* ( $2n= 2x= 20$ , sexual, genoma JJ).

## OBJETIVOS

- **General**

Establecer la identidad taxonómica de las accesiones CZ1 misioneras de *Paspalum* y su sistema genético.

- **Específicos**

- 1- Describir la morfología de accesiones CZ1 de *Paspalum* de Misiones y compararlas con ejemplares de herbario para determinar su identidad taxonómica.
- 2- Determinar el número cromosómico y el nivel de ploidía de las accesiones CZ1 de *Paspalum* previamente identificadas.
- 3- Analizar el desarrollo del saco embrionario de las accesiones CZ1 de *Paspalum* previamente identificadas.
- 4- Establecer la fertilidad de las accesiones CZ1 de *Paspalum* previamente identificadas taxonómicamente, mediante análisis de viabilidad de los gametos masculinos y formación de semillas en autopolinización y polinización libre.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material Vegetal*

El material vegetal estudiado en esta tesis se colectó en S 26,42370°; WO 54.58379°; en la localidad de Eldorado, en la provincia de Misiones (Argentina). El material se denominó CZ1, se cuentan con cuatro ejemplares vivos uno implantado en el jardín del banco de germoplasma del grupo de Genética y Mejoramiento de Especies Forrajeras del IBONE (CONICET-UNNE) y los tres restantes en la colección dentro de invernáculo. Con los ejemplares vivos se realizaron los conteos cromosómicos, el análisis meiótico y reproductivo y la determinación de fertilidad. Además, se cuenta con tres ejemplares herborizados, para ser introducidos al Herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES), sobre los cuales se tomaron los datos morfológicos.

### *Recuentos cromosómicos*

La determinación del número cromosómico y el nivel de ploidía se llevaron a cabo en células del meristema radicular. Para ello, los ápices radicales se pretrataron con solución saturada de  $\alpha$ -bromonaftaleno por 3 h, luego se fijaron en una solución de etanol 70% y se guardaron en heladera a 4 °C hasta su utilización. Se realizó la tinción convencional de Feulgen (Feulgen & Rossenbeck, 1924). Para ello, se hidrolizaron las raicillas con ácido clorhídrico 1 N por 10 min, a 60 °C, en baño termostático, y posteriormente se colorearon con reactivo de Schiff. Una vez lograda la tinción, se maceraron las raicillas con orceína acética al 2%, empleada como coloración de contraste, y se observaron los preparados en microscopio óptico.

### *Análisis de la meiosis*

Se fijaron inflorescencias jóvenes en una solución 3:1 (v/v) de etanol absoluto: ácido acético glacial por 24 h, para luego ser almacenadas en etanol al 70% y a 4 °C. Luego, se procedió al aplastado de las anteras jóvenes en una gota de 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) en las distintas fases de la meiosis, bajo un microscopio óptico.

### *Análisis citoembriológico*

Los sacos embrionarios maduros, al momento de la antesis, fueron analizados mediante citoembriología clásica. Para ello, se fijaron inflorescencias al momento de la antesis en FAA (etanol 70%: formaldehído: ácido acético glacial 18:1:1) durante 24 h. Luego, fueron conservadas en etanol 70% a 4 °C hasta su análisis. Se disecaron 30 pistilos y se conservaron en etanol 70% en heladera. El análisis de los sacos embrionarios se realizó mediante la técnica de diafanizado de pistilos con metilsalicilato propuesta por Young *et al.* (1979), con las modificaciones introducidas por Zilli *et al.* (2015). Los pistilos disectados y conservados en etanol 70%, se colocaron en peróxido de hidrógeno al 3% por 2 h. Luego, fueron sometidos a deshidratación en una serie de etanol creciente (50%, 70%, 95%, 100%) por 30 min cada paso, y clarificación en una serie de metilsalicilato: etanol (50%, 75%, 85%) por 30 min cada paso, hasta la utilización de metilsalicilato puro para el diafanizado (por 12 h). Los pistilos diafanizados fueron colocados en un portaobjetos con una gota de metilsalicilato y luego se observaron los óvulos bajo un microscopio, con dispositivo de contraste de interferencia diferencial (DIC). Se observaron un mínimo de 30 óvulos por planta. Los sacos embrionarios fueron clasificados según su estructura y composición celular en meióticos (sexuales) o apomeióticos (apomícticos) según corresponda.

### *Viabilidad de polen*

Se usó el método de coloración con carmín-glicerina (1:1) en inflorescencias fijadas en antesis en FAA (etanol 70%: formaldehído: ácido acético glacial 18:1:1), o con lugol en inflorescencias en antesis sin fijar. Se contabilizaron un máximo de 1000 granos de polen por inflorescencia, para sacar la proporción de polen viable (coloreados) y no viable (incolores).

### *Fertilidad*

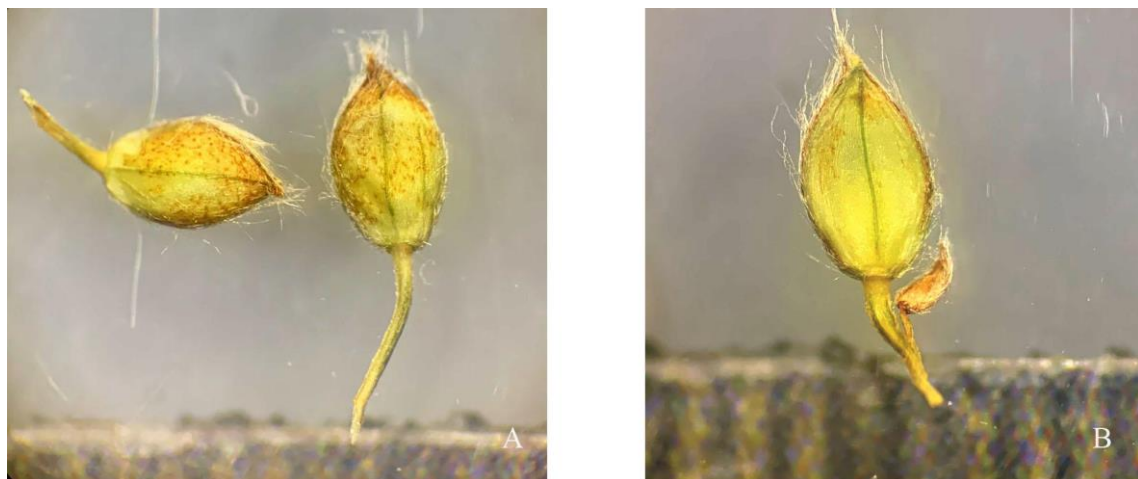
Se utilizaron semillas obtenidas en ensayos de polinización abierta y autopolinización. El procedimiento en autopolinización consistió en ensobrar 2 inflorescencias/planta con sobres de papel sulfito antes de que se produzca la antesis de las espiguillas, manteniéndose ensobradas por 30 días hasta la maduración de los cariopsis. En el caso de polinización abierta, se ensobraron 5

inflorescencias/planta una vez que éstas completaron la antesis de todas las espiguillas, permaneciendo ensobradas hasta la maduración de las cariopsis (aprox. 20 días). Luego, se procedió a la cosecha de las inflorescencias y trilla de las espiguillas. Se separaron por diferencia de peso las espiguillas con cariopsis de las vacías (vanas), utilizando un soplador de semillas. La fertilidad observada bajo cada condición de polinización se estimó utilizando un índice entre el número de espiguillas con cariopsis y el número total de espiguillas por individuo.

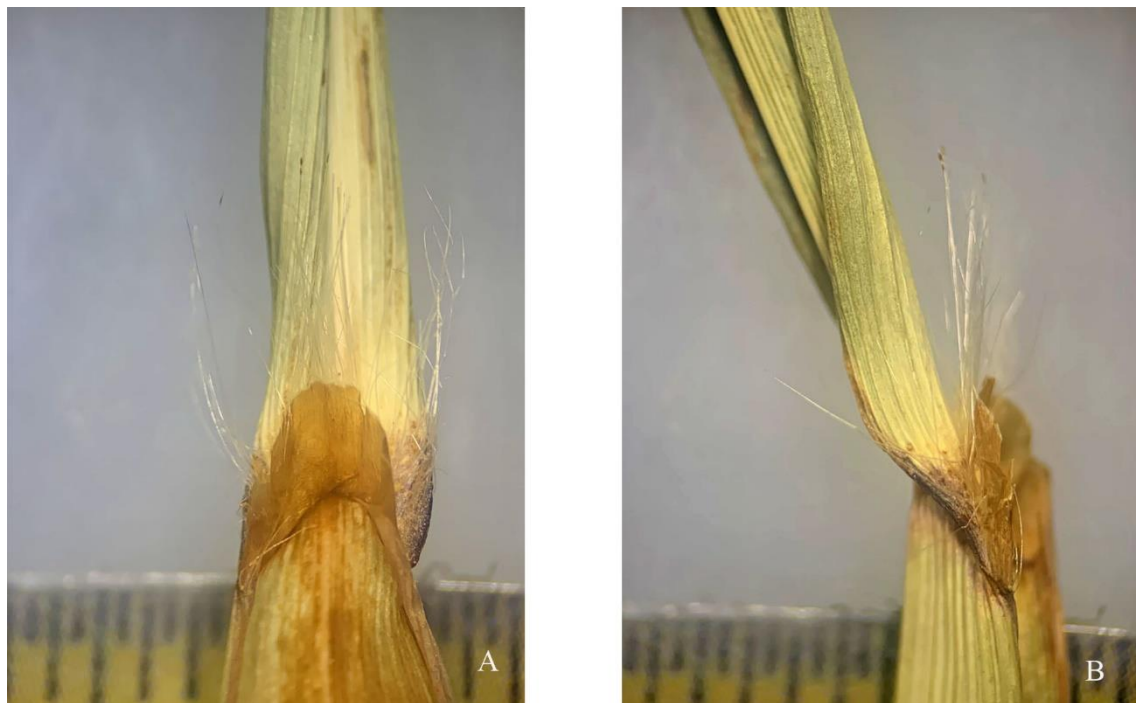
### *Caracterización morfológica y establecimiento de identidad taxonómica*

