



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

(Modalidad: Tesina)

**Generación de nuevos híbridos por
cruzamientos interespecíficos en el grupo
Plicatula del género *Paspalum*.**

Autor: Dellamea, Cinthia Vanina

Asesor: Ing. Agr. (Dr.) Espinoza, Francisco

Lugar de Trabajo: Cátedra de Genética, FCA – UNNE

Ciudad de Corrientes, República Argentina

2023

Índice:

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	4
3. Materiales y Métodos	5
3.1 Material vegetal	5
3.2 Cruzamiento y obtención de progenies	5
3.3 Determinación del origen híbrido	6
3.3.1 Marcadores moleculares	6
3.3.2 Caracterización morfológica	7
3.4 Análisis de meiosis	8
3.5 Determinación del modo reproductivo	8
3.5.1 Técnicas embriológicas	8
3.5.2 Citometría de flujo	9
3.6 Análisis de fertilidad	10
3.7 Análisis estadístico	11
4. Resultados y Discusión	12
4.1 Cruzamientos y obtención de las progenies	12
4.2 Identificación del origen híbrido	12
4.2.1 Marcadores moleculares RAPD	12
4.2.2 Caracterización morfológica	13
4.3 Análisis de meiosis	21
4.4 Determinación del modo reproductivo	22
4.5 Análisis de fertilidad	26
5. Conclusiones	27
6. Bibliografía	28

Resumen

El grupo Plicatula pertenece al género *Paspalum* y cuenta con unas 30 especies, caracterizadas por su alto valor forrajero en campos naturales. De la mayoría de estas especies se conocen citotipos tetraploides ($2n=4x=40$) apomícticos, existen algunos raros triploides y algunas especies presentan también diploides sexuales ($2n=2x=20$). No encontraron aún en la naturaleza, tetraploides sexuales; esto dificulta la hibridación a nivel $4x$ dentro del grupo. Sin embargo, por la duplicación cromosómica de especies diploides sexuales se pueden obtener tetraploides (autotetraploide) de reproducción sexual, lo que permite realizar cruzamientos a nivel tetraploide, utilizando como polinizadores a biotipos apomícticos. El objetivo de este trabajo fue obtener híbridos interespecíficos entre *P. chaceanum*, autotetraploide sexual de origen experimental, y *P. rojasii* (AK40732) y *P. plicatulum* (Hojas388), especies tetraploides apomícticas naturales, pertenecientes al grupo Plicatula. De los cruzamientos, se obtuvieron un total de 46 progenies (F_1), las cuales fueron caracterizadas genotípicamente por marcadores moleculares y fenotípicamente mediante caracterización morfológica para determinar el origen híbrido de las mismas. De este análisis, todos los individuos resultaron ser híbridos. Además, se analizó la configuración cromosómica de padres y progenies. De acuerdo a las asociaciones cromosómicas encontradas, existe cierto grado de homología entre los genomas de los parentales. Se estudió el modo reproductivo de las progenies por clarificado de ovarios y citometría de flujo, y la fertilidad por el porcentaje de espiguillas que producen granos en condiciones de autopolinización y polinización libre. Para el modo reproductivo, se pudo determinar que en las dos familias hubo segregación, observándose individuos de reproducción apomíctica e individuos de reproducción sexual en una proporción aproximada de 3:1. Los híbridos de ambas familias fueron fértiles, con una producción de semillas que osciló entre 0,05– 12% en autopolinización y entre 0,4 – 15,5% en polinización libre. Estos resultados indican que es posible la obtención de híbridos fértiles y que segregan para el modo reproductivo permitiendo liberar alelos fijados por la apomixis y lograr nuevas combinaciones genotípicas que pueden ser incorporadas al programa de mejora genética.

Palabras claves: gramíneas forrajeras; hibridación; apomixis.

1. Introducción

El género *Paspalum* L. comprende 311 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales a templadas de todo el mundo (Soreng et al., 2022). En el continente americano, principalmente en países como Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina, se encuentra la mayor diversidad del género; siendo el centro y oeste de Brasil, el este de Bolivia y Paraguay, su centro geográfico de variabilidad (Quarin et al., 1997). Presenta una gran adaptabilidad ecológica habitando diferentes ambientes, encontrándose a menudo como especie dominante en pantanos, sabanas y praderas; también se hallan en ambientes selváticos o boscosos y en dunas costeras y hábitats halófitos o anegados. Algunas especies se comportan como ruderales o malezas, encontrándose en bordes de caminos y suelos alterados. En lo que se refiere al rango altitudinal, la mayoría de los taxones crecen a bajas altitudes, pero algunos alcanzan hasta los 4600 msnm (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 (Quarin, 1992), lo cual ha tenido una gran influencia en la evolución y distribución del género (Bashaw et al., 1970).

Los estudios citológicos realizados para el género *Paspalum*, mostraron que la mayoría de las especies se caracterizan por tener un número básico de cromosomas de $x=10$ (Quarin, 1992). Sin embargo, se conocen especies con $x=6$ (Quarin, 1974) y con $x=9$ (Davidse&Pohl, 1974). Por el nivel de ploidía, las especies se pueden agrupar en taxones diploides ($2n=2x=20$), y poliploides de distintos niveles, mayoritariamente tetraploides ($2n=4x=40$); pero también hay taxones multiploides donde para una misma especie existen más de un nivel de ploidía (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013). La poliploidía en este género es una característica importante, ya que existe una gran diversidad intraespecífica e interespecífica de niveles de ploidía.

Los estudios embriológicos realizados dentro del género, revelaron que existen especies que se reproducen por sexualidad y otras por apomixis, incluso dentro de una misma especie coexisten citotipos sexuales y citotipos apomícticos (Quarin, 1992). La apomixis, es una forma de reproducción asexual a través de semillas donde los embriones son copias de la madre (Nogler, 1984). El tipo de apomixis que predomina en el género es la aposporía (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013). En general, la apomixis está asociada a la poliploidía, encontrándose especies que son diploides, de reproducción sexual y autoincompatible y especies o citotipospoliploides (principalmente tetraploides) que son apomícticos, seudógamos y autofértils (Ortiz et al., 2013; Acuña et al., 2019). La apomixis es un sistema reproductivo muy beneficioso para el desarrollo de cultivares ya que permite que una determinada combinación genotípica permanezca constante de generación en generación, garantizando la estabilidad genética de los mejores genotipos. El proceso de mejora de gramíneas apomícticas básicamente ha consistido en la colección y evaluación de germoplasma, selección y liberación de aquellos genotipos superiores como nuevos cultivares apomícticos. Sin embargo, el éxito de selección depende del grado de variación existente dentro de la especie (Vogel&Burson, 2004).

Dentro del género *Paspalum* existe un grupo importante de especies (aprox. 30) que se caracterizan por su valor como forrajeras en campos naturales y que fueron agrupadas por Chase (1929) bajo el nombre de grupo Plicatula. Este nombre, de categoría taxonómica informal y subgenérica, se debe a afinidades morfológicas que todas estas especies tienen con *P. plicatulum*, la especie representativa del grupo. La mayoría de estas especies son tetraploides y apomícticas. Mediante selección de genotipos con características agronómicas destacables fue posible la obtención y liberación en nuestro país y otros lugares del mundo de varios cultivares apomícticos de este grupo pertenecientes a las especies de *P. atratum*, *P. guenoarum*, *P. plicatulum*, entre otros (Oram, 1990; Urbani & Quarin, 2002; Evers&Burson, 2004).

Por otra parte, el mejoramiento genético mediante cruzamientos e hibridación no era posible sin la existencia de plantas tetraploides sexuales, en forma natural aún no fueron encontradas. No obstante, el grupo de investigación de Genética y Mejoramiento de Especies Forrajeras del Instituto de Botánica del Nordeste (CONICET-UNNE) ha conseguido, por colección propia o por intercambio de material con otros investigadores, razas diploides sexuales para algunas especies del grupo. Se ha logrado duplicar los cromosomas y obtener plantas tetraploides 100% sexuales (4xS) en *P. plicatulum* a partir de plantas diploides sexuales (Sartor et al., 2009). Esto ha posibilitado la realización de cruzamientos inter e intraespecíficos a nivel 4x dentro del grupo. Sin embargo, estas plantas tienen un periodo de floración muy corto, lo que dificulta realizar cruzamientos con especies que no florecen al mismo tiempo. Recientemente, han obtenido nuevos tetraploides inducidos, uno de ellos fue a partir de la especie 2x de *P. chaseanum* (Novo et al., 2023). La planta 4x que se obtuvo es 100% sexual y tiene un periodo de floración desde la primavera hasta el verano, lo que permitirá avanzar con la obtención de nuevos híbridos interespecíficos dentro del grupo Plicatula.

2. Objetivos

2.1 General:

Obtener híbridos interespecíficos entre plantas autotetraploides sexuales de origen experimental y especies tetraploides apomícticas naturales, pertenecientes al grupo Plicatula del género *Paspalum*. Esto permitirá movilizar y recombinar genes que se encuentran fijados en las plantas apomícticas. La selección de híbridos conducirá al objetivo final que será la obtención de nuevos cultivares con características agronómicas superiores.

2.2 Específicos:

- Obtener híbridos mediante cruzamientos, usando como madre a la planta tetraploide sexual de *Paspalum chaseanum* (de origen experimental) y como padres a 2 especies tetraploides apomícticas naturales del grupo Plicatula.
- Determinar el sistema reproductivo, el grado de fertilidad y análisis de la meiosis de las familias F₁ que se obtengan.
- Seleccionar los híbridos apomícticos con aptitud forrajera mediante observaciones fenotípicas para su evaluación e incorporación al programa de mejoramiento genético del IBONE.

3. Materiales y Métodos

3.1 Material vegetal:

Para este estudio se utilizaron ejemplares de la planta 4xS de *Paspalum chaseanum* (Fig. 1a) que fue obtenida experimentalmente por duplicación cromosómica (Novo et al., 2023). Esta planta se caracteriza por un largo periodo de floración, desde la primavera hasta el otoño. Se utilizaron, además, 2 especies 4xA: *Paspalum rojasii*, accesión AK40732 (Fig. 1b), originaria de Vila Velha, Paraná, Brasil y *Paspalum plicatulum*, accesión Hojs388 (Fig. 1c), colectada en RN N°12 km 1066, San Cosme, Corrientes, Argentina. Encontrándose todas en el Banco de Germoplasma vivo, del área de Genética y Mejoramiento de especies forrajeras del



IBONE, en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

Fig.1: a- Ejemplar de *P. chaseanum* 4xS; b- Ejemplar de *P. rojasii* AK40732; c- Ejemplar de *P. plicatulum* Hojs388.

3.2 Cruzamientos y obtención de progenies:

Se realizaron cruzamientos interespecíficos utilizándose como parental femenino a *P. chaceanum* 4xS, y como parentales masculinos a dos especies 4xA: *P. rojasii*(AK40732) y *P. plicatulum*(Hoj388). Debido a la alta autoincompatibilidad de *P. chaceanum* 4xS, no se practicó la emasculación de las espiguillas.

