

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
(Modalidad Tesina)

“Caracterización y evaluación de la variabilidad genética
en poblaciones naturales de la especie multiploide
Paspalum unispicatum (Scribn. & Merr.) Nash”

Pasante: Lorena Marilín Gruber

Asesora: Ing. Agr. (Dra.) María Esperanza Sartor

Lugar de trabajo: Cátedra de Genética y Fitotecnia de la Facultad
de Ciencias Agrarias, UNNE

Resumen

Paspalum unispicatum (Scribn. & Merr.) Nash es una especie nativa de la Provincia Fitogeográfica Chaqueña, para la que se han reportado citotipos diploides sexuales, triploides apomícticos y tetraploides apomícticos facultativos. Lo que hace particular a esta especie, es que los triploides se encuentran ampliamente distribuidos y en gran número, llegando inclusive a conformar verdaderas poblaciones. El objetivo de esta Tesina es caracterizar y evaluar la variabilidad genética en poblaciones naturales de *Paspalum unispicatum* conformadas por individuos de diferente nivel de ploidía. Se utilizaron 78 plantas de *P. unispicatum* previamente colectadas de poblaciones naturales dentro del área de distribución de la especie. El nivel de ploidía de cada individuo fue determinado previamente por citometría de flujo y la variación genotípica de cada población se estimó mediante la utilización de marcadores moleculares AFLPs y EST-SSR. Los patrones obtenidos con los marcadores moleculares fueron analizados con programas estadísticos que nos permitieron obtener valores de variabilidad genética y genotípica, como así también la relación de estas variables con la distancia geográfica. Los resultados revelan que la especie multiploide *P. unispicatum* presenta una gran diversidad genética y genotípica asociada a los citotipos y sus sistemas reproductivos. Las poblaciones diploides de reproducción sexual presentaron mayores niveles de variabilidad, mientras que entre las poblaciones poliploides existe un amplio rango de diversidad: desde poblaciones constituidas por pocos genotipos con alta variabilidad genética, hasta poblaciones donde la mayoría de los individuos representan genotipos diferentes, pero que tienen mayores similitudes entre sí. La coexistencia de individuos triploides, por un lado con 2x y, por el otro, con 4x confirmaría la existencia de flujo génico entre diploides y tetraploides, en donde los triploides actuarían como un puente para la transferencia de genes. La alta variabilidad encontrada en las poblaciones diploides estaría asociada al tipo de reproducción que éstas presentan. Por su parte, para las poblaciones tetraploides, que también presentaron un alto grado de diversidad, se ha propuesto que la sexualidad residual sería la principal fuente de variabilidad. Otro factor que tuvo un rol importante en la variabilidad interpoblacional es la distancia geográfica. Es posible decir que existe una estrecha relación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre poblaciones. El conjunto de los resultados obtenidos en esta tesina pone en evidencia la gran dinámica existente entre las poblaciones naturales de la especie *Paspalum unispicatum*, lo cual está estrechamente relacionado con el sistema genético de la especie y su distribución geográfica. Esta información

podría ser utilizada en programas de mejoramiento genético de forrajeras que involucren especies nativas.

Introducción

Se denomina apomixis a la reproducción asexual por medio de semillas Nogler (1984a). Una de las características de esta forma de reproducción es que las semillas se producen sin que ocurra meiosis ni fecundación de la ovocélula. Por partenogénesis, la ovocélula desarrolla un embrión que tiene el mismo genotipo que la planta que lo originó, es decir que la apomixis es una forma natural de clonación. La apomixis es un carácter deseable en la agricultura, ya que garantiza la perpetuación de genotipos superiores (es decir, semillas híbridas heteróticas) por auto-siembra sin pérdida de vigor híbrido (Ortíz *et al.*, 2014).

Por mucho tiempo se ha considerado que la apomixis es responsable de la creación de poblaciones genéticamente uniformes. Por ejemplo en estudios realizados en especies de los géneros *Hieracium*, *Antennaria*, *Taraxacum*, *Ranunculus*, y *Erigeron*, se ha observado que las poblaciones apomícticas se componen generalmente por un solo o unos pocos genotipos, a excepción de aquellas poblaciones apomícticas que viven en las proximidades de poblaciones sexuales de la misma especie o de una especie emparentada (Bayer, 1990; Menken *et al.*, 1995; Hörandl y Paun, 2007). Sin embargo, la sexualidad residual o las mutaciones pueden ocurrir, aumentando la variabilidad en poblaciones apomícticas aisladas (Houliston y Chapman, 2004). Se ha comprobado que existen especies apomícticas que pueden contener una rica diversidad, como por ejemplo *Ranunculus carpaticola* (Paun *et al.*, 2006), *Brachiaria humidicola* (Jungmann *et al.*, 2010), *Paspalum notatum* (Espinoza *et al.*, 2006; Cidade *et al.*, 2008; Reyno *et al.*, 2012) y *Panicum maximun* (Sousa *et al.*, 2011).