Para realizar las determinaciones taxonómicas se emplearon claves y material bibliográfico relacionado al género *Paspalum*. El material de colección se analizó observando 3 ejemplares de la especie en estudio (CZ1) a simple vista y bajo la lupa. Se analizaron 28 características morfológicas, verificando la presencia y morfología de las envolturas de la espiguilla (gluma y lemma) (fig. 1), pseudolígula (Fig. 2), aspecto de la lámina (Fig. 3A), cuello de la vaina foliar, y otras características de importancia taxonómica para diferenciar entre las especies propuestas como parentales. Para ello, se analizaron caracteres como la altura total de la planta (cm, **HI**), midiendo desde la base de la vara floral hasta el ápice de la inflorescencia; largo de la 2° vaina (**L2V**) y del 2° entrenudo (**L2E**), ambos en cm y medidos desde la base. El largo de la 2° hoja: lámina (cm, **L2H**), medido desde la zona de la lígula hasta el ápice de la lámina, y su ancho medido en la parte media de la lámina (cm, **A2H**); largo de la inflorescencia, desde la inserción del primer racimo hasta el último (cm, **LI**); largo del racimo inferior (cm, **LRI**); número de racimos (**NR**) y la terminación de los racimos en espiguillas desarrolladas o terminaciones estériles (**TR**) (Fig. 3ª y 3C). Se determinó además el largo (mm, **LE**) y ancho de espiguilla (mm, **AE**), esta última medido en la porción media de la misma (Fig. 1). Además se observaron la presencia de pelos en las vainas (**PV1** y **PVB**), su ubicación (**lugar PV**) y longitud (**PV2**, mm). Se observó la pilosidad de los nudos (**PN1**) y su longitud (**PN2**, mm). Se observó la pilosidad de la lámina (**PL1**), la ubicación (**Cara**), la longitud (**PL2**) y su abundancia (**APL**). Se midió la pilosidad de los racimos (**PR**, mm) y se observó la presencia de pilosidad en las espiguillas (**PE1**), la ubicación de los pelos sobre las mismas (**Lugar PE**), la longitud de los pelos (**PE2**), el número de series de

espiguillas (**SE**) y el color de las espiguillas (**Color**). Por último, se tuvo en cuenta el tipo de lígula, la presencia de pseudolígula (**L-PL**) y la longitud de los pelos de la pseudolígula (**LPPL**, mm) (Fig. 2 y 3D).



**Figura 1.** Detalle de espiguillas de la accesión CZ1. **A**, Vista lado convexo. **B**, Vista lado plano.



**Figura 2:** Lígula y pseudolígula. **A**, Vista de frente. **B**, Vista lateral.





**Figura 3.** Observación de ejemplar CZ1. **A,** Detalle de la cara adaxial de la lámina foliar. **B,** Detalle de la porción radicular. **C,** Inflorescencia. **D,** Detalle de la Lígula y pseudolígula.

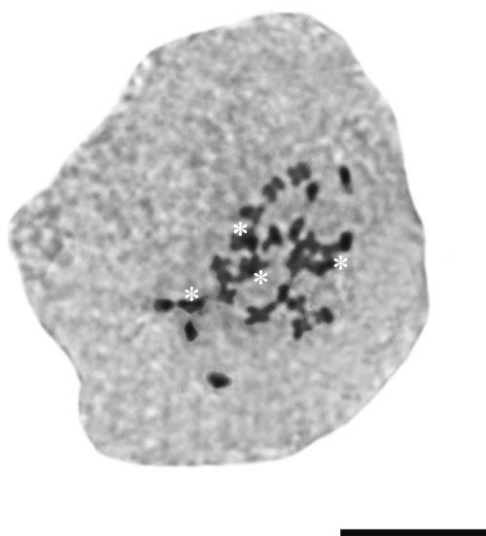
Luego, se utilizaron estos datos para comparar los ejemplares medidos de las plantas CZ1 con 17 ejemplares de herbario de *P. umbrosum*, 39 de *P. urvillei*, 13 de *P. juergensii* y 39 de *P. paniculatum*, todos ellos recolectados en Misiones y disponibles en el Herbario CTES (IBONE, CONICET-UNNE).

### *Análisis estadístico*

Se calcularon las medias y desvíos estándares de las variables cuantitativas utilizando el software Infostat. Para las variables cualitativas, se calculó la moda utilizando Excel. Luego se realizó un análisis de componentes principales con las variables cuantitativas usando la media como medida de posición, y un análisis de coordenadas principales con todas las variables morfológicas utilizando la distancia de Gower en Infostat. A su vez, se realizó un análisis de conglomerados del tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), usando el método de unión por promedios, con las variables cuantitativas usando la distancia Euclídea y con todas las variables utilizando la distancia de Gower en Infostat. Estos análisis se realizaron para explorar y determinar la afinidad morfológica de los ejemplares con las especies parentales propuestas. Además, se sumaron al análisis tres híbridos depositados en el herbario que involucran a alguna de las especies parentales putativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el recuento cromosómico realizado en el tejido radicular de la accesión CZ1 de *Paspalum* se observaron 30 cromosomas (Fig. 4), lo que indica que se trata de un individuo triploide ( $2n= 3x= 30$ ). Esto estaría en concordancia con la hipótesis propuesta en donde una gameta reducida ( $n= 20$ ) del alotetraploide *P. urvillei* fue fecundada por una gameta reducida ( $n= 10$ ) de las especies parentales diploides propuestas como putativas (*P. umbrosum*, *P. juergensii* y *P. paniculatum*). Existe evidencia de híbridos interespecíficos con  $2n= 3x= 30$  en cruzamientos entre *P. urvillei* 4x como parental femenino y *P. juergensii* 2x como parental masculino (Burson, 1972).



**Figura 4.** Célula en metafase mitótica de la accesión CZ1 de *Paspalum*, mostrando 30 cromosomas. Los asteriscos indican cromosomas superpuestos. Escala: 10  $\mu$ m.

Debido a que la accesión CZ1 resultó ser triploide, el comportamiento meiótico de los cromosomas fue irregular. Se analizaron un total de 1153 células en diferentes estadios de la meiosis. El mayor porcentaje de células con un comportamiento meiótico normal fue durante la subfase Paquiteno en la Profase I (39,9%, Tabla 1, Fig. 5). El mayor porcentaje de anomalías fue observado durante la Citocinesis, con la presencia de microsporas de diferentes tamaños



(14,6%, Tabla 1, Fig. 6G-H). Al considerar las células observadas en Paquiteno, el porcentaje de meiosis anormal fue de 56,6%, pero cuando está fase se ignora, el porcentaje de anomalías de la meiosis aumenta al 94,2% (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número y porcentajes de células anormales y tipos de anomalías observadas en la microsporogénesis y microgametogénesis.

<b>Fase meiótica</b>	<b>Anormalidad</b>	<b>N° de células analizadas y porcentaje (%)</b>
Paquiteno	Células Normales	460 (39,9)
	Binucleadas	4 (0,4)
Diacinesis	Células Normales (10II+10I)	6 (0,5)
	Trivalentes	10 (0,9)
	Separación de Genomas	9 (0,8)
<b>N° total de células en Profase I (% anormales)</b>		<b>489 (42,4)</b>
Metafase I	Células Normales	1 (0,1)
	Migración precoz	35 (3,0)
	Múltiples husos	3 (0,3)
	Huso caótico	3 (0,3)
<b>N° total de células en Metafase I (% anormales)</b>		<b>42 (3,6)</b>
Anafase I	Células Normales	0 (0)
	Cromosomas Rezagados	27 (2,3)
	Segregación irregular	32 (2,8)
	Puente Anafásico	9 (0,8)
	Cromosomas pegajosos	1 (0,1)
<b>N° total de células en Anafase I (% anormales)</b>		<b>69 (6,0)</b>
Telofase I	Células Normales	2 (0,2)
	Micronúcleos	5 (0,4)
	Cromosomas Rezagados	16 (1,4)
	Citocinesis anormal	10 (0,9)
<b>N° total de células en Telofase I (% anormales)</b>		<b>33 (2,9)</b>
Profase II	Células Normales	0 (0)
	Micronúcleos	36 (3,1)
	Cromosomas pegajosos	10 (0,9)
<b>N° total de células en Profase II (% anormales)</b>		<b>46 (4,0)</b>
Metafase II	Células Normales	0 (0)
	Huso caótico	2 (0,2)
	Migración precoz	18 (1,6)
	Cromosomas pegajosos	1 (0,1)
<b>N° total de células en Metafase II (% anormales)</b>		<b>21 (1,8)</b>
Anafase II	Células Normales	0 (0)
	Huso múltiple	3 (0,3)
	Laggards	18 (1,6)

	Segregación irregular	20 (1,7)	
	Puente Anafásico	2 (0,2)	
	Microcitos	1 (0,1)	
<b>N° total de células en Anafase II (% anormales)</b>		<b>44 (3,5)</b>	
Telofase II	Células normales	13 (1,1)	
	Células multinucleadas	1 (0,1)	
	Micronúcleos	40 (3,5)	
	Citocinesis anormal	17 (1,5)	
<b>N° total de células en Telofase II (% anormales)</b>		<b>71 (6,2)</b>	
Tétradas	Microsporas normales	18 (1,6)	
	Laggards	28 (2,4)	
	Micronúcleos	102 (8,8)	
	Triadas	6 (0,5)	
	Microsporas de tamaños diferentes	168 (14,6)	
	Microsporas binucleadas	16 (1,4)	
<b>N° total de células en Citocinesis (% anormales)</b>		<b>338 (29,3)</b>	
		<i>Con paquiteno</i>	<i>Sin paquiteno</i>
N° total de células evaluadas		1153	689
<b>Porc. (%) de células anormales</b>		<b>56,6</b>	<b>94,2</b>

Durante la primera división meiótica, la mayor proporción de anomalías se observaron durante la Metafase I, con la migración precoz de los cromosomas hacia los polos (Tabla 1). Durante la Anafase I, se observó la segregación irregular de los cromosomas y la presencia de cromosomas rezagados (Fig. 5E-G). Durante la Telofase I, también se observaron en mayor proporción cromosomas rezagados (Fig. 5H). Con respecto a las configuraciones cromosómicas observadas durante la Profase I tardía y Metafase I, las asociaciones más frecuentes fueron 9I+9II+1III (Fig. 5B) y 10II+10I. Se observó una baja frecuencia de formación de trivalentes (Tabla 2). La formación de trivalentes en la meiosis indicaría que existe una cierta homología entre los tres juegos de cromosomas, es decir que los parentales involucrados en la formación de este híbrido podrían tener cierta afinidad genética, y que por lo tanto podría haber recombinación genética entre los juegos cromosómicos de diferente origen. Trabajos anteriores donde se obtuvieron híbridos triploides interespecíficos experimentales en *Paspalum*, reportan únicamente la formación de univalentes y bivalentes, por ejemplo, entre *P. urvillei* 4x x *P. intermedium* 2x

y *P. dilatatum* 4x x *P. paniculatum* 2x (Burson, 1979), o *P. urvillei* 4x x *P. vaginatum* 2x y *P. urvillei* 4x x *P. juergensii* 2x (Burson & Bennet, 1972).