Previamente al inicio de la antesis, las inflorescencias de la planta materna fueron aisladas con sobres de papel sulfito, para evitar la contaminación con polen extraño; después se recogió el polen del parental masculino y una vez producida la antesis de la planta madre se espolvoreo el polen sobre los estigmas, y se aisló nuevamente a la inflorescencia identificándola (etiqueta indicando el cruzamiento ♀×♂).Este procedimiento se repitió por 4 - 6 días, hasta que la inflorescencia de la planta madre completó la antesis de todas sus espiguillas. Las inflorescencias polinizadas 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 retirar las espiguillas de las inflorescencias manualmente y separar las llenas de las vacías mediante el uso de un soplador mecánico de semillas (SeedburoEquipment Company 1022W. Jackson Blvd.Chicago. IL 60607 1-800-284-5779).

Parte de las semillas obtenidas en cada cruzamiento fueron colocadas a germinar en bandejas plásticas con suelo estéril. Aproximadamente, un mes despuésde la germinación, las plántulas fueron repicadas a bandejasplásticas (speedling) y posteriormente llevadas a campo en parcelas ubicadas en la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

3.3 Determinación del origen híbrido:

El origen híbridode las progenies obtenidas se realizó mediante caracterización genotípica (marcadores moleculares)y fenotípica (caracteres morfológicos).

3.3.1 Marcadores moleculares:

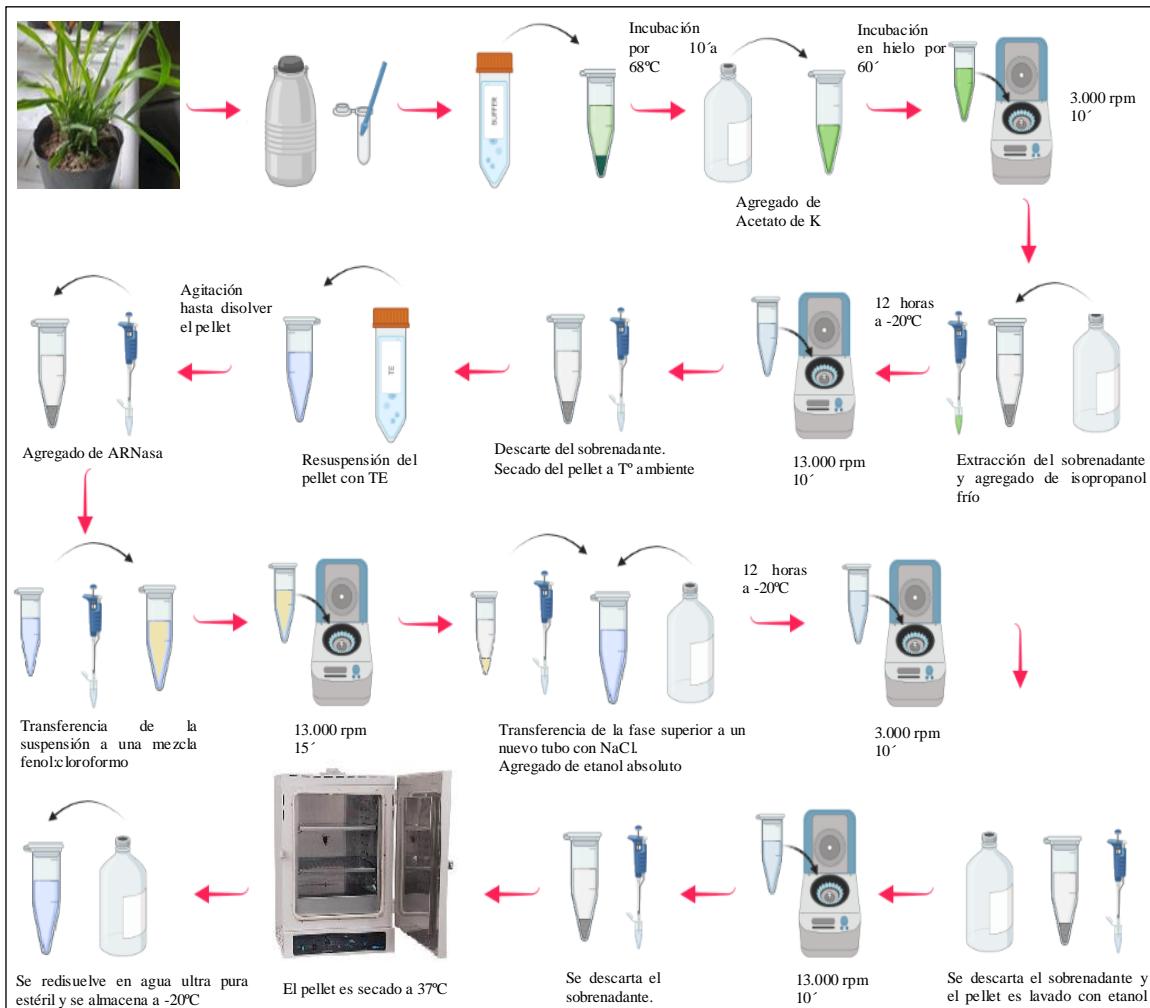
Se realizaron microextracciones de ADN genómico a partir de hojas jóvenes de las progenies y de sus parentales, siguiendo el protocolo descripto por Dellaporta et al. (1983). En la Figura 2 se detallan los pasos que se siguieron.

La concentración y calidad del ADN de cada una de las muestras se realizó mediante observación visual en geles de agarosa al 1%. La concentración se estimó por comparación con una muestra de concentración conocida y luego fueron llevadas a una concentración final de 0.3 µg/µl y conservadas a -20°C.

Se utilizó la técnica de RAPDs (RandomAmplifiedPolymorphic DNA), siguiendo la metodología descripta por Novo et al. (2016). Brevemente, las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, contenido 20 ng de ADN genómico, 15µM de cada dNTP's, 30 ng de cebador, 1 unidad de ADN polimerasa GoTaq (Promega) y 1X de "buffer" de la enzima. Se utilizó 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 horizontal con TAE 1X. Posteriormente los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml) durante aproximadamente 30 minutos y observados a través de un

transiluminador UV y registrados con un digitalizador de imagen (GelDoc Imaging System Ultraviolet Tranluminator BioImaging Systems).

Inicialmente se realizó un screening de cebadores de la Universidad de British Columbia (Vancouver, BC, Canadá) utilizando como molde para las amplificaciones por PCR al ADN de los parentales. Luego fueron seleccionados aquellos cebadores polimórficos y que amplificaban bandas exclusivas de los parentales masculinos. Estos primers fueron utilizados para seleccionar a las progenies,



considerándose como híbridos a aquellos individuos que al menos amplificaban una banda paterna.

Fig. 2: Esquema del proceso de extracción de ADN.

3.3.2 Caracterización fenotípica:

Para esta caracterización se consideraron los siguientes caracteres morfológicos (Fig. 3):

- Longitud del eje de la inflorescencia
- Número de racimos por inflorescencia.
- Longitud del racimo basal de la inflorescencia
- Longitud del racimo apical de la inflorescencia.
- Longitud de la lámina de la segunda hoja por debajo de la base de la inflorescencia.

- Ancho de la lámina de la segunda hoja por debajo de la base de la inflorescencia.

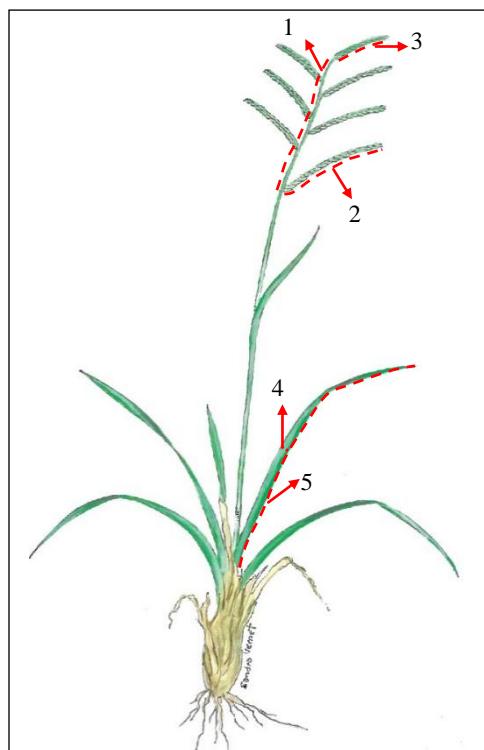


Fig.3: Ilustración de *P. plicatulum*, indicando las características evaluadas: 1-Longitud del eje de la inflorescencia; 2- Longitud del racimo basal; 3- Longitud del racimo apical; 4- Ancho de la lámina de la 2^{da} hoja; 5- Longitud de la lámina de la 2^{da} hoja.

Se tomaron datos en 3 inflorescencias por planta y se analizaron estadísticamente mediante el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

3.4 Análisis de meiosis:

El estudio de las meiosis se llevó a cabo en individuos (2-4) de las F₁, seleccionados al azar, y en el parental masculino (*P. plicatulum* Hojs388), aún no estudiado. Inflorescencias jóvenes fueron fijadas en una solución 5:1 (v/v) de etanol absoluto:ácido láctico durante 24 horas y luego fueron conservadas en etanol al 70% a 4°C. Posteriormente se prosiguió a la separación de las espiguillas de la inflorescencia y la extracción de las anteras, las que fueron colocadas y aplastadas sobre un portaobjetos con una gota de carmín acético al 2%. El preparado fue cubierto con un cubreobjetos y la observación se realizó con un microscopio óptico LeicaLeitz DMRB. Los preparados donde se observaron células madres del polen (CMP) en división celular se hicieron permanentes con una solución de terpentina de Venecia (Wilson, 1945) para completar el análisis del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis.

3.5 Determinación del modo reproductivo:

La determinación del sistema reproductivo se realizó mediante 2 técnicas.

3.5.1 Técnicas embriológicas:

En estado de antesis, se fijaron inflorescencias en una solución de FAA (formaldehído, ácido acético glacial y etanol 70%, en una proporción de 1:1:18 v/v) por 24 horas y luego fueron conservadas en etanol 70%. Para su análisis, se diseccionaron las espiguillas separando a los ovarios, quienes fueron clarificados siguiendo la técnica descripta por Young et al. (1979). Los pistilos clarificados fueron montados sobre un portaobjeto con la colocación de un cubreobjeto encima de ellos, para luego ser observados bajo un microscopio de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC), (Leica DM2500).

3.5.2 Citometría de flujo:

Se estimó el contenido relativo de ADN en células del embrión y del endospermo, en semillas maduras de los individuos de las F₁ y sus progenitores masculinos, por citometría de flujo utilizando un citómetro (SysmexCyFlow® Space, Görlitz, Germany), según la metodología descripta por Matzk et al. (2000).

Aquellas semillas que tuvieron una relación embrión:endospermo de contenido de ADN de 2C:3C son consideradas de origen sexual, indicando el 2C al embrión 2n producto de la fecundación de una ovocélula reducida (n) por un núcleo espermático reducido (n) y el 3C al endospermo 3n originado en un segundo evento de fecundación que involucró la fusión de los dos núcleos polares reducidos (n + n) con el otro núcleo espermático (n) del tubo polínico (Fig. 4). En cambio, las semillas con una relación de contenido de ADN embrión:endospermo de 2C:5C son consideradas de origen apomíctico, es decir, se formaron por un proceso de aposporia, seguido de partenogénesis y pseudogamia. El valor 2C corresponde al embrión 2n originado por partenogénesis de la ovocélula no reducida de un saco embrionario apospórico; y el contenido 5C corresponde al endospermo 5n que surgió de un proceso pseudogámico, en el mismo saco, por la fecundación de los dos núcleos polares no reducidos (2n + 2n) con un gameto masculino reducido (n) aportado por el polen (Fig. 4). Con base a esto, los individuos fueron clasificados como sexuales, cuando todas las semillas analizadas tuvieron una relación 2C:3C; apomícticos si todas las semillas tuvieron una relación 2C:5C; y apomícticos facultativos cuando tuvieron algunas semillas con relación 2C:3C y otras con 2C:5C.