En general en las gramíneas, es más escasa la información acerca de cómo se genera diversidad en las especies apomícticas y cómo la poliploidía y la apomixis contribuyen a la adaptación de estas especies a diferentes entornos (Brugnoli *et al.*, 2014). Algunos estudios han intentado dilucidar cómo se generan las nuevas poblaciones apomícticas en las gramíneas y cómo esta diversidad genotípica está extendida en el área de distribución natural de una especie. Un caso de estudio importante son las especies del género *Paspalum*, el cual contiene especies con diferentes niveles de ploidía, vinculado con características reproductivas.

Paspalum es uno de los géneros de gramíneas que cuenta con mayor número de especies nativas del continente americano. Además de su diversidad específica, tiene una importancia especial porque posee representantes en toda la extensión de las regiones templadas-cálidas

del continente, muchos de los cuales son utilizados como forrajes en los campos naturales de dichas regiones (Zuloaga y Morrone, 2005). La diversidad de este género, tanto en sus aspectos morfológicos como en su capacidad de adaptarse a diversos ambientes, está sustentada en la variedad de sus estrategias reproductivas (Bashaw *et al.*, 1970).

Paspalum se caracteriza por presentar especies diploides de reproducción sexual y poliploides sexuales o apomícticas (Quarin, 1992). La poliploidía abarca un amplio rango de citotipos, desde triploides (3x) (Quarin y Lombardo, 1986) hasta 16-ploides (16x) (Burton, 1940). La poliploidía está presente en aproximadamente el 80% de las especies, y la mitad de estos poliploides son tetraploides. A su vez, la mayoría de los poliploides son de reproducción apomíctica (Quarin, 1992). Es decir que la apomixis, está estrechamente asociada con la poliploidía. Diversos estudios experimentales fueron llevados a cabo dentro del género *Paspalum* para tratar de dilucidar el/los procesos que dieron origen a los poliploides (Quarin y Hanna 1980; Quarin *et al.*, 1984; Quarin y Norrmann 1987; Quarin *et al.*, 1989; Quarin *et al.*, 1996; Quarin *et al.*, 2001). Para este género, Quarin (1992) ha postulado un modelo en el cual los tetraploides se originan a partir de los diploides por un proceso consistente en dos etapas consecutivas: inicialmente, en una población diploide, un individuo produce eventualmente un gameto femenino no reducido ($2n = 2x$) que luego, al ser fecundado por un gameto masculino reducido ($n = x$) de otro individuo de la misma población, produce un híbrido B_{III} ($2n + n$), es decir un individuo triploide ($2n = 3x$). Una vez que este nuevo citotipo triploide logra establecerse en la población diploide, da origen a un nuevo autotetraploide ($3x + x = 4x$) por el mismo mecanismo, es decir a través de la fecundación de un gameto no reducido del triploide por un gameto reducido de alguno de los individuos diploides de la población. Del mismo modo, los poliploides del género de mayor nivel de ploidía pueden originarse por la unión de gametos reducidos y no reducidos (híbridos B_{III}). Este hecho puede contribuir tanto a la adquisición de nuevas características morfológicas, genéticas y/o fisiológicas como también puede resaltar las habilidades adaptativas de una especie. Como consecuencia, los poliploides pueden presentar una distribución diferente o periférica con respecto a los antecesores diploides (Levin, 2002). Los triploides de los complejos agámicos de *Paspalum* son parcialmente fértiles, lo que indica que el aislamiento reproductivo entre diploides y tetraploides no es absoluto, razón por la cual tales triploides son considerados como puentes para el flujo génico entre ambos niveles de ploidía (Quarin, 1992; Norrmann *et al.*, 1994).

Tal como se cita en Brugnoli *et al.*, 2014, *Paspalum notatum* y *P. simplex* han sido las especies mejores caracterizadas del género ya que comparten características genéticas y representan una gran proporción de las especies de *Paspalum*. Estas dos especies tienen

diferentes niveles de ploidía, incluyendo plantas diploides y poliploides (Urbani *et al.*, 2002; Gates *et al.*, 2004). El citotipo diploide es sexual y de polinización cruzada, y los poliploides son apomícticos autofértiles. En cuanto a su distribución y frecuencia, el citotipo tetraploide es el que predomina en ambas especies y el que se encuentra más ampliamente distribuido, mientras que el diploide en ambos casos está restringido a pequeñas áreas dentro de la distribución natural de cada especie. En relación a la variabilidad observada en las poblaciones naturales, las poblaciones tetraploides que viven en las proximidades de las poblaciones diploides son muy variables y comparten la mayor parte de la variabilidad contenida con las poblaciones vecinas $2x$ (Daurelio *et al.*, 2004; Brugnoli *et al.*, 2013). Un patrón de variabilidad similar ha sido reportado para otras especies multiploides $2x/4x$ tales como *P. denticulatum* y *P. rufum* (Sartor *et al.*, 2013). Otra situación comúnmente