En la segunda división meiótica, las anormalidades fueron similares a las observadas en Meiosis I (Tabla 1). Durante la Profase II, se observó con mayor frecuencia la presencia de micronúcleos (Fig. 6A). Durante la Metafase II, la migración cromosómica precoz a los polos fue la anormalidad más observada (Fig. 6B), y durante la Anafase II se observaron, tanto la segregación irregular de los cromosomas hacia los polos y cromosomas rezagados (Fig. 6D-E). En la Telofase II se observó con mayor frecuencia la formación de micronúcleos, los cuales persisten hasta la formación de las tétradas (Fig. 6F). A su vez, se observó que la citocinesis fue irregular con un alto porcentaje de formación de microsporas de diferentes tamaños (Fig. 6H). El comportamiento irregular de los cromosomas en la meiosis también se ha observado en otros híbridos interespecíficos de *Paspalum*, donde la presencia de cromosomas rezagados y micronúcleos se observaron con mayor frecuencia durante las Anafase I y II (Burson & Bennet, 1972; Burson, 1979). Las anomalías meióticas relacionadas a la segregación irregular de los cromosomas se pueden atribuir a la terminación precoz de los quiasmas en los bivalentes o a la alta frecuencia de univalentes. En el caso de los bivalentes, la terminación precoz de los quiasmas puede llevar a la migración precoz de los cromosomas a los polos, y un retraso en la terminación de los quiasmas puede originar cromosomas rezagados o puentes anafásicos en Anafase I (De Souza-Kaneshima *et al.*, 2010). En el caso de los univalentes, al no tener homólogo(s) su comportamiento meiótico es irregular. En ambos casos, los cromosomas rezagados suelen no ser incluidos en los núcleos telofásicos y se mantienen como micronúcleos. Estos micronúcleos se pierden durante la meiosis II, aumentando el número de anormalidades meióticas.

También se han observado altos porcentajes de anormalidades de la meiosis en híbridos interespecíficos de *Brachiaria* (<90%) o *Ranunculus* (20-30%) (Risso-Pascotto *et al.*, 2004; Barke *et al.*, 2020). Tanto en *Paspalum* como en estos dos últimos géneros, las anomalías meióticas se explican en relación a la ploidía de los híbridos, los cuales son poliploides y en la mayoría de los casos

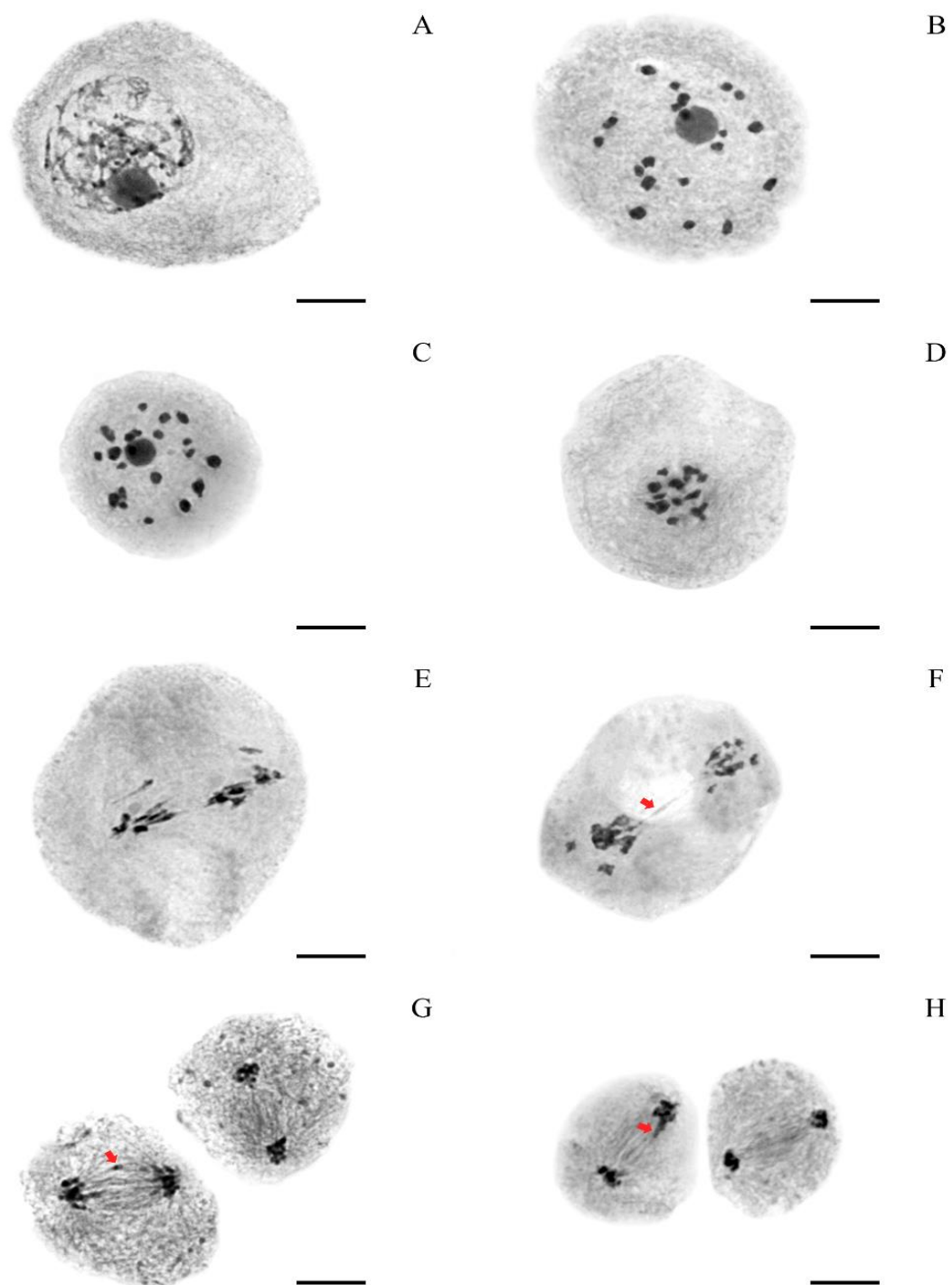
son poliploides impares (triploides, pentaploides) y por la hibridación interespecífica (formación de alopoliploides).

**Tabla 2.** Configuraciones meióticas observadas durante la meiosis del híbrido triploide CZ1 de *Paspalum*.

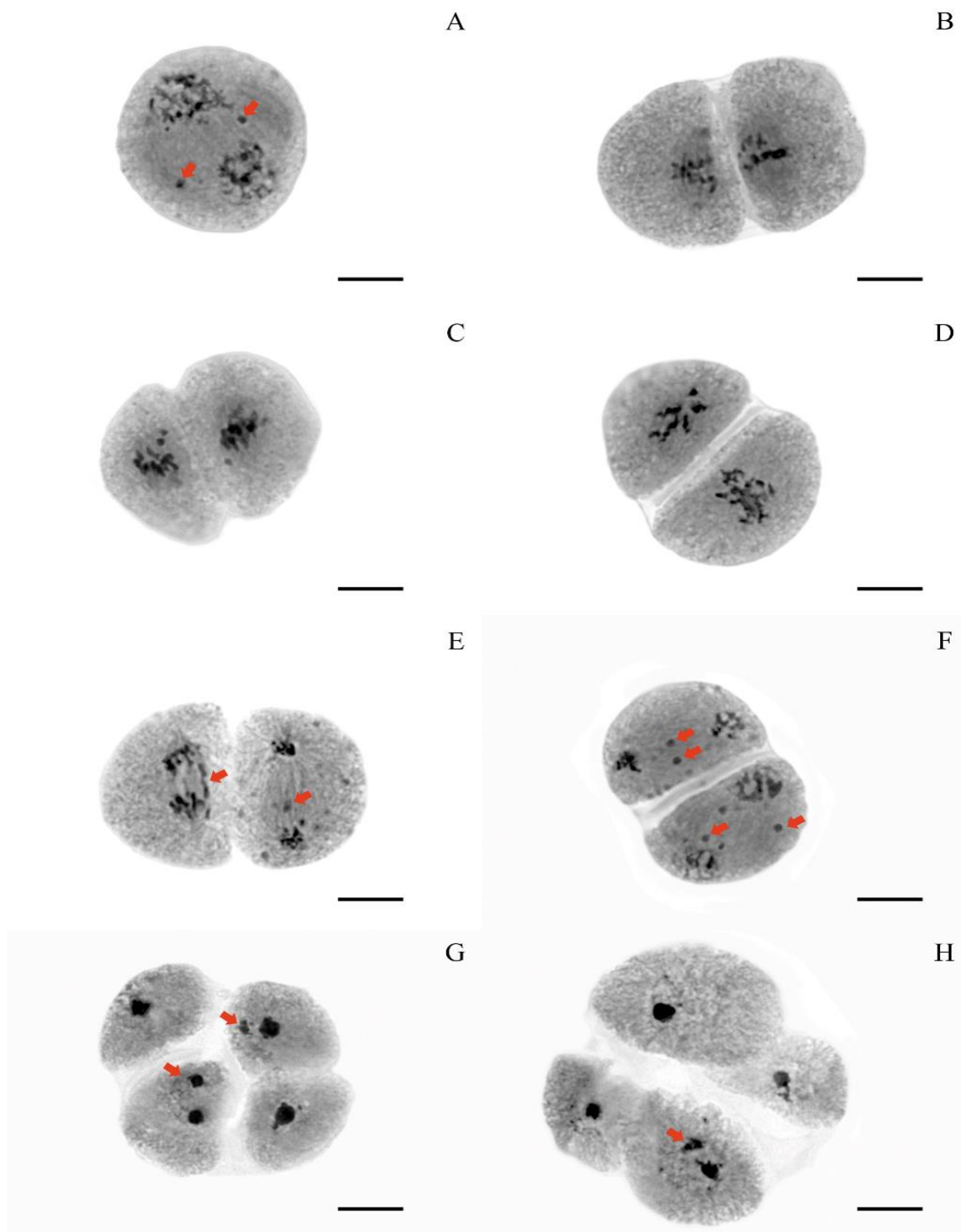
Accesión	2n	No. de CMP analizadas	Asociaciones cromosómicas		
			Rango y Promedio		
			I	II	III
CZ1	30	25	6-16	6-11	1-2
			10,3 ± 2,5	9,1 ± 1,2	1,1 ± 0,3

*Referencias:* CMP, célula madre del polen; I, Univalentes; II, Bivalentes; III, Trivalentes.