Para cada individuo se analizaron 10 cariopsis, en grupos (“bulks”) de 2 cariopsis, que fueron seccionados con una hoja de afeitar en 0,5 ml de “buffer” para extracción nuclear, dejando incubar durante 2 minutos. La solución fue filtrada con un filtro de 30µm y transferida a un tubo donde se le adicionó 1,5 ml del “buffer” de tinción fluorescente 4α6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Ambos “buffers”, de extracción y tinción, son parte de un kit comercial CyStain UV Precise P Sysmex, Görlitz, Germany. Una vez logradas las suspensiones son pasadas a través del citómetro de flujo donde fueron analizadas en tiempo real mediante el software FloMax, el cual genera histogramas con los datos de las muestras (Fig. 5).

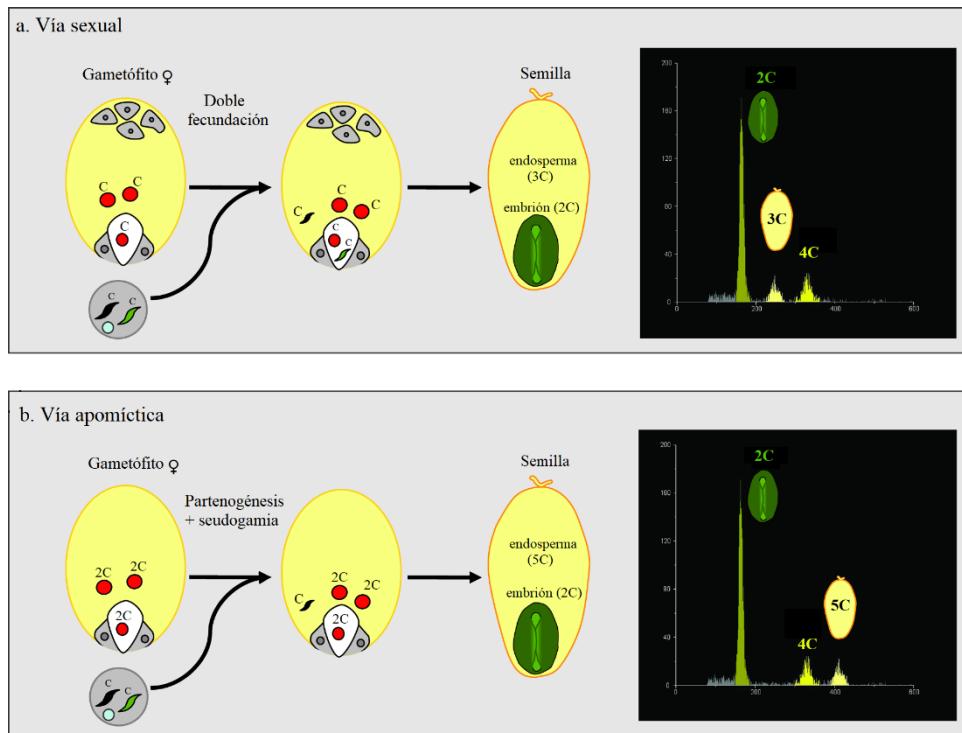


Fig. 4: Representación esquemática de las vías reproductivas que pueden tener los individuos analizados. En la izquierda de la figura se encuentra esquematizado el proceso de doble fertilización, si es sexual, y partenogénesis + seudogamia, si es apomíctico. En la derecha están los histogramas arrojados por el citómetro observándose para la vía sexual dos picos principales: 2C (embrión) y 3C (endospermo), con posibles picos secundarios en 4C (embrión) y 6C (endospermo) correspondiente a células en la fase G2 de la mitosis; para la vía apomíctica, tenemos a los picos principales 2C (embrión) y 5C (endospermo), con posibles picos secundarios en 4C y 10C. Tener la consideración que estos valores corresponden a un citotipo diploide. (Adaptado de “Durchflusszytometrie. Anwendung in der Pflanzen-Reproduktionsbiologie” (p. 34), por Hojsgaard & Herbig, 2014, LABO, 3).

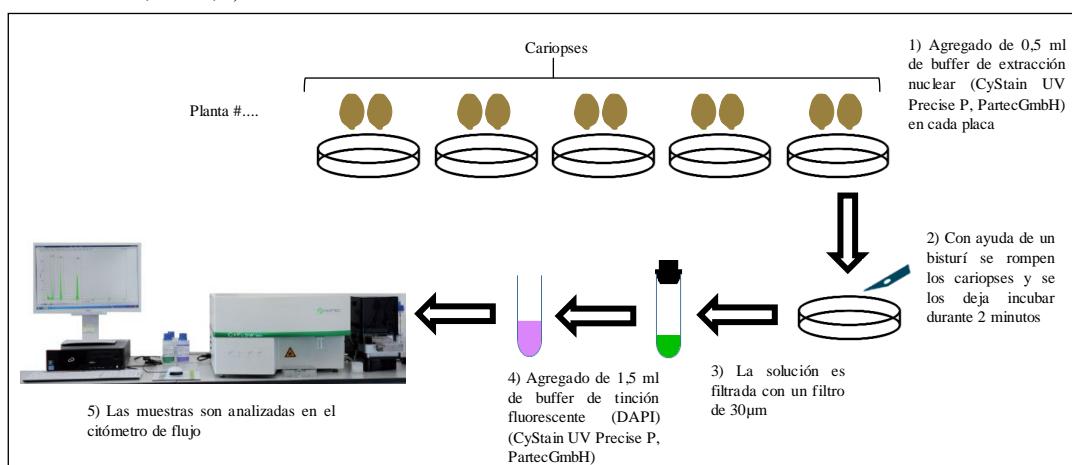


Fig.5: Procesamiento de cariopses para análisis en citómetro de flujo.

3.6 Análisis de fertilidad:

El estudio de fertilidad se realizó en todos los progenitores y en algunos individuos de las F₁ obtenidas, elegidos al azar; considerando el porcentaje de espiguillas que produjeron granos en condiciones de autopolinización y polinización libre, siguiendo la metodología usada por Novo et al. (2016). Para ambas situaciones se ensobraron 3 inflorescencias de cada planta, con sobres de papel sulfito (Fig. 6), en 2 años consecutivos. Para autopolinización, se ensobró unos días antes del inicio de la antesis, para prevenir el ingreso de polen extraño y así obligar a las espiguillas a

autopolinizarse. En cambio, en 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, unos 30 días aproximadamente. Luego, se recolectaron los sobres y fueron llevados a estufa a 37°C durante 24 horas. Se retiraron manualmente las espiguillas de las inflorescencias; posteriormente, por medio de un soplador mecánico de semillas (SeedburoEquipment Company 1022W. Jackson Blvd.Chicago. IL 60607 1-800-284-5779)(Fig. 7), se apartaron las llenas de las vacías y se procedió al recuento.



Fig. 6: Individuo con inflorescencias ensobradas. **Fig.7:** Soplador de semillas



3.7 Análisis estadístico:

En la caracterización morfológica de las muestras de las progenies y sus respectivos progenitores se obtuvo una base de datos, conformada por las observaciones resultantes de varias variables dependientes. Teniendo en cuenta que estas variables están interrelacionadas, por lo que tienen información en común, previa estandarización de los datos se procedió a aplicar la técnica estadística de Análisis de Componentes Principales (ACP). El análisis consiste en extraer la información importante que posee una base de datos, representándola en un nuevo conjunto de variables ortogonales llamadas componentes principales. Estos componentes no están correlacionados entre sí (no hay repetición de la información), por lo tanto, se interpretan independientemente unos de otros, y cada uno de ellos contiene una parte de la variabilidad total de las observaciones originales. Cada componente contiene información de todas las variables, pero en diferentes proporciones, para saber cuánto de la variable “x” es explicada por el componente “y” tenemos que tener en cuenta el coeficiente de correlación de Pearson, sean estos positivos o negativos, entre la variable original de la base de datos y el componente principal en cuestión (Palacio et al., 2020). Otra técnica que se utilizó fue el Análisis de Conglomerados o Análisis Clúster tipo UPGMA (unweightedpairgroup arithmeticaveragemethod), con encadenamiento promedio y distancia Euclidea. Este es un estudio exploratorio, descriptivo, que busca agrupar elementos (o variables) tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos (Balzarini et al., 2015). Finalmente se practicó un Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA) que permitió comparar a los individuos, teniendo en cuenta todas las variables en simultáneo. Todos los análisis se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

4. Resultados y Discusión:

4.1 Cruzamientos y obtención de las progenies:

En el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* 4xA se polinizaron 1485 espiguillas y se obtuvieron 145 semillas llenas, lo que representa una producción aproximada del 10%. Se sembraron 60 semillas y se lograron 36 plántulas (60% de poder germinativo); las que luego fueron trasplantadas a bandejas plásticas (speedling) en espera a ser llevadas a campo a mediados de noviembre. De estos individuos sobrevivieron solamente 34 plantas (Fig. 8).

Para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* 4xA se polinizaron 639 espiguillas y se obtuvieron 124 semillas llenas, lo que representa una producción del 19% aproximadamente. De estas se sembraron 41 semillas, germinaron 11 (27%



de poder germinativo) y 9 de estas plantas lograron ser llevadas a campo (Fig. 8).

Fig. 8: a- Progenies en el campo; b- Híbrido de *P. rojasii* AK40732; c- Híbrido de *P. plicatulum* Hojs388

Se puede observar que es posible obtener híbridos interespecíficos, siendo la fertilidad semejante a los resultados de otros cruzamientos obtenidos por Novo et al. (2023). Estos resultados también son similares a los obtenidos con otra planta 4x sexual de origen experimental del grupo Plicatula (*P. plicatulum*, 4PT) en diferentes cruzamientos (Novo et al., 2014; 2016; 2017; Novo, 2020; Lutz, 2020.; Villalba, 2022). Estos resultados indican que es posible hibridar y obtener híbridos con nuevas combinaciones genotípicas.

4.2 Identificación del origen híbrido:

4.2.1 Marcadores moleculares RAPD:

El análisis con marcadores moleculares RAPD fue realizado en los parentales y en las progenies completas: 34 F₁ para el cruzamiento con *P. rojasii* 4xA y 10 F₁ para el cruzamiento con *P. plicatulum* 4xA.

Se realizó el “screening” con los parentales utilizando 13 cebadores, con el propósito de seleccionar aquellos que amplificaban fragmentos polimórficos y bandas específicas de los progenitores masculinos, siendo finalmente seleccionados 3 primers para cada familia. Para las F₁ obtenidas con el progenitor *P. rojasii* 4xA los cebadores seleccionados fueron: UBC709, UBC751, UBC790; y para el progenitor *P. plicatulum* 4xA fueron: UBC434, UBC709, UBC751.