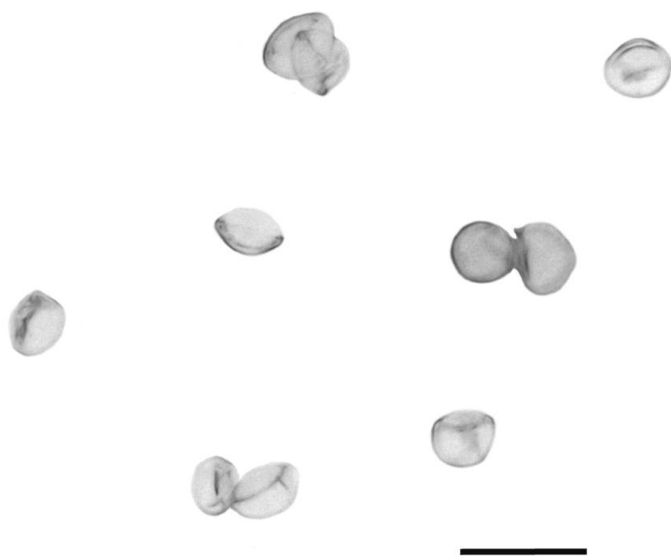
Los resultados observados en la microgametogénesis y microsporogénesis se corresponden con lo observado a nivel de granos de polen. Se observaron alrededor de 3000 granos de polen, y ninguno fue viable (Fig. 7). El hecho de que se trate de un individuo androestéril se corresponde con el alto porcentaje de anomalías observadas en la meiosis (94%) al no considerar el Paquiteno en la Profase I. Resultados similares se observaron en híbridos experimentales de *P. urvillei* 4x × *P. intermedium* 2x (1,6% de viabilidad de polen) o *P. dilatatum* 4x × *P. paniculatum* 2x (0%, Burson, 1979) o *P. urvillei* 4x × *P. vaginatum* 2x y *P. urvillei* 4x × *P. juergensii* 2x, ambos con 0% de polen viable (Burson & Bennet, 1972). Según Risso-Pascotto *et al.* (2004), en estudios realizados en un híbrido interespecífico de *Brachiaria*, la alta frecuencia de granos de polen estériles (47,2%) podría atribuirse a anomalías meióticas, como ser la segregación cromosómica irregular, cromosomas pegajosos y citocinesis anormal. La segregación irregular de los cromosomas lleva a la formación desequilibrada de los gametos, provocando la muerte celular y la esterilidad. La esterilidad puede resultar del apareamiento cromosómico incompleto o inestable durante la división celular meiótica (De Souza *et al.*, 2010); ya que la parte más importante y, por lo tanto, estrictamente controlada de todo el mecanismo, es la formación de entrecruzamientos entre cromosomas homólogos que facilitan la recombinación genética durante la meiosis I (Harrison *et al.*, 2010). La falla o falta de apareamiento cromosómico durante la meiosis I conlleva a la formación desequilibrada de gametos.



**Figura 5.** Microsporogénesis: Meiosis I. **A**, Profase I, Paquíteno. **B**, Profase I, Díploteno con 10II+10I, con nucleolo persistente. **C**, Profase I, Díploteno con 11II+8I, con nucleolo persistente. **D**, Metafase I temprana. **E**, Anafase I temprana. **F**, Anafase I tardía con puente anafásico (flecha). **G**, Dos células madres de la microspora en Telofase I temprana y Anafase I tardía, con un cromosoma rezagado (flecha). **H**, Dos microsporas en Telofase I temprana, una de ellas con cromosomas rezagados (flecha). Escala: 5  $\mu$ m.

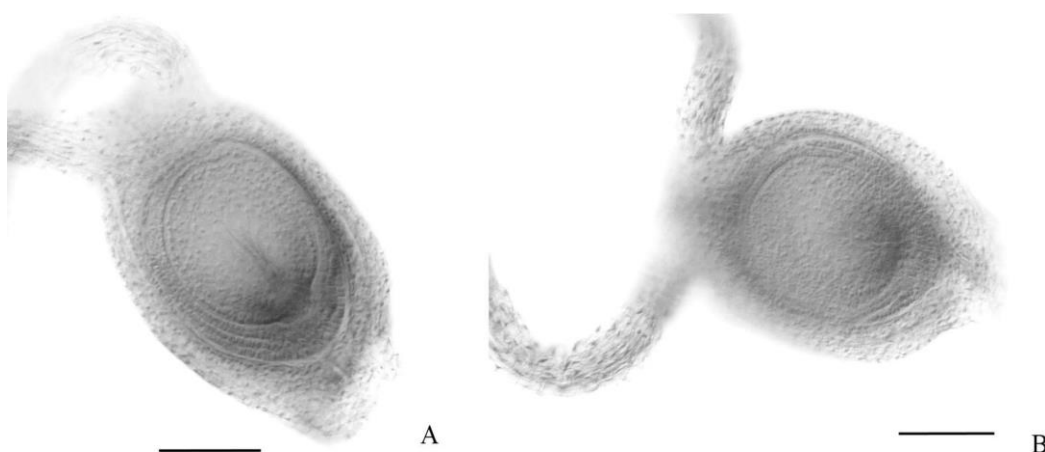


**Figura 6.** Microsporogénesis: Meiosis II. **A**, Telofase I tardía-Profase II, con cromosomas rezagados (flechas). **B**, Díada en Metafase II, con cromosomas rezagados. **C**, Metafase II, con cromosomas rezagados. **D**, Anafase II temprana, con migración dispar de cromosomas hacia los polos. **E**, Anafase II intermedia-tardía con puente anafásico y cromosoma rezagado (flechas). **F**, Telofase II con micronúcleos (flechas). **G**, Tétradas con micronúcleos (flechas). **H**, Tétradas de diferentes tamaños, con micronúcleos (flecha). Escala: 5 µm.



**Figura 7.** Granos de polen no viables. Escala: 50  $\mu$ m.

Respecto a la determinación del modo reproductivo, se observaron 100 pistilos clarificados, de los cuales ninguno mostró desarrollo de sacos embrionarios (Fig. 8), probablemente por anomalías en la megasporogenesis y megagametogenesis. Esto indicaría que se trata de un individuo 100% estéril. La falla en el desarrollo del saco embrionario probablemente sea causada por un desbalance genético debido a la diferencia en el nivel de ploidía entre las especies parentales y a la meiosis irregular (Burson & Bennet, 1972).



**Figura 8.** Ovarios con sacos embrionarios no desarrollados. Escala: 100  $\mu$ m.

Al hacer los ensayos de polinización, se observó una muy baja producción de semillas, tanto en autopolinización (0,06-0,24%) y polinización abierta (0-

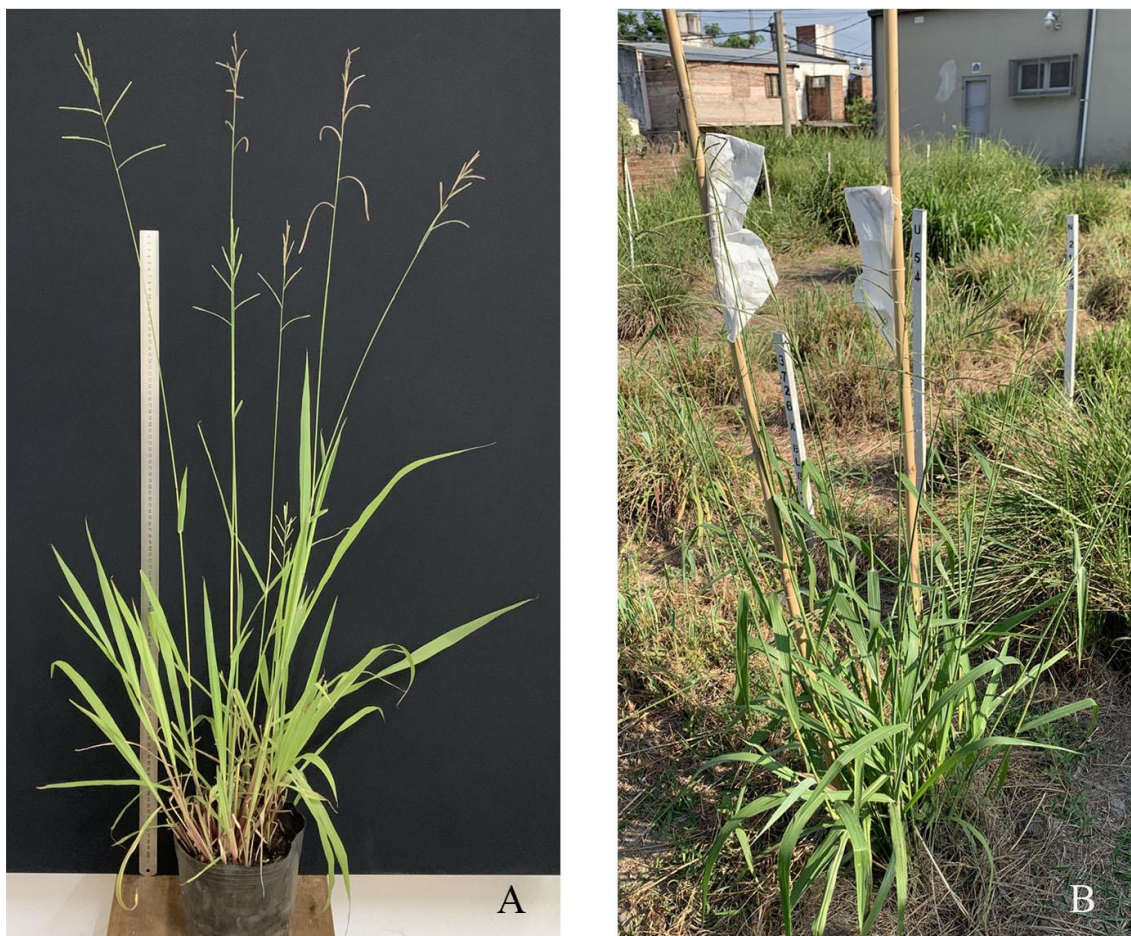
0,14) (Tabla 3). Está nula a baja fertilidad es esperada en una planta sin producción de polen o sacos embrionarios viables, y las pocas semillas obtenidas pueden provenir de la unión de gametos normales  $n + n$ ,  $2n + 2n$  o  $n + 2n$ , aunque queda demostrado que estos eventos de fecundación de gametos normales son de muy baja frecuencia. Tanto los híbridos obtenidos por Burson & Bennet (1972) como por Burson (1979) fueron 100% estériles, sin producción de semillas, por el deterioro o aborto de los sacos embrionarios. Según Risso-Pascotto *et al.* (2004) la producción de semillas se ve afectada seriamente por anomalías meióticas como las observadas en los híbridos interespecíficos de *Brachiaria ruziziensis* y *B. brizantha*.

**Tabla 3.** Producción de semillas en polinización abierta y autopolinización del híbrido triploide CZ1 estudiado de *Paspalum*.

Fecha	Condición	N° espiguillas con cariopse desarrollado	N° espiguillas vanas o vacías	N° Total de espiguillas analizadas	Porcentaje de fertilidad (%)
Dic-21	Pol. Abierta	1	1554	1555	0,06
Dic-21	Pol. Abierta	2	1467	1469	0,14
Dic-/21	Pol. Abierta	1	6613	6614	0,02
Feb-22	Pol. Abierta	5	56557	56462	0,01
Dic-21	Pol. Abierta	0	3337	3337	0,00
Nov-21	Autopolinización	4	1640	1644	0,24
Nov-21	Autopolinización	1	1579	1580	0,06

Respecto al análisis morfológico de la accesión CZ1 y los ejemplares de herbario de las especies parentales propuestas, se observa que la planta en estudio (CZ1) se asemeja principalmente a *P. urvillei* (Fig. 9). En el trabajo de Burson & Bennet (1972) y Burson (1979), los híbridos experimentales en donde el parental femenino era *P. urvillei*, se asemejaban fenotípicamente a esta especie, independientemente de la especie parental masculina. Por lo tanto, *P. urvillei* podría ser la especie que actuó de parental femenino del híbrido CZ1 estudiado.





**Figura 9.** Planta entera de la accesión CZ1. **A**, Individuo de CZ1 en maceta bajo invernadero. Escala: 100 cm. **B**, Individuo de CZ1 implantado a campo y ensobrado.

En la tabla 4 y 5 se presentan las medias y los desvíos estándares de las características morfológicas vegetativas y reproductivas, respectivamente, del híbrido en estudio y de las especies parentales putativas. En la tabla 6 se muestra la moda de caracteres cualitativos en el híbrido natural y las especies parentales putativas.

**Tabla 4.** Medias y Desvíos estándares de las características morfológicas vegetativas en el híbrido natural y las especies parentales putativas.

Especie o híbrido	n	HI (cm)	L2V (cm)	PV2 (mm)	L2E (cm)	PN2 (mm)	L2H (cm)	A2H (cm)	LPPL (mm)
<b>CZ1</b>	3	94,5±5,1	20,2±6,3	0	18,3±1,8	0	11,0±1,7	0,8±0,2	5,0
<i>P. juergensii</i>	13	61,2±29,5	9,6±3,9	1,0	10,0±4,4	2,0±1,4	11,3±5,4	0,8±0,2	5,6±1,2
<i>P. paniculatum</i>	39	84,9±28,1	11,0±2,4	1,3±0,9	10,4±3,2	3,0±1,8	17,1±4,3	1,1±0,2	5,9±2,2
<i>P. umbrosum</i>	17	71,7±26,9	13,2±3,5	1,0±0,6	12,0±2,6	2,6±0,8	16,0±4,9	1,3±0,4	7,3±2,7
<i>P. urvillei</i>	39	115,4±35,1	19,2±3,3	2,2±1,2	19,7±4,4	2,0±2,4	28,0±10,1	0,9±0,3	6,7±1,7
<i>P. urvillei</i> x <i>P. juergensii</i>	1	150,0	22,0	s.d.	14,0	1,0	27,0	1,0	5,0
<i>P. urvillei/paniculatum</i>	1	76,5	14,0	1,0	13,0	1,0	17,0	1,1	6,0
<i>Paspalum</i> x <i>urvillei</i>	1	149,0	30,0	s.d.	12,0	s.d.	30,0	1,2	s.d.

**HI:** Altura de la planta. **L2V:** Largo 2° vaina. **PV2:** Longitud de la pilosidad de la vaina. **L2E:** Largo 2° entrenudo. **PN2:** Longitud de la pilosidad nudo. **L2H:** Largo 2° hoja. **A2H:** Ancho 2° hoja. **LPPL:** Longitud del pelo de la pseudolígula. **s.d.:** sin datos.

**Tabla 5.** Medias y Desvíos estándares de las características morfológicas reproductivas en el híbrido natural y las especies parentales putativas

Especie	n	LI (cm)	LRI (cm)	PR (mm)	NR (N°)	LE (mm)	AE (mm)	PE2 (mm)
<b>CZ1</b>	3	11,5±1,3	8,2±1,0	4,0	8,7	2,0	1,0	1,00
<i>P. juergensii</i>	13	8,8±4,2	5,5±2,8	4,1±0,8	8,5	1,4±0,2	1,0	0,5±0,3
<i>P. paniculatum</i>	39	11,8±3,6	7,3±2,4	4,4±1,6	12,6	1,5±0,2	1,0	0,4±0,1
<i>P. umbrosum</i>	17	11,1±3,4	7,4±2,3	4,3±0,9	11,2	1,4±0,2	1,0	0,3±0,1
<i>P. urvillei</i>	39	19,5±5,9	9,1±2,4	6,4±1,7	13,4	2,5±0,4	1,4±0,2	1,5±0,4
<i>P. urvillei</i> x <i>P. juergensii</i>	1	18,0	10,0	6,0	24,0	2,0	1,0	0,3
<i>P. urvillei/paniculatum</i>	1	22,0	6,0	5,0	28,0	2,0	1,5	0,4
<i>Paspalum</i> x <i>urvillei</i>	1	13,0	7,5	6,0	11,0	3,0	2,0	1,0

**LI:** Largo inflorescencia. **LRI:** Largo racimo inferior. **PR:** Longitud de la pilosidad de los racimos. **NR:** Número de racimos. **LE:** Largo espiguilla. **AE:** Ancho espiguilla, **PE2:** Longitud de los pelos de las espiguillas.

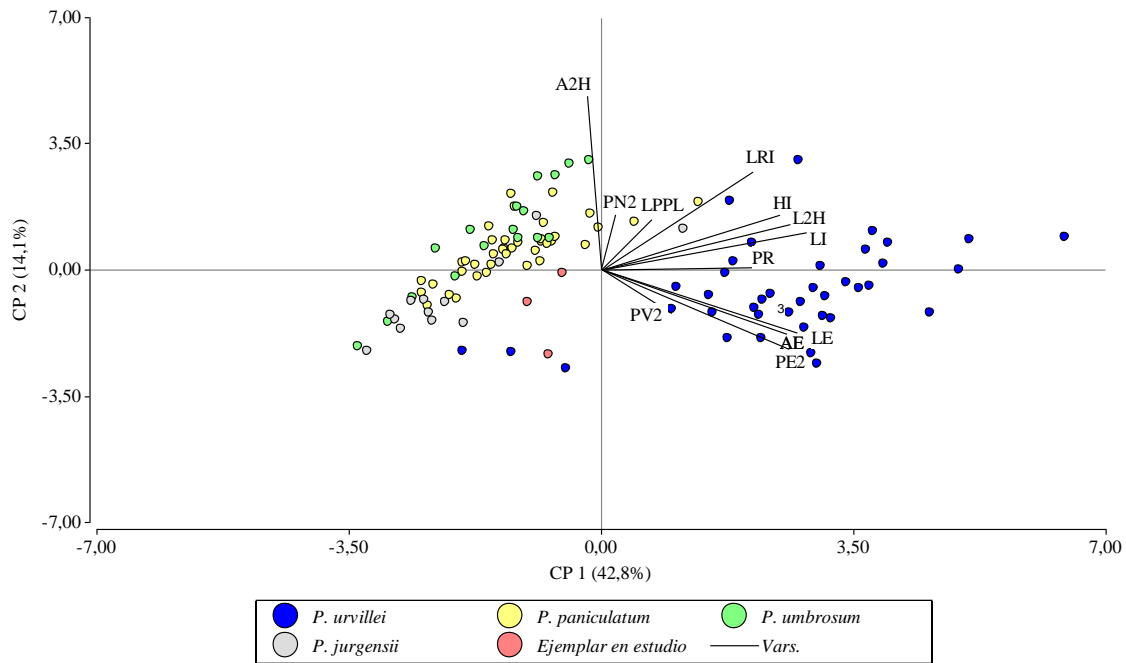
**Tabla 6.** Moda de caracteres cualitativos en el híbrido natural y las especies parentales putativas.

Especie o híbrido	n	PV1	PVB	Lugar PV	PN1	TR	CE	PE1	Lugar PE	PL-L	PL1	Cara	PL2	APL
CZ1	3	0	0	0	0	1	1	2	2	3	0	0	0	0
<i>P. juergensii</i>	13	1	0	6	0	1	2	2	1	1	1	4	1	2
<i>P. paniculatum</i>	39	1	0	6	0	1	1	2	1	1	1	4	1	2
<i>P. umbrosum</i>	17	1	0	6	0	1	1	1	1	1	1	4	1	2
<i>P. urvillei</i>	39	0	0	6	0	1	1	2	1	3	0	0	0	0
<i>P. urvillei</i> × <i>P. juergensii</i>	1	0	0	0	1	1	2	2	2	1	0	0	0	0
<i>P. urvillei/paniculatum</i>	1	1	0	5	1	3	1	3	1	1	0	0	0	0
<i>Paspalum</i> × <i>urvillei</i>	1	1	0	6	0	1	1	2	2	s.d.	0	0	0	0