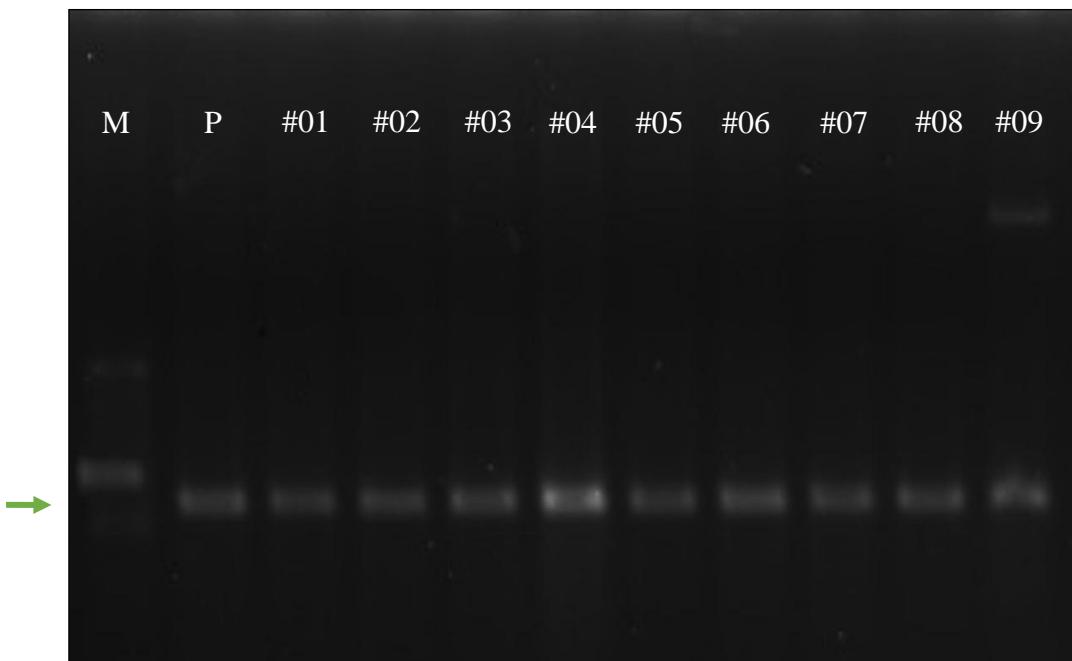


Fig. 9: Producto de amplificación de la población F₁ lograda por el cruzamiento entre *P. chaceanum* 4xS (M) y *P. plicatulum* Hojs388 (P) con el primer UBC434. La flecha indica el fragmento específico del padre (P) y en todas las F₁.

En la Figura 9 se observan los resultados obtenidos de las amplificaciones de los parentales y de las progenies con uno de los primers seleccionados para la familia de *P. plicatulum* Hojs388. Se observa claramente que todas las progenies de este cruzamiento amplificaron la banda paterna. Esto indica que los mismos se originaron por hibridación. De esta manera se logró identificar que todas las F₁ de ambos cruzamientos resultaron ser híbrido.

4.2.2 Caracterización morfológica:

El análisis de características fenotípicas de los híbridos y de los parentales nos provee de datos concretos que describen rasgos morfológicos, los cuales se comparan para identificar características paternas en las F₁, verificando así su origen híbrido. Por otra parte, además de comprobar el origen híbrido de las F₁, agrupamos a los híbridos semejantes, evaluamos la variabilidad aportada por cada característica morfológica estudiada, caracterizamos a los híbridos y concluimos con una selección preliminar de híbridos con cualidades superiores a los parentales.

Se registraron observaciones de ambas poblaciones, parentales (*P. chaceanum* 4xS, AK40732, Hojs388) y F₁. Para la progenie de *P. rojasii* AK40732 se tomó una muestra aleatoria de 10 individuos (híbrido #02, #03, #04, #07, #08, #10, #21, #23, #30, #32), y para la progenie de *P. plicatulum* Hojs388 la muestra fue de 6 individuos

(híbrido #01, #02, #05, #06, #07, #08); por cada plantase analizaron 3 inflorescencias con sus respectivas hojas (Tabla 1; Tabla 2).

Tabla 1: Características morfológicas del parental femenino *P. chaseanum* 4xS, parental masculino *P. rojasii* AK40732, y 10 individuos de su progenie.

Individuo	Ejemplar	Long. inflorescencia (cm)	Nº racimos	Long. racimo basal (cm)	Long. racimo apical (cm)	Long. hoja (cm)	Ancho hoja (mm)
<i>Paspalum chaseanum</i> 4xS	1	14,1	8	10,1	6	21	12
	2	15	10	12,3	3,4	16,3	9
	3	11,2	10	10,4	4,3	4,9	4
<i>Paspalum rojasii</i> AK40732	1	4,3	2	12,5	12,1	13,2	7
	2	7,2	3	9,6	7,1	5,5	6
	3	6,6	3	11,2	8,4	6,3	6
# 02	1	10,6	5	14	12,5	12,3	8
	2	15,2	6	11,5	9	33	15
	3	12,3	5	14,3	12,7	13,5	8
# 03	1	13,9	7	17,2	13,8	2,7	3
	2	18,2	9	16,3	10,2	14,4	10
	3	14,5	7	18,9	13,3	19,3	12
# 04	1	17,2	9	15	6	10,2	7
	2	11,8	5	17,3	12,2	22	12
	3	10,9	4	17,2	14,2	10,1	7
# 07	1	15	8	14,3	7,8	17,5	9
	2	13,8	7	14,2	9,5	4,5	4
	3	14,8	7	13,3	10,8	16,6	9
# 08	1	10,5	5	16	12,4	2,6	4
	2	10,4	5	13,8	10,8	16,8	12
	3	12	5	13,4	9	8,3	7
# 10	1	11,5	5	14,1	12,8	23,2	11
	2	18	14	8	6,8	23	11
	3	14,3	7	17,7	8	17,4	9
# 21	1	16,8	8	14,9	11,9	12,6	8,5
	2	15,1	8	16,1	12,2	28,3	13
	3	15,5	8	14,6	9,7	14,2	12
# 23	1	15	5	13,5	8,5	11,5	7
	2	14,8	5	16,8	8,5	6,2	5
	3	12,7	4	15,6	11,9	9,8	6
# 30	1	12,5	5	12	10,8	6,2	5
	2	10	4	13,5	10,8	9,6	6
	3	11,8	5	13,7	10	14,7	9
# 32	1	14	5	16,3	12,2	9	6
	2	13,8	5	16,3	13,8	17,7	9
	3	13,5	5	19,2	12,2	8,5	5

Tabla 2: Características morfológicas del parental masculino *P. plicatulum* Hojs388, y 6 individuos de su progenie.

Individuo	Ejemplar	Long. inflorescencia (cm)	Nº racimos	Long. racimo basal (cm)	Long. racimo apical (cm)	Long. hoja (cm)	Ancho hoja (mm)
<i>Paspalum plicatulum</i> Hojs388	1	16,7	8	10,2	4,8	10,3	5
	2	19	10	9,2	4,5	18,4	7
	3	15	8	10	7,1	25,3	9
# 01	1	19,5	14	11,1	3,5	9	7
	2	18,2	10	12,6	8,1	14,8	10
	3	19,5	11	12,2	5	9,3	5,5
# 02	1	18,2	11	9,4	5,2	29,7	10
	2	22,3	17	12,5	1,5	22,7	10
	3	19,5	11	10,2	5,2	26	8
# 05	1	15	9	9,5	5,6	13,2	8
	2	12,5	7	11,2	9	18	10
	3	15	8	10,7	7	10	5
# 06	1	18,1	8	11,8	7,4	18,5	10
	2	18,3	11	7,5	5,5	6,2	5
	3	15,8	9	12	8,1	9,8	7
# 07	1	18,3	9	11,4	7,9	12,6	8
	2	17,5	8	11,6	9,3	6,6	5
	3	18,3	8	11,5	9,1	7,5	4,5
# 08	1	19,5	10	10,5	2,3	18,5	10
	2	20,8	18	10	7	22	7
	3	22	18	9,7	5	21,8	11

Los análisis de componentes principales están indicados en las Figuras 10 y 11 para ambas poblaciones.

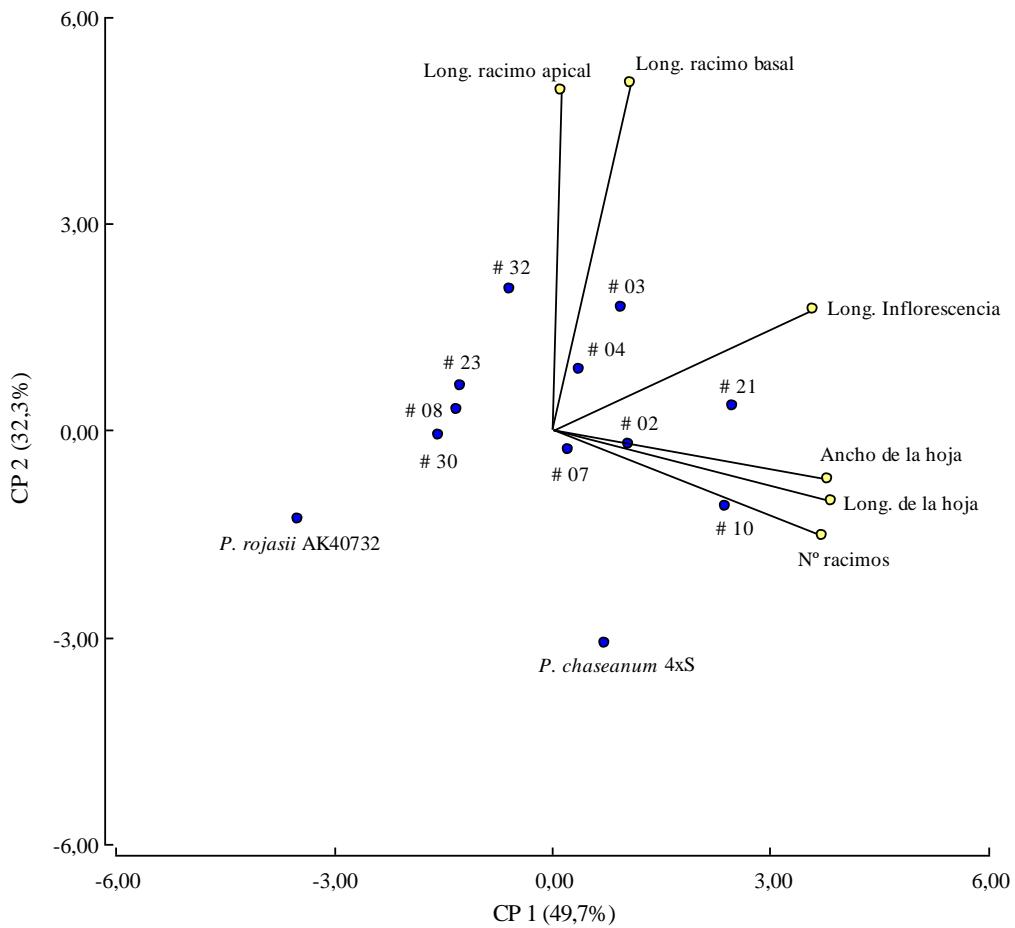


Fig. 10: Análisis de Componentes Principales para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732.