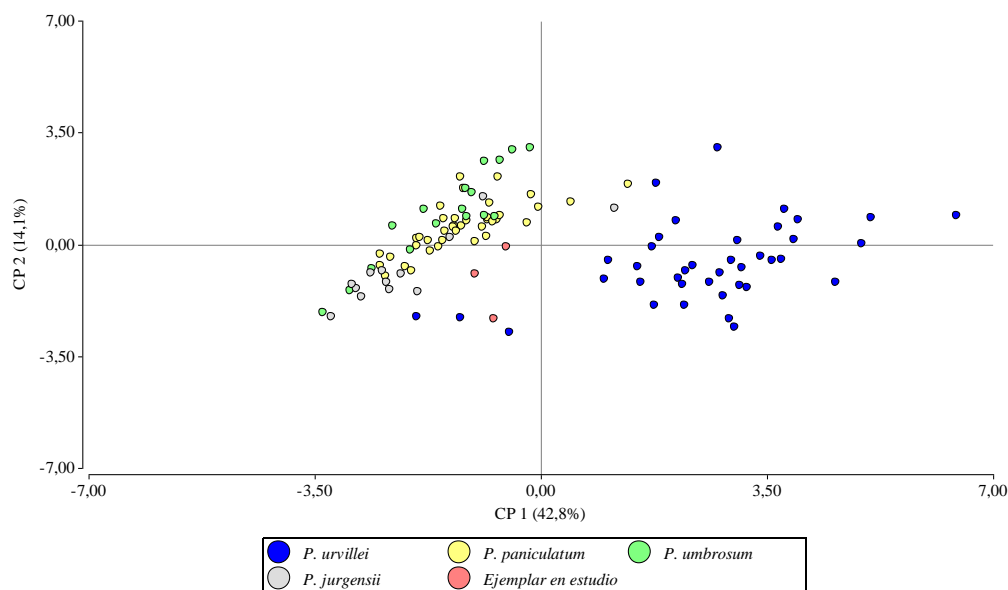
**PV1:** Pilosidad vaina, 0: no tiene 1: tiene. **PVB:** Pilosidad vaina basal, 0: no tiene 1: tiene. **Lugar PV:** 0: no tiene 1: Base 2: Margen 3: Ápice 4: Base + margen 5: Ápice + margen 6: toda la vaina. **PN1:** Pilosidad nudo, 0: no tiene 1: tiene. **TR:** Terminación Racimos, 1: espiguilla desarrollada 2: terminación estéril 3: Algunas con terminaciones estériles. **CE:** Color espiguilla, 1: verde claro/beige 2: violeta 3: oscura. **PE1:** Pilosidad espiguillas, 0: sin 1: poco 2: intermedio 3: abundante. **Lugar PE:** Lugar pelos espiguillas, 1: toda la espiguilla 2: margen 3: Base + margen. **PL-L:** Lígula y pseudolígula, 1: pelos 2: membrana 3: Pelo + membrana. **PL1:** Pilosidad de la lámina, 0: glabra 1: pubescente. **Cara:** ubicación de los pelos de la lámina, 0: sin 1: haz 2: envés 3: nervio central 4: ambas. **PL2:** Longitud pelos lámina, 0: sin 1: corto 2: largo. **APL:** Abundancia pelos lámina, 0: sin 1: poco 2: intermedio 3: mucho.

Si nos centramos en la componente principal 1 (CP1, Fig. 10), la cual explica el 42,8% de la variabilidad existente, podemos ver que *P. urvillei* se posiciona en el polo positivo del eje. Mientras que las especies del grupo *Paniculata* se ubican del lado izquierdo de la CP1, es decir en el polo negativo. Sin embargo, cuando nos posicionamos en la componente principal 2 (CP2), la cual explica el 14,1% restante de la variabilidad, vemos que la mayoría de los puntos se encuentran concentrados dentro de un mismo rango (-3,50 a 3,50). Se puede observar que caracteres como longitud de la pilosidad de las espiguillas (**PE2**), largo de las espiguillas (**LE**), largo de la inflorescencia (**LI**), largo de la 2° hoja (**L2H**), largo del 2° entrenudo (**L2E**), largo de la 2° vaina (**L2V**), y altura de la planta con inflorescencia (**HI**) son los que más contribuyen a la separación de los puntos sobre la CP1 (Anexo, Tabla Supl. 1), teniendo *P. urvillei* los valores más altos de estas variables con respecto a las demás especies. Por otro lado, el ancho de la 2° hoja (**A2H**) y el largo del racimo inferior (**LRI**) son las variables que más contribuyen en la CP2 hacia el polo positivo. En este sentido, podemos observar en la proyección de los puntos sobre la componente principal 2, la tendencia hacia el polo positivo de *P. umbrosum* y *P. paniculatum*. (Fig. 10). Por otro lado, se puede observar que las variables relacionadas a la espiguilla, como ser el ancho (**AE**), largo (**LE**) y longitud de la pilosidad de las espiguillas (**PE2**) se encuentran correlacionadas entre sí. Como así también la altura total de la planta con inflorescencia (**HI**), largo de la 2° hoja (**L2H**) y largo de la inflorescencia (**LI**). Por lo que se podría sugerir para trabajos posteriores analizar una sola variable por grupo.

Cuando analizamos la distribución de los puntos en el espacio de las dos primeras componentes principales (Fig. 11), observamos que al considerar solo las variables cuantitativas, los ejemplares estudiados de la accesión CZ1 se ubican en el cuadrante negativo de la CP1 y CP2, denotando una mayor similitud al grupo *Paniculata*.

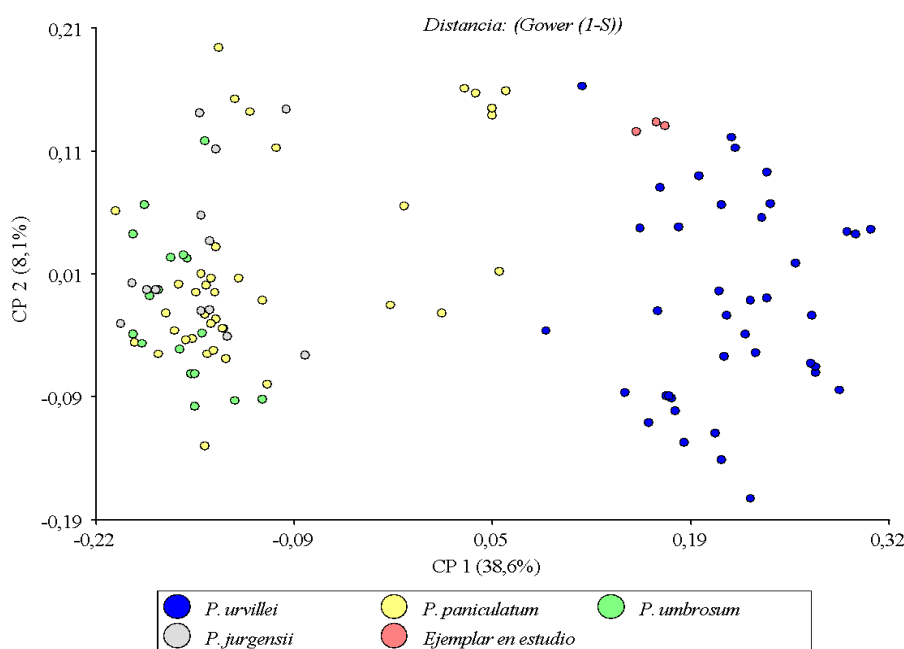


**Figura 10.** Análisis de componentes principales con variables morfológicas cuantitativas, utilizando la media como medida de posición. Referencias, **A2H**: Ancho de la 2° hoja. **L2V**: Largo de la 2° vaina. **LRI**: Largo del racimo inferior. **LPPL**: Longitud del pelo de la pseudolígula. **L2E**: Largo del 2° entrenudo. **AE**: Ancho de la espiguilla. **HI**: Altura de la planta con inflorescencia. **LI**: Largo de la inflorescencia. **L2H**: Largo de la 2° hoja. **PR**: Pilosidad de los racimos. **PE2**: Longitud de la pilosidad de las espiguillas. **LE**: Largo de las espiguillas. **PV2**: Longitud de la pilosidad de la vaina. **PN2**: Longitud de la pilosidad del nudo.



**Figura 11.** Análisis de componentes principales con variables morfológicas cuantitativas, utilizando la media como medida de posición.

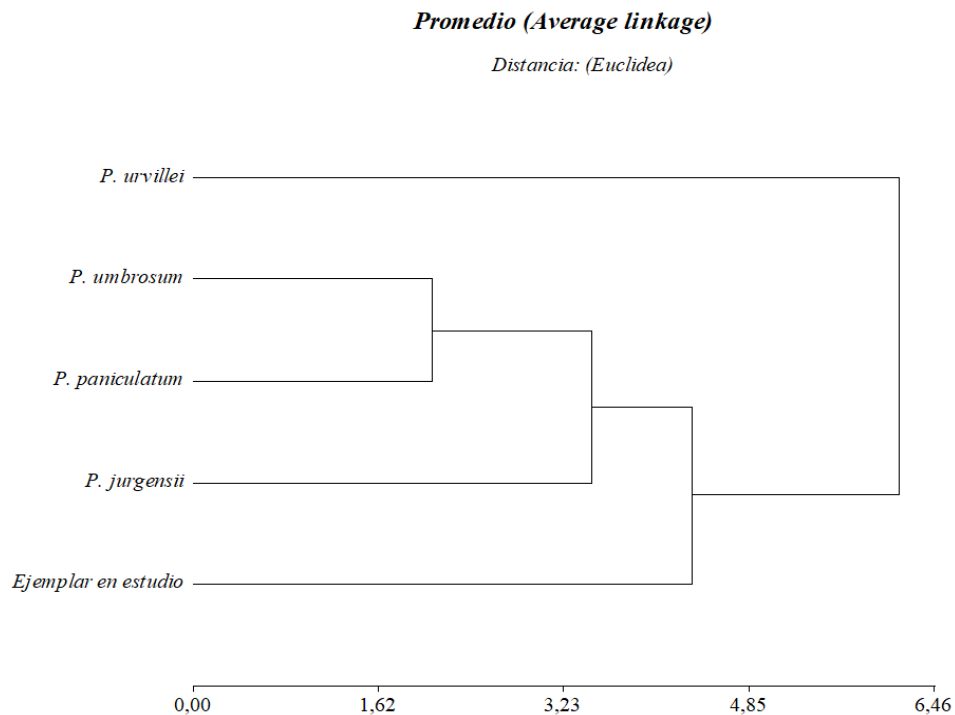
Al introducir las variables cualitativas al análisis (Fig. 12), la dispersión de los puntos se modifica levemente, sobre todo en los ejemplares en estudio. Sin embargo, la posición de las especies se mantiene similar con respecto al análisis de componentes principales (Figs. 10 y 11), en donde *Paspalum urvillei* se distribuye del lado opuesto a las especies del grupo Paniculata (Fig. 12). Los ejemplares de CZ1 se encuentran hacia los polos positivos de ambas coordenadas principales, y tienden a agruparse con *P. urvillei*. Por otro lado, las especies del grupo Paniculata, *P. umbrosum*, *P. paniculatum* y *P. juergensii*, se agrupan entre si hacia el polo negativo de Coordenada Principal 1.



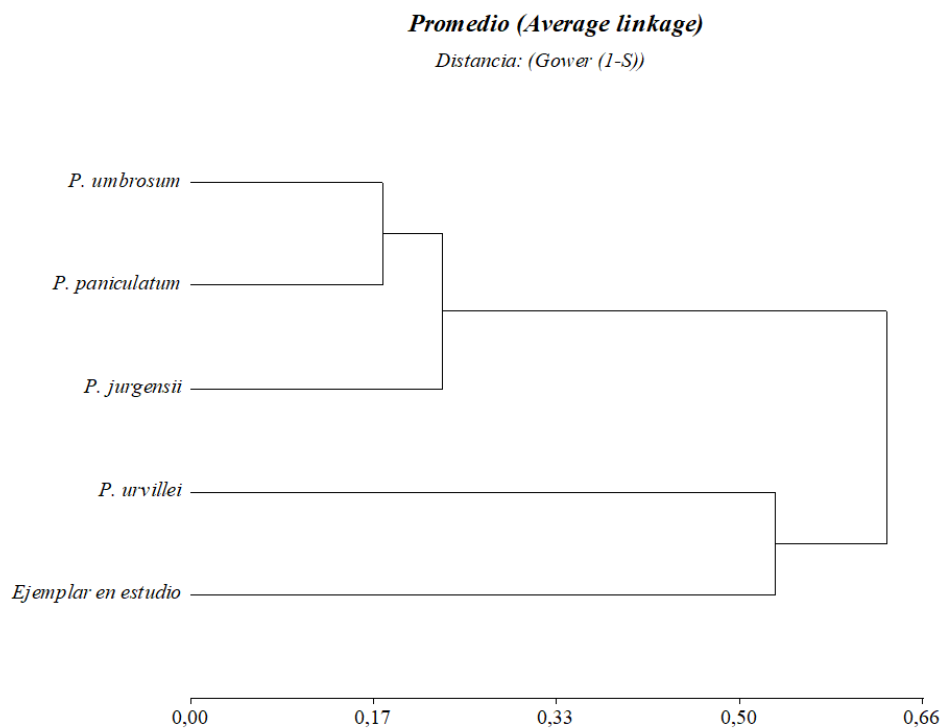
**Figura 12.** Análisis de coordenadas principales con variables morfológicas cuantitativas y cualitativas, utilizando la distancia de Gower. Se utilizaron todas las variables analizadas.

En el análisis de agrupamientos tanto por especie (Figs. 13 y 14) como por individuo (Anexos, Figs. Supls. 1 y 2), al considerar todas las variables analizadas, los ejemplares de CZ1 se agrupan con *P. urvillei* (Correlación cofenética= 0,969; Fig. 14 y Anexo Fig. Supl. 2), en concordancia con el análisis de coordenadas principales. Al observar los índices de similitud entre las especies, cuando se consideran todas las variables, los ejemplares CZ1 son más parecidos a *P. urvillei*, con un índice de Gower de 0,54, seguido a *P. juergensii*

con un índice de 0,55; *P. paniculatum* con un índice de similitud de 0,57 y por último *P. umbrosum* con un índice de 0,63 (Anexo, Tabla Supl. 2). Sin embargo, si se consideran sólo las variables cuantitativas, los ejemplares CZ1 son agrupados con las especies del grupo Paniculata (Correlación cofenética= 0,961; Fig. 13 y Anexo Fig. Supl. 1), en concordancia con el análisis de componentes principales. En este caso, los ejemplares CZ1 presentan una distancia Euclídea de 4,7 con *P. juergensii*, de 5,4 con *P. paniculatum*, de 5,5 con *P. umbrosum*, y de 6,7 con *P. urvillei* (Anexo, Tabla Supl. 3). Esto indicaría que, al considerar sólo caracteres morfológicos cuantitativos, los ejemplares CZ1 se asemejan más al grupo Paniculata (en particular a *P. juergensii*), pero si también se consideran los caracteres cualitativos analizados, estos se asemejan más a *P. urvillei*.



**Figura 13.** Análisis UPGMA con variables cuantitativas, utilizando la distancia Euclídea, en las especies e híbrido CZ1 estudiado.



**Figura 14.** Análisis UPGMA con variables cuantitativas y cualitativas, utilizando la distancia de Gower, en las especies e híbrido CZ1 estudiado.



## CONCLUSIONES

- La accesión CZ1 es un híbrido triploide ( $2n=3x=30$ ) con meiosis irregular con formación de 9I+9II+1III y 10II+10I en mayor frecuencia. La accesión CZ1 resultó ser totalmente estéril debido a que no desarrolló sacos embrionarios ni polen viable. Por consecuencia, se observó una casi nula producción de semillas en condiciones de polinización abierta y autopolinización.
- De acuerdo a su morfología, y considerando especialmente a los caracteres cualitativos analizados, la accesión CZ1 de *Paspalum* estudiado presentó similitudes con *P. urvillei*, lo que sugiere que esta especie probablemente actuó como el parental materno.
- Al considerar sólo los caracteres cuantitativos, la accesión CZ1 se agrupa con las especies del grupo Paniculata. Dentro de este grupo, los ejemplares presentan mayor afinidad con *P. umbrosum* y *P. juergensii*, aunque estas similitudes no permiten identificar al parental faltante.

## BIBLIOGRAFÍA

- Batista LAR, Godoy R. 2000. Preliminary Characterization and Selection of Germoplasm of Genus *Paspalum* for Forage Production. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29 (1): 23-32. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100004>
- Burkart AE. 1969. Gramíneas. La familia botánica de los pastos. *Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina)* Vol VI, Parte 2.
- Burson BL, Bennett HW. 1972. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. juergensii* and *P. urvillei* x *P. vaginatum* Hybrids. *Crop Science* 12: 105-108
- Burson BL. 1979. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum* Hybrids. *Crop Science* 19: 534-538
- Chase A. 1929. The North American species of *Paspalum*. *Contributions from the U.S. National Herbarium* 28: 1–310.
- Denham S. 2005. Revisión Sistemática Subgénero *Harpostachys* (Poaceae : Panicoideae : Paniceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 92(4): 463–532.
- Denham S, Zuloaga F. 2007. Phylogenetic Relationships of the Decumbentes Group of *Paspalum*, *Thrasya* and *Thrasyopsis* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* 23(1): 545–562. <https://doi.org/10.5642/aliso.20072301.41>
- de Souza CHL. 2019. Seed and forage performance for an elite group of *Paspalum notatum* intraspecific hybrids. Tesis de Posgrado en Zootecnia, Facultad de Agronomía, Universidad Federal de Rio Grande do Sul. <http://hdl.handle.net/10183/196397>
- De Souza-Kaneshima AM. 2010 Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. *Plant Breeding* 129, 186—191
- Feulgen R, Rossenbeck H. 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende

elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 135: 203–249

- Furlan V, Cariola L, García D, Hilgert N. 2015. Caracterización de los sistemas agroforestales familiares y estrategias de uso del ambiente en el Bosque Atlántico Argentino. Universidad Federal Da Paraiba. Centro de Ciencias Humanas, Letras y Artes, *Gaia Scientia* 9(3): 69-81. <https://periodicos.ufpb.br/ojs/index.php/gaia/article/view/27706>
- Herrera Cedano F, Villanueva Avalos JF, González Sotelo A, Silva Luna M, Plascencia Jiménez, R. 2010. Monitoreo de plantas forrajeras nativas con potencial para el Pacífico Centro de México: Asegurando la adaptación local y manteniendo la diversidad genética. INIFAP-CIRPAC. Campo experimental Santiago Ixcuintla, Folleto Técnico Núm. 13 ISBN 978-607-425-491-4. Santiago Ixcuintla, Nayarit. 19 p.
- Hojsgaard D, Honfi AI, Rua G, Davina J. 2009. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 56(4): 533-545. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9384-0>
- Hunziker JH, Zuloaga FO, Morrone O, Escobar A. 1998. Estudios cromosómicos en paniceae sudamericanas (Poaceae, Panicoideae) *Darwiniana* 35: 29-36.
- Nicora EG, Rúgolo de Agrasar ZE. 1987. Los géneros de gramíneas de América austral. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, Keys. Geog, pp. 1-611.
- Ortiz JPA, Quarín CL, Pessino SC, Acuña C, 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 of Botany* 112(5): 767–787. <https://doi.org/10.1093/aob/mct152>
- Quarín CL. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Reutemann AV, Daviña JR, Rua GH, Honfi AI. 2019. Chromosome data in *Paspalum* species. IAPT chromosome data 31/11 In: Marhold, K. & Kučera,

- J. (eds.) & al., *IAPT chromosome data 31. Taxon* 68(6): E39-E42.  
<https://doi.org/10.1002/tax.12176>
- Reutemann AV, Hojsgaard DH, Martínez EJ, Rua GH, Daviña JR, Honfi AI 2020. Chromosome data in *Paspalum* species. IAPT chromosome data 33/12 In: Marhold, K. & Kučera, J. (eds.) & al., *IAPT chromosome data 33. Taxon* 69(6): E41–E44. <https://doi.org/10.1002/tax.12414>
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Borges do Valle C, Jank L. 2004. Asynchronous meiosis in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha*. *Plant Cell Reproduction* 23: 304–310
- Rosengurtt B, Arrillaga de Mafei B, Izaguirre de Artucio P. 1970. Gramíneas Uruguayas. Universidad de la República, Departamento de publicaciones, colección ciencias 5. Montevideo.
- Sawasato JT, Dall'Agnol M, da Conceição DP, Tafernaberri Junior V, Baracy Klafke G. 2008. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37: 1366-1374 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000800005>
- Scataglini MA, Zuloaga FO, Giussani LM, Denham SS, Morrone O. 2014. Phylogeny of New World *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae) based on plastid and nuclear markers. *Plant Systematics and Evolution* 300(5): 1051–1070. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0944-1>
- Valls JFM, Pozzobon MT. 1987. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. *Encontro Internacional Sobre Melhoramento Genético de Paspalum*, 15–21.
- Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC. 1979. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany* 57: 1668-1672. <https://doi.org/10.1139/b79-204>
- Zilli AL, Brugnoli EA, Marcón F, Billa MB, Rios EF, Martínez EJ, Acuña CA 2015. Heterosis and expressivity of apospory in tetraploid bahiagrass hybrids. *Crop Science* 55: 1189-1201. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.10.0685>