Tabla 3: Correlaciones entre las variables originales y los componentes principales generados en el ACP del cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732.

Variables	CP1	CP2
Long. racimo basal	0,25	0,93
Long. racimo apical	0,03	0,91
Ancho de la hoja	0,87	- 0,13
Long. de la hoja	0,88	- 0,19
Long. Infl.	0,82	0,32
Nº racimo	0,85	- 0,28

Notas:en color rojo las que mayoritariamente se explican por CP1; en azul las que se explican por CP2.

En la Figura 10y la Tabla 3 se muestran los resultados para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732 donde la CP1 explicó un 49,7% de la variabilidad total y representó a las variables longitud de hoja, ancho de hoja, número de racimos, y longitud de inflorescencia; y la CP2 explicó un 32,3% representando a las variables longitud de racimo basal y apical. De esto se interpreta que la longitud y ancho de la segunda hoja por debajo de la inflorescencia, el número de racimos y la longitud de la inflorescencia son las características morfológicas con mayor variabilidad en los parentales y en la descendencia.

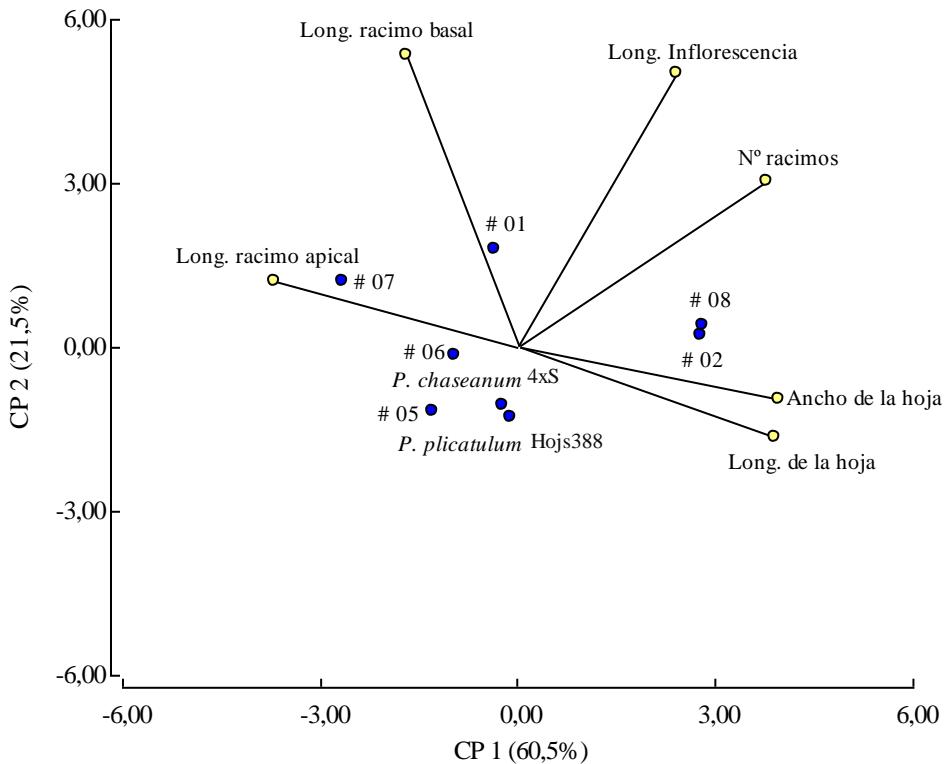


Fig. 11: Análisis de Componentes Principales para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388.

Tabla 4: Correlaciones entre las variables originales y los componentes principales generados en el ACP del cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388.

Variables	CP1	CP2
Long. racimo basal	- 0,39	0,73
Long. racimo apical	- 0,86	0,17
Ancho de la hoja	0,92	- 0,13
Long. de la hoja	0,91	- 0,23
Long. Infl.	0,56	0,69
Nº racimo	0,88	0,42

Notas: en color rojo las que mayoritariamente se explican por CP1; en azul las que se explican por CP2.

Los resultados para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388 se observan en la Figura 11 y la Tabla 4. Aquí el CP1 explicó un 60,5% de la variabilidad total y representó a las variables longitud de hoja, ancho de hoja, número de racimos y longitud de racimo apical; mientras que la CP2 explicó un 21,5% representando a las variables longitud de racimo basal y longitud de inflorescencia. Además, longitud de racimo apical tiene una gran importancia en la CP1, pero es opuesta al número de racimos, longitud y ancho de hoja. De esto se concluye que las variables longitud y ancho de la segunda hoja por debajo de la inflorescencia, el número de racimos y la longitud del racimo apical son las que mayor heterogeneidad aportaron; y al mismo tiempo, por ser una de ellas contraria a las demás, no será posible encontrar un híbrido superior en todos los caracteres.

En el análisis por conglomerados, para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732 se conformaron 5 grupos con individuos que presentaron mayor similitud entre sí, y dichos grupos coincidían total o parcialmente con los grupos formados en el ACP (Fig. 12).

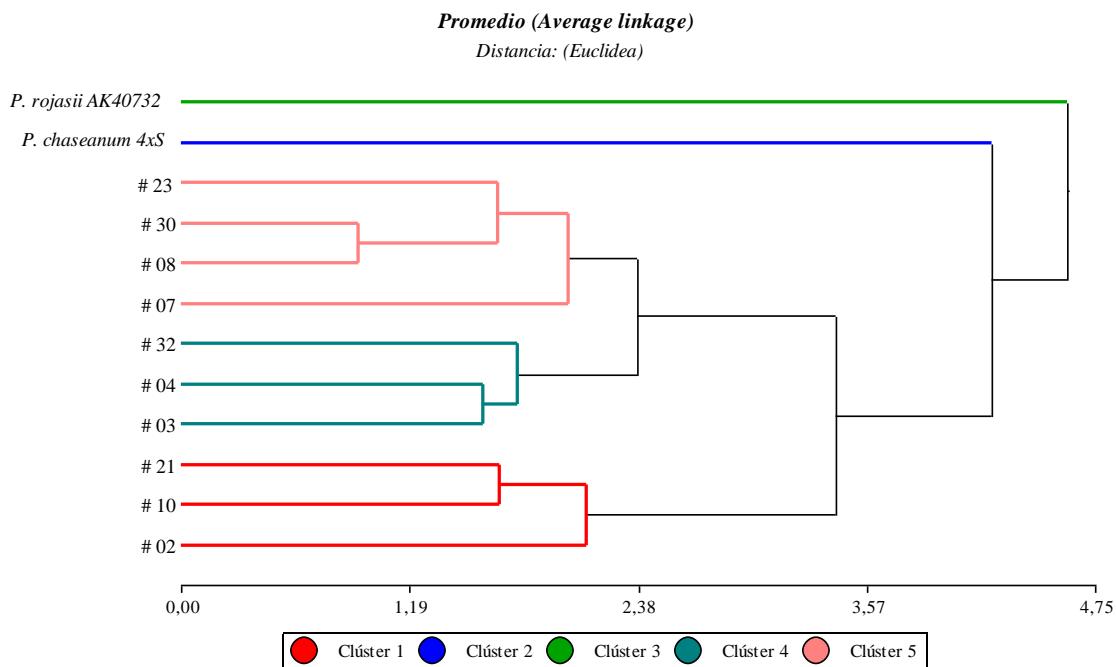


Fig. 12: Dendrograma del análisis de conglomerados para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732.

Tabla 5: Valores promedio para cada variable por clúster, del análisis de conglomerados para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732

Clúster	Indi ^{4xS} uo	Long. Infl. (cm)	Long. racimo basal (cm)	Long. racimo apical (cm)	Ancho de la hoja (mm)	Long. de la hoja (cm)	Nº racimos
1	#02						
	#10	14,37	13,91	10,62	10,67	19,72	7,33
	#21						
2	♀	13,43	10,93	4,57	8,33	14,07	9,33
3	♂	6,03	11,10	9,20	6,33	8,33	2,67
4	#03						
	#04	14,20	17,08	11,99	7,89	12,66	6,22
	#32						
5	#07						
	#08						
	#23	12,78	14,18	10,07	6,92	10,36	5,42
	#30						

Notas: ♀: madre; ♂: padre

Además, caracterizamos a el clúster 1 (híbrido #02, #10, #21) como aquel que superaba a los parentales en 5 de las 6 variables analizadas, siendo el número de racimos la única donde la madre destacaba por encima de todos los individuos. A su vez, el clúster 3 que corresponde al parental masculino, se caracteriza por tener valores por debajo del clúster 2 que es el parental femenino, en 4 de las 6 variables analizadas, siendo longitud de racimo basal y apical las variables donde el padre presenta valores por encima de la madre. Mientras que el clúster 4 (híbrido #03, #04, #32) presenta los valores más altos para longitud de racimo basal y longitud de racimo apical y el clúster 5 (híbrido #07, #08, #23, #30) tiene valores medios entre ambos parentales para la mayoría de las variables, siendo la longitud del racimo basal y apical los caracteres con valores superiores a los padres (Tabla 5).

Para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388, en el análisis de conglomerados se conformaron 3 grupos que coinciden con lo expuesto en el ACP (Fig. 13).

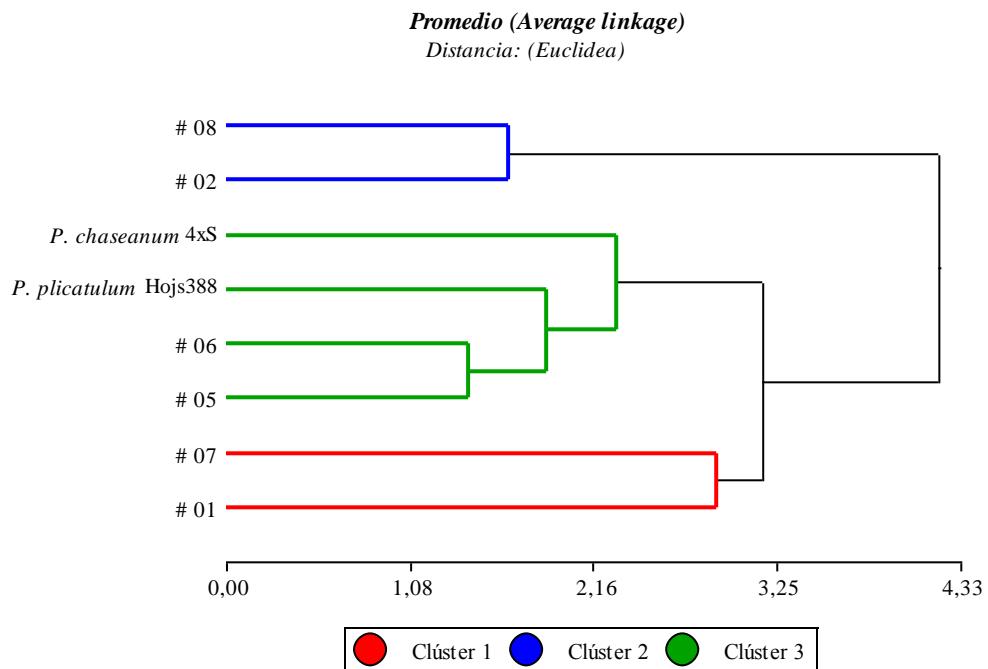


Fig. 13: Dendrograma del análisis de conglomerados para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388.