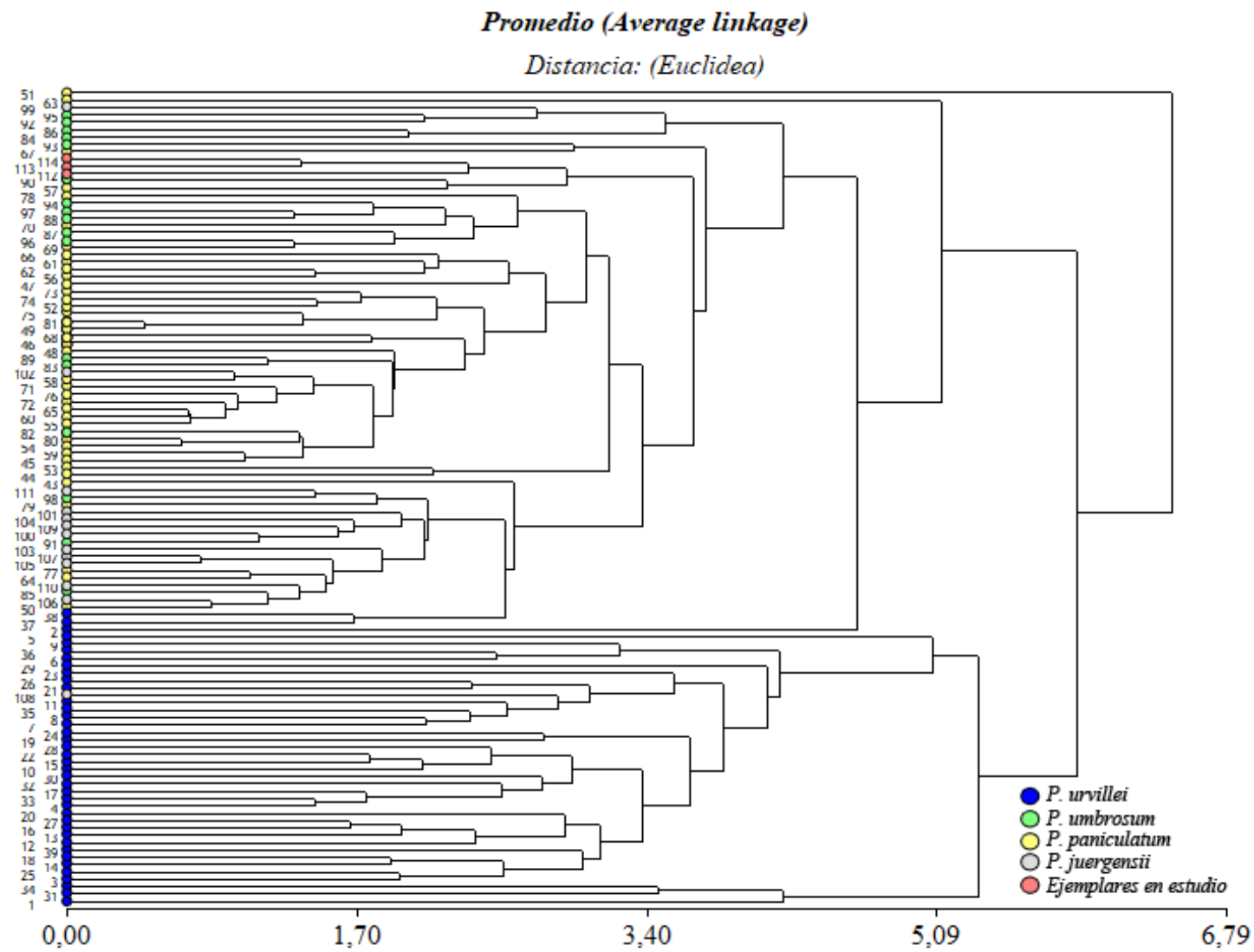
Zuloaga FO, Morrone O. 2001. Poaceae, parte 4. Tribu 18. Paniceae, parte B. 21-*Paspalum*. Fl Fanerogamica Argentina. Pro Flora-CONICET. Fascículo 71: 3-54.

Zuloaga FO, Morrone O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur. Austral. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 102: 1-297.

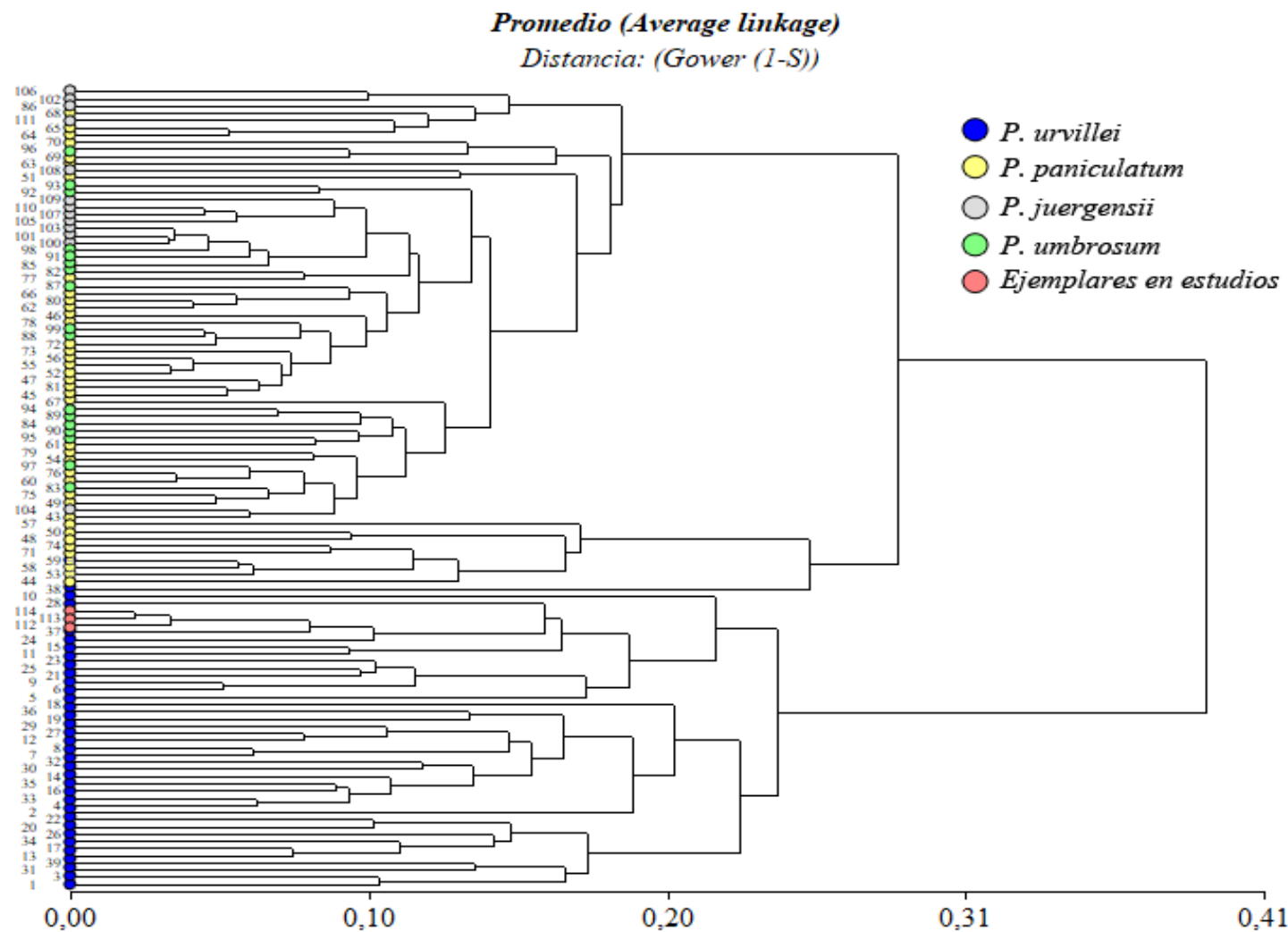
## ANEXOS

**Tabla suplementaria 1.** Autovectores para determinar la variable más importante sobre cada eje.

Variables	e1	e2
HI (cm)	0,3	0,26
L2V	0,32	-0,11
PV2 (mm)	0,12	-0,14
L2E	0,32	-0,13
PN2 (mm)	0,03	0,16
L2H (cm)	0,31	0,22
A2H (cm)	-0,04	0,65
LI (cm)	0,34	0,2
LRI (cm)	0,25	0,41
PR (mm)	0,26	0,03
LE (mm)	0,34	-0,19
AE (mm)	0,32	-0,2
PE2 (mm)	0,34	-0,27
LPPL (mm)	0,09	0,17



**Figura Suplementaria 1.** Análisis UPGMA por individuo con variables cuantitativas utilizando la distancia Euclídea.



**Figura Suplementaria 2.** Análisis UPGMA por individuo con variables cuantitativas y cualitativas utilizando la distancia de Gower.



**Tabla suplementaria 2.** Distancias de Gower (1-S) entre cada especie.

	<b>CZ1</b>	<i>P. juergensii</i>	<i>P. paniculatum</i>	<i>P. umbrosum</i>	<i>P. urvillei</i>
<b>CZ1</b>	0.00				
<i>P. juergensii</i>	0.55	0.00			
<i>P. paniculatum</i>	0.57	0.22	0.00		
<i>P. umbrosum</i>	0.63	0.23	0.17	0.00	
<i>P. urvillei</i>	<b>0.54</b>	0.72	0.61	0.69	0.00

Cuanto más cercano a cero, mayor similitud entre las especies.

**Tabla suplementaria 3.** Distancias Euclídeas entre cada especie.

	<b>CZ1</b>	<i>P. juergensii</i>	<i>P. paniculatum</i>	<i>P. umbrosum</i>	<i>P. urvillei</i>
<b>CZ1</b>	0.00				
<i>P. juergensii</i>	<b>4.72</b>	0.00			
<i>P. paniculatum</i>	5.35	3.53	0.00		
<i>P. umbrosum</i>	5.52	3.64	2.16	0.00	
<i>P. urvillei</i>	6.65	7.94	6.22	6.52	0.00

Cuanto más cercano a cero, mayor similitud entre las especies.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis hermanos, mamá y papá por ser mi sostén, por acompañarme, apoyarme y darme fuerzas todos estos años.

A mis sobrinos, que sin saberlo me motivaron a dar siempre lo mejor de mí.

A mis abuelos por hacer que los domingos lejos de casa se extrañen un poquito menos.

A la Oma, y su velita, que estoy segura que también fueron parte de este logro.

A mi directora, Verena, por su predisposición en ayudarme y enseñarme con tanta paciencia y dedicación.

A la Facultad y sus docentes que me permitieron formarme como Ingeniera Agrónoma.

A Griselda, que siempre estuvo ahí para darme una mano cuando la necesité sin importar la hora.

A Francisco y su familia por hacerme sentir una integrante más y ser de gran apoyo.

A mis amigos, a los de siempre por estar a lo largo de los años. A los que me dio la facultad, por hacer que las horas de estudio sean más llevaderas, y estos años más divertidos e inolvidables.

A todos ellos, muchísimas gracias.