Tabla 6: Valores promedio para cada variable por clúster, del análisis de conglomerados para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388.

Clúster	Individuo	Long. Infl. (cm)	Long. racimo basal (cm)	Long. racimo apical (cm)	Ancho de la hoja (mm)	Long. de la hoja (cm)	Nº racimos
1	# 01	18,55	11,73	7,15	6,67	9,97	10,00
	# 07						
2	# 02	20,38	10,38	4,37	9,33	23,45	14,17
	# 08						
3	♀						
	♂						
	# 05	15,48	10,41	6,06	7,58	14,33	8,83
	# 06						

Notas: ♀: madre; ♂: padre

En lo que respecta a características analizadas, los híbridos #01 y #07 (clúster 1) tienen la mayor longitud de racimo basal y racimo apical, teniendo en los caracteres restantes valores intermedios a los padres y los otros híbridos; los híbridos #02 y #08 (clúster 2) presentaron las inflorescencias con mayor longitud y mayor número de racimos, y las hojas más anchas y largas. Los híbridos #05 y #06 junto a los progenitores (clúster 3) son los que tuvieron las inflorescencias más cortas y con el menor número de racimos (Tabla 6).

En el análisis MANOVA, se corroboraron las diferencias expuestas en el ACP y el Análisis Clúster. Finalmente evaluando su fenotipo completo se logró indicar los híbridos que difieren estadísticamente entre sí y con sus parentales (Tablas 7 y 8), y a su vez, seleccionar aquellos que presentan mejor performance.

Tabla 7: MANOVA del cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732.

Individuo	Long Infl (cm)	Nº racimos	Long racimo basal (cm)	Long racimo apical (cm)	Ancho de la hoja (mm)	Long de la hoja (cm)	
<i>P. chaseanum</i> 4xS	13,43	9,33	10,93	4,57	8,33	14,07	A
<i>P. rojasii</i> AK 40732	6,03	2,67	11,10	9,20	6,33	8,33	B
#21	15,80	8,00	15,20	11,27	11,17	18,37	C D
#03	15,53	7,67	17,47	12,43	8,33	12,13	C
#04	13,30	6,00	16,50	10,80	8,67	14,10	D E
#32	13,77	5,00	17,27	12,73	6,67	11,73	D
#07	14,53	7,33	13,93	9,37	7,33	12,87	E F G
#02	12,70	5,33	13,27	11,40	10,33	19,60	E F G
#10	14,60	8,67	13,27	9,20	10,33	21,20	E
#30	11,43	4,67	13,07	10,53	6,67	10,17	F G
#08	10,97	5,00	14,40	10,73	7,67	9,23	F
#23	14,17	4,67	15,30	9,63	6,00	9,17	G

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 8: MANOVA del cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388.

Individuo	Long Infl (cm)	Nº racimos	Long racimo basal (cm)	Long racimo apical (cm)	Ancho de la hoja (mm)	Long de la hoja (cm)	
<i>P. chaseanum</i> 4xS	13,43	9,33	10,93	4,57	8,33	14,07	A
<i>P. plicatulum</i> Hojs388	16,90	8,67	9,80	5,47	7,00	18,00	D
# 05	14,17	8,00	10,47	7,20	7,67	13,73	A E
# 01	19,07	11,67	11,97	5,53	7,50	11,03	B C E
# 08	20,77	15,33	10,07	4,77	9,33	20,77	B D
# 06	17,40	9,33	10,43	7,00	7,33	11,50	C E
# 07	18,03	8,33	11,50	8,77	5,83	8,90	C
# 02	20,00	13,00	10,70	3,97	9,33	26,13	D

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Todos los híbridos de *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732 mejoraron respecto a los valores bajos del padre en las 6 variables bajo estudio y 4 híbridos (#02, #03, #10 y #21) igualaron o superaron a la madre en sus valores de longitud de hoja, ancho de hoja, número de racimos, y longitud de inflorescencia, siendo los híbridos #03, #10 y #21 seleccionados para continuar con el proceso de mejora, los dos últimos por ser los que presentaron mejor performance absoluta de longitud de hoja, ancho de hoja, número de racimos, y longitud de inflorescencia y #03 que a pesar de presentar valores similares a la madre en estas variables se destacó por mayor longitud de racimo basal y apical.

En cuanto a la progenie de *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388, como se mencionó en el ACP, no se va encontrar un híbrido superior en todas las variables. Pero los híbridos #02 y #08 se seleccionan por su superioridad en número de racimos, ancho y longitud de la hoja, a pesar de tener menor longitud de racimo apical que los parentales; y el híbrido #01 por presentar mayor longitud de inflorescencia y racimo basal.

En general se observó variación fenotípica entre los miembros de las progenies, y de éstos con los padres. Todas las F_1 presentan alguna característica paterna querevela su origen híbrido, no solo alguna de las evaluadas sino cualquier

otra que con una simple observación visual indique la influencia paterna. Cabe destacar que este comportamiento es similar a lo evaluado en otros cruzamientos realizados dentro del grupo Plicatula (Aguilera et al., 2011; Novo, 2016).

Además, observamos que de acuerdo a estas características morfológicas los padres no son estadísticamente iguales, lo que presupone una posible gran variabilidad entre la descendencia.

4.3 Análisis de meiosis:

Las asociaciones cromosómicas en diacinesis y metafase I de la meiosis están indicadas en la Tabla 9.

Tabla 9: Promedio y rango de asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de *P. chaseanum* 4xS, *P. rojasii* AK40732 y híbridos.

Individuos	Nº de plantas	Nº de células	Promedio y rango () por célula madre del polen			
			I	II	III	IV
<i>P. chaseanum</i> 4xS ¹	1	129	3,18 (0 – 10)	16,43 (10 – 20)	0,11 (0 – 2)	0,91 (0 – 4)
<i>P. rojasii</i> 4xA AK40732 ²	1	32	1,1 (0 – 5)	12,1 (4 – 18)	0,1 (0 – 1)	3,3 (0 – 6)
Híbridos	4	33	2,30 (0 – 6)	17,82 (14 – 20)	0,00 (0 – 0)	0,52 (0 – 3)
<i>P. plicatulum</i> 4xA Hojjs388	1	44	0,95 (0 – 6)	18,84 (14 – 20)	0,00 (0 – 0)	0,34 (0 – 2)
Híbridos	2	43	4,44 (0 – 14)	17,07 (12 – 20)	0,07 (0 – 1)	0,30 (0 – 2)

P. plicatulum Hojs388, y en las F₁.

Notas: ¹Novo et. al, 2023. ²Novo et. al, 2019. I: univalentes; II: bivalentes; III: trivalentes; IV: tetravalentes

Para el parental masculino *P. plicatulum* Hojs388 se analizaron 44 CMP (Tabla 9), en las que predominaron las asociaciones cromosómicas del tipo bivalentes; en promedio se observaron 18,84 II (92%); 0,34 IV (3,4%) y 0,95 I (2,4%), semejante a lo estudiado por Novo et al. (2019) para este genotipo. Estos resultados sugieren que es una especie allotetraploide segmentaria o autotetraploide diploidizado.

En la progenie de *P. rojasii* AK40732 se analizaron un total de 33 CMP provenientes de 4 híbridos distintos (Tabla 9), observándose un promedio de 17,82 asociaciones II (89%); 2,3 I (5,75%) y 0,52 IV (5,2%), siendo clara la superioridad en bivalentes, lo que coincide en lo observado por Novo et al. (2019) para otros híbridos con el mismo parental masculino. De acuerdo a las asociaciones cromosómicas observadas en CMP de *P. rojasii* AK40732 y en CMP de su progenie, éste parental tiene un origen autotetraploide.

En la progenie de *P. plicatulum* Hojs388 se analizaron 43 CMP provenientes de 2 híbridos diferentes (Tabla 9), observándose un promedio de 17,07 asociaciones II (85%); 4,44 I (11%); 0,3 IV (3%) y 0,07 III (0,5%) (Fig. 14). La predominancia de bivalentes y por comparación de resultados con otros híbridos interespecíficos estudiados por Novo et al. (2019), podemos concluir que *P. chaseanum* 4xS, *P. rojasii* AK40732, y *P. plicatulum* Hojs388 comparten en gran medida el mismo genoma básico porque las asociaciones cromosómicas en los híbridos son semejantes a las especies parentales. Considerando las asociaciones observadas en las CMP del progenitor y de la progenie, donde la presencia de IV muestra homología entre los cromosomas que se combinan, pero al estar en mínima proporción e incluso por debajo de los I, se considera como una homología parcial y se concluye que *P. plicatulum* Hojs388 es un allotetraploide segmentario.

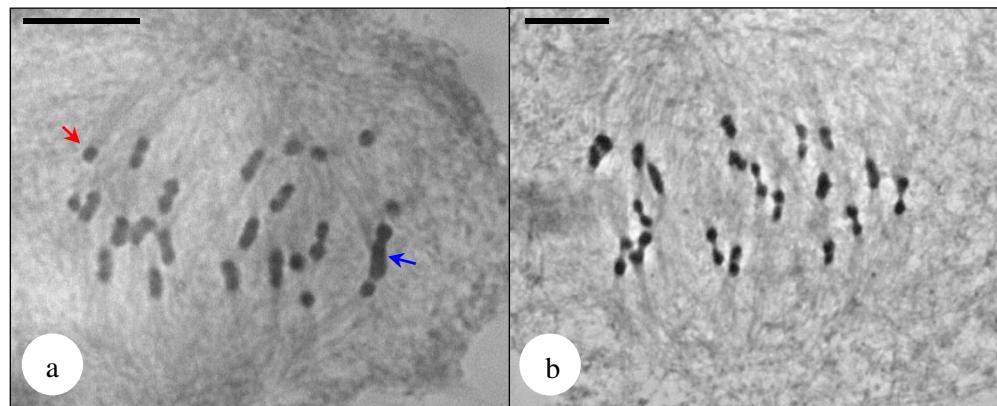


Fig. 14: Asociaciones cromosómicas en Metafase I de híbridos de *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388.
a. 9I (flecha roja), 14II, 1III (azul). b. 20II. Escala: 5μm

4.4 Determinación del modo reproductivo:

El modo reproductivo se determinó por 2 técnicas: por clarificado de ovarios y por citometría de flujo en semillas maduras (Fig. 15). Se estudiaron a los parentales masculinos *P. rojasii* AK40732 y *P. plicatulum* Hojs388, y a las progenies logradas.

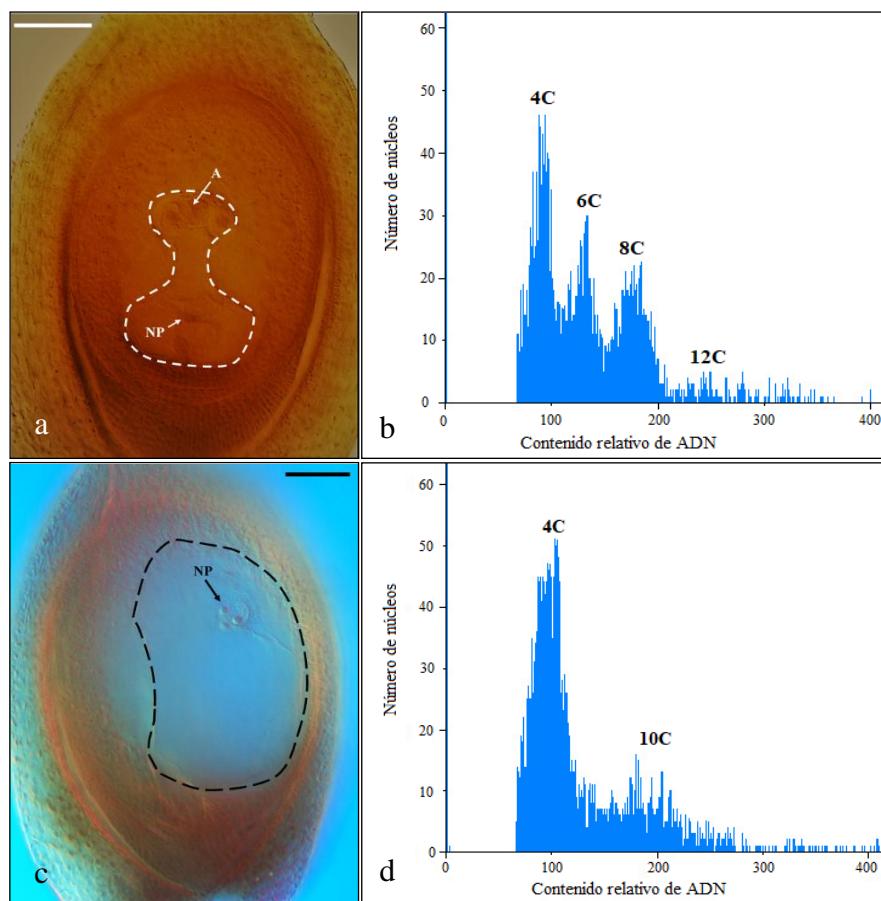


Fig.15: Análisis del modo reproductivo. a-Óvulo con saco embrionario meiótico; b- Histograma de contenido de ADN de semilla de un híbrido sexual, 4C corresponde al embrión y 6C al endospermo; c-Óvulo con saco embrionario apospórico; d- Histograma de un híbrido apomíctico, 4C corresponde al embrión y 10C al endospermo. A: antípodas, NP: núcleos polares. Escala: 50μm

En *P. rojasii* AK40732 se analizaron 125 ovarios y se observó un 73,6% de óvulos con un saco embrionario meiótico (SEM) tipo *Polygonum*, el que presenta en el extremo micropilar una oósfera bien definida y dos sinérgidas generalmente difíciles

de identificar al momento de la antesis porque ya desaparecen los nucléolos, una gran célula central con dos núcleos polares y muy vacuolizada, y una masa de células llamadas antípodas en el polo calazal (Fig. 15a). El 7,2% de óvulos presentaron uno o varios sacos embrionarios apospóricos (SEA) tipo *Paspalum*, los que se caracterizan por presentar una oósfera, dos núcleos polares, a veces una o dos sinérgidas cerca de la oósfera y ausencia de antípodas (Fig. 15c). También tenemos un 8,8% de óvulos mixtos (SEM+SEA), es decir, contenían un SEM más uno o más SEA; y el 10,4% restante contenía sacos anormales (inmaduros o abortados) (SEa/i) (Tabla 10). En el análisis por citometría de flujo realizado en 10 cariopses, no se observó ningún embrión de origen sexual, posiblemente por el reducido número de la muestra analizada (Tabla 10). Para el otro parental masculino, *P. plicatulum* Hojs388, los estudios embriológicos se realizaron en 115 ovarios; donde se observaron ovarios con diferentes tipos de sacos embrionarios (Tabla 10). Los análisis de citometría de flujo revelaron que este parental puede producir embriones por vía materna (apomixis) y por vía no materna (origen sexual), indicando que este genotipo también se reproduce por apomixis facultativa. Si bien el número de cariopses analizado es pequeño, estos resultados coinciden con lo expuesto por Galdeano et al. (2016) y Gonçalves (2019). Analizando los resultados observados por ambas técnicas, ambos parentales se reproducen por apomixis facultativa.

En la Tabla 10 se observa que para la progenie de *P. rojasii* AK40732 se estudiaron los 34 individuos por ambas técnicas. Considerando los resultados del análisis embriológico, 10 híbridos resultaron ser sexuales, aunque solo 2 de ellos (#18 y #22) fueron confirmados como tales por citometría de flujo. Los restantes individuos no pudieron ser analizados por no contar con semillas. Algunos de los híbridos clasificados como apomícticos facultativos por embriología, mostraron un origen sexual por citometría. Esto puede deberse al reducido número de cariopses analizados.

Para la progenie de *P. plicatulum* Hojs388 se estudiaron 9 individuos por el método citoembriológico, todos se reproducen por apomixis facultativa (Tabla 10). Los híbridos que se analizaron por citometría de flujo resultaron ser todos apomícticos facultativos, salvo el híbrido #2 que resultó ser de origen sexual, probablemente también sea debido al reducido número de cariopses analizados. Estos resultados indican que existe segregación para en modo reproductivo, observándose una proporción de (3,4:1) entre individuos apomícticos y sexuales para el cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. rojasii* AK40732. Estos resultados son similares a los observados para híbridos de otros cruzamientos dentro del grupo Plicatula (Novo et al., 2020). Esto, por un lado, permitió liberar combinaciones alélicas fijadas por la apomixis en *P. rojasii*, produciendo nuevos genotipos apomícticos con otras combinaciones alélicas. Por otro lado, la formación de híbridos 100% sexuales contribuiría a ampliar la base genética de la población sexual sintética existente para el grupo Plicatula (Novo et al., 2020). En cambio, en la progenie del cruzamiento *P. chaseanum* 4xS × *P. plicatulum* Hojs388, no se observó la presencia de híbridos 100% sexuales, resultados que difieren de los observados cuando utilizó como madre a otra planta 4xS (Novo et al., 2020).

Tabla 10: Modo reproductivo de *P. rojasii* AK40732, *P. plicatulum* Hojs388 y sus progenies. El modo reproductivo fue determinado por la técnica de clarificado de ovarios y citometría de flujo.

Individuos	Tipos de sacos embrionarios					Contenido de ADN del Embrión + (endospermo)			Modo reproductivo	
	Nº de ovarios	SEM (%)	SEA (%)	SEM + SEA (%)	SEa (%)	Nº de semillas	2C+(3C) (%)	2C+(5C) (%)	Emбриología	Citometría
Parentales										
<i>P. chaseanum</i> 4xS*+	120	89,17	0	0	10,83	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e
<i>P. rojasii</i> AK40732+	125	73,6	7,2	8,8	10,4	10	0	100	Ap. Fac.	Apo.
<i>P. plicatulum</i> Hojs388+	115	66,09	3,48	19,13	11,3	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
Híbridos										
#AK1**	202	63,37	1,98	3,47	31,19	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK2**	229	62,88	0,44	6,99	29,69	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK3*	110	92,73	0,00	0,91	6,36	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK4	116	86,21	0,00	0,00	13,79	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e.
#AK5	41	31,71	4,88	46,34	17,07	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK6	136	91,18	0,00	6,62	2,21	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK7	108	52,78	4,63	25,93	16,67	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK8***+	226	67,26	0,00	0,88	31,86	10	60	40	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK9***+	207	76,81	0,00	0,97	22,22	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK10	102	73,53	1,96	6,86	17,65	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK11	100	81,00	0,00	0,00	19,00	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e
#AK12+	102	82,35	0,00	0,00	17,65	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e
#AK13	102	90,20	0,98	0,00	8,82	10	90	10	Ap. Fac.	Sex.
#AK14	102	87,25	0,00	0,00	12,75	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e
#AK15	105	80,00	0,00	1,90	18,10	10	80	20	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK16	139	89,21	0,00	0,00	10,79	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e
#AK17**	214	62,62	0,47	3,74	33,18	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK18	126	79,37	0,00	0,00	20,63	10	100	0	Sex.	Sex.
#AK19	123	82,11	0,00	0,00	17,89	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e
#AK20	102	69,61	4,90	6,86	18,63	10	90	10	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK21+	113	65,49	7,96	0,88	25,66	10	50	50	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK22	102	85,29	0,00	0,00	14,71	10	100	0	Sex.	Sex.
#AK23+	110	85,45	0,00	0,00	14,55	n/e	n/e	n/e	Sex.	n/e.
#AK24	108	68,52	0,00	1,85	29,63	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK25**	215	70,70	0,00	2,33	26,98	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK26	102	64,71	0,00	3,92	31,37	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK27	107	73,83	0,93	22,43	2,80	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK28	107	70,09	1,87	26,17	1,87	10	50	50	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK29+	125	76,00	0,00	0,80	23,20	10	80	20	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK30	124	55,65	0,00	44,35	0,00	10	50	50	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK31**	204	73,04	0,00	1,47	25,49	10	90	10	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#AK32	104	68,27	0,96	1,92	28,85	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.

#AK33	104	83,65	0,00	1,92	14,42	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#AK34**+	204	74,02	0,00	1,47	24,51	10	30	50	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#H1 ⁺	126	46,03	3,97	37,30	12,70	10	30	70	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#H2 ⁺	119	47,06	9,24	35,29	8,40	10	100	0	Ap. Fac.	Sex.
#H3	128	31,25	18,75	34,38	15,63	10	60	40	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#H4	111	42,34	17,12	31,53	9,01	n/e	n/e	n/e	Ap. Fac.	n/e
#H5	144	46,53	3,47	46,53	3,47	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#H6 ⁺	114	63,16	7,02	17,54	12,28	10	70	30	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#H7 ⁺	113	63,72	0,88	32,74	2,65	10	50	50	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#H8 ⁺	113	35,40	12,39	40,71	11,50	10	10	90	Ap. Fac.	Ap. Fac.
#H9 ⁺	113	45,13	4,42	41,59	8,85	10	60	40	Ap. Fac.	Ap. Fac.

Notas: *Novo et al., 2023. **Híbridos evaluados dos años consecutivos (2022, 2023) por alto % de SEA. ⁺ Híbridos evaluados para fertilidad durante dos años consecutivos (2022, 2023)

Prefijo #AK: progenie de *P. rojasii* AK40732; #H: progenie de *P. plicatulum* Hojs388.SEM: sacos embrionarios meióticos; SEA: sacos embrionarios apospóricos; SEM+SEA: sacos embrionarios mixtos; SEa: sacos embrionarios anormales; n/e: no evaluado; Ap. Fac.: apomícticos facultativos; Apo.: apomícticos; Sex.: sexuales. Los híbridos en color rojo son sexuales por ambas técnicas, y en azul están los apomícticos facultativos. Los híbridos resaltados son los preseleccionados según observación morfológica.

4.5 Análisis de fertilidad:

La producción de semillas en autopolinización y polinización libre de los parentales y de los híbridos seleccionados están indicadas en la Tabla 11. El progenitor femenino (*P. chaseanum*) se comportó como autoincompatible, resultado similar a lo observado por Novo et al., (2023). Esto ha facilitado los cruzamientos evitando la emasculación de la planta madre. Si bien los parentales masculinos son autofértils, se observó una baja proporción de semillas llenas en *P. rojasii* AK40732 en ambas condiciones de polinización. Sin embargo, en algunos híbridos se observó un incremento sustancial en el llenado de semillas, sobretodo en polinización libre donde alcanzó al 15%. Esto indica que este carácter es posible de mejorar por selección de aquellos híbridos más fértiles. En los híbridos del cruzamiento *P. chaseanum × P. plicatulum* Hojs388 la producción de semillas en autopolinización osciló entre el 0,05 y 6,5% y en polinización libre entre el 0,4 y 15,5%, mostrando en todos los casos un menor porcentaje de llenado que el parental masculino. Estos resultados son esperables ya que se trata de híbridos interespecíficos. A pesar de esto, la obtención de híbridos fértiles permite liberar alelos fijados en los parentales apomicticos y obtener nuevas combinaciones génicas que pueden ser utilizadas luego en esquemas de mejora genética de la especie. Estos resultados concuerdan con lo observado en otros cruzamientos intra e interespecíficos realizados en el grupo Plicatula (Novo et al., 2020; Novo et al., 2023).

Tabla 11: Valores promedios de fertilidades en *P. chaseanum* 4xS, *P. rojasii* AK40732, *P. plicatulum* Hojs388 y en 14 híbridos, determinada por la producción de semillas en condiciones de autopolinización y polinización libre durante 2 años consecutivos (2022, 2023).

Individuo	Autopolinización		Polinización libre	
	Espiguillas analizadas (nº)	Espiguillas llenas (%)	Espiguillas analizadas (nº)	Espiguillas llenas (%)
Parentales				
<i>Paspalum chaseanum</i> 4xS	2797,00	0,00	2009,00	4,00
<i>Paspalum rojasii</i> AK40732	2530,00	3,50	2926,00	4,50
<i>Paspalum plicatulum</i> Hojs388	1899,00	18,50	3450,00	25,00
Híbridos				
#AK3	5016,00	1,50	2992,00	9,00
#AK8	2534,00	0,54	2171,00	5,00
#AK9	3036,00	1,00	3326,00	4,00
#AK12	3461,00	6,50	2241,00	10,00
#AK21	5581,00	12,00	3468,00	14,00
#AK23	1167,00	0,10	1031,00	8,50
#AK29	4227,00	4,50	2577,00	15,00
#AK34	3104,00	1,00	2920,00	3,00
#H1	6019,00	0,20	5179,00	0,40
#H2	2097,00	0,50	4625,00	4,00
#H6	2716,00	6,50	4614,00	15,50
#H7	6169,00	6,50	5550,00	11,50
#H8	2127,00	0,05	2586,00	0,55
#H9	2770,00	0,60	3080,00	11,50

Notas: Prefijo #AK: progenie de *P. rojasii* AK40732; #H: progenie de *P. plicatulum* Hojs388. Los híbridos resaltados son los preseleccionados según observación morfológica.

5. Conclusiones:

- Los cruzamientos interespecíficos entre *P. chaseanum* 4xS y *P. rojasii* AK40732 4xA; y *P. chaseanum* 4xS y *P. plicatulum* Hojs388 4xA son factibles y es posible la obtención de híbridos.
- Se lograron 43 progenies de híbridos por cruzamientos interespecíficos, con fertilidad variable y segregaron para el modo de reproducción.
- El citotipo tetraploide sexual experimental de *P. chaseanum* es factible utilizar como madre sin necesidad de castrar debido a su autoincompatibilidad en cruzamientos con citotipos tetraploides apomícticos silvestres.
- El citotipo tetraploide apomíctico silvestre de *P. rojasii* AK40732 es de origen autotetraploide, mientras que *P. plicatulum* Hojs388 es de origen allotetraploide segmentario.
- Las especies *P. chaseanum* 4xS, *P. rojasii* 4xA, y *P. plicatulum* 4xA comparten en gran medida el mismo genoma básico.
- Se seleccionaron 2 híbridos (#18 y #22) de *P. rojasii*, para ser incorporados a la población sintética tetraploide sexual del grupo Plicatula del IBONE.
- Se pudo preseleccionar 3 híbridos apomícticos facultativos para cada progenie en base a caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos, quienes superaron a los padres en la mayoría de los caracteres estudiados, lo que posibilita su posterior uso en planes de mejoramiento.

6. Bibliografía:

- Acuña, C. A., Martínez, E. J., Zilli, A. L., Brugnoli, E. A., Espinoza, F., Marcón, F., Urbani, M. H. & Quarín, C. L. (2019). *Reproductive Systems in Paspalum: Relevance for germplasm collection and conservation, breeding techniques, and adoption of released cultivars*. Frontiers in Plant Science, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01377>
- Aguilera, P. M., Sartor, M. E., Galdeano, F., Espinoza, F., & Quarín, C. L. (2011). *Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual Paspalum plicatulum and apomictic P. guenoarum*. Crop Science, 51(4), 1544-1550. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.10.0610>
- Balzarini, M., Bruno, C., Córdoba, M., & Teich, I. (2015). *Herramientas en el análisis estadístico multivariado*. Escuela Virtual Internacional CAVILA. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Bashaw, E. C., Hovin, A. W., & Holt, E. C. (1970). *Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding*. In Proceedings of the XI International Grassland Congress held at Surfers Paradise, Queensland, Australia, 13-23 April 1970.
- Chase, A. (1929). *The north American species of Paspalum*. Systematic plant studies.
- Davidse, G., & Pohl, R. W. (1974). *Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on tropical American grasses (Gramineae)*. Canadian Journal of Botany, 52(2), 317-328. <https://doi.org/10.1139/b74-042>
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). *A plant DNA minipreparation: version II*. Plant molecular biology reporter, 1, 19-21.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Evers, G. W & Burson, B. L. (2004). *Dallisgrass and other Paspalum species*. Warm season (C4) grasses. Agronomy Monographs 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. pp 681-713.

Galdeano, F., Urbani, M. H., Sartor, M. E., Honfi, A. I., Espinoza, F., & Quarín, C. L. (2016). *Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of Paspalum (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy*. Journal of Plant Research, 129(4), 697-710. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0813-4>

Gonçalves, T. M. (2019). *Modo reprodutivo de acessos de Paspalum spp. (grupo informal Plicatula) e busca de marcadores moleculares associados a apomixia*. Tesis Doctoral. UFSCar.

Hojsgaard D.H., Herbig E. (2014). *Durchflusszytometrie. Anwendung in der Pflanzen-Reproduktionsbiologie*. LABO, 3: 34-39. <https://www.labo.de/reinstwasserwasseranalytik/bilder/anwendung-in-der-pflanzen-reproduktionsbiologie-durchflusszytometrie-1.htm>

Lutz, S.A. (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.

Matzk, F., Meister, A., & Schubert, I. (2000). *An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots*. The Plant Journal, 21(1), 97-108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x>

Nogler, G. A. (1984). *Embryology of angiosperms*. Gametophytic embryogenesis. Edited by BM Johri. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 475-518.

Novo, P. E. (2016). *Transferencia génica desde especies tetraploidias apomicticas hacia híbridos tetraploidies sexuales de origen experimental en el grupo Plicatula de Paspalum*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.

Novo, P. E., Acuña, C. A., Quarín, C. L., Urbani, M. H., Marcón, F., & Espinoza, F. (2017). *Hybridization and heterosis in the Plicatula group of Paspalum*. Euphytica, 213, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1983-4>

Novo, P. E., Acuña, C. A., Urbani, M. H., Galdeano, F., Espinoza, F., & Quarín, C. L. (2020). *Genetic transfer from several apomictic tetraploid Paspalum species to an elite group of sexual plants*. Crop Science, 60(4), 1997-2007. <https://doi.org/10.1002/csc2.20173>

Novo, P. E., Carrizo, J. M., Villalba, A. I., Quarín, C. L., & Espinoza, F. (2023). A sexual highly diploidized autotetraploid plant induced from the diploid cytotype of *Paspalum chaseanum* Parodi. *Crop Science*, 63(1), 176-185. <https://doi.org/10.1002/csc2.20856>

Novo, P. E., Espinoza, F., & Quarín, C. L. (2014). An apomictic tetraploid *Paspalum chaseanum* cytotype and its cytogenetic relationship with *P. plicatulum* (Poaceae): taxonomic and genetic implications. *Australian Journal of Botany*, 61(7), 538-543. <https://doi.org/10.1071/BT13194>

Novo, P. E., Galdeano, F., Espinoza, F., & Quarín, C. L. (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(2), 267-277. <https://doi.org/10.1111/plb.12931>

Novo, P. E., Valls, J. F. M., Galdeano, F., Honfi, A. I., Espinoza, F., & Quarín, C. L. (2016). Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. *ScientiaAgricola*, 73, 356-362. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0218>

Novo, S. F. (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.

Ortiz, J. P. A., Quarín, C. L., Pessino, S. C., Acuña, C., Martínez, E. J., Espinoza, F., Hojsgaard D. H., Sartor M. E., Cáceres M. E., & 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>

Palacio, F. X., Apodaca, M. J., & Crisci, J. V. (2020). *Análisis multivariado para datos biológicos: teoría y su aplicación utilizando el lenguaje R*. (1^a ed.). Fundación de Historia Natural Félix de Azara.

Quarín, C. L. (1974). Relaciones citotaxonómicas entre «*Paspalum alnum*» Chase y «*P. hexastachyum*» Parodi («Gramineae»). *Bonplandia*, 115-127.

Quarín, C. L. (1992). The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newslett.*, 5, 8-15.

Quarin, C. L., Valls, J. F. M., & Urbani, M. H. (1997). *Cytological and reproductive behaviour of Paspalum atratum, a promising forage grass for the tropics*. Tropical Grasslands, 31, 114-116.

Sartor, M. E., Quarin, C. L., & Espinoza, F. (2009). *Mode of reproduction of colchicine-induced Paspalum plicatulum tetraploids*. Crop Science, 49(4), 1270-1276.<https://doi.org/10.2135/cropsci2008.05.0270>

Soreng, R. J., Peterson, P. M., Zuloaga, F. O., Romaschenko, K., Clark, L. G., Teisher, J. K., Gillespie, L. J., Barberá, P., Welker, C. A. D., Kellogg, E. A., Li De- Zhu, & Davidse, G. (2022). *A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) III: An update*. Journal of Systematics and Evolution, 60(3), 476-521.<https://doi.org/10.1111/jse.12847>

Villalba, A.I. (2022). *Caracterización genética de híbridos interespecíficos entre Paspalum plicatulum y Paspalum atratum*. Trabajo Final de Graduación. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.

Vogel, K. P., & Burson, B. L. (2004). *Breeding and Genetics*. Publications from USDA-ARS/UNL Faculty.

Wilson, G. B. (1945). *The Venetian turpentine mounting medium*. Stain Technology, 20(4), 133-135.<https://doi.org/10.3109/10520294509107150>

Young, B. A., Sherwood, R. T., & Bashaw, E. C. (1979). *Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses*. Canadian Journal of Botany, 57(15), 1668-1672.<https://doi.org/10.1139/b79-204>

Zuloaga, F. O., & Morrone, O. (2005). *Revisión de las Especies de Paspalum para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)*; MissouriBotanical Garden Press: St. Louis, MO, USA, 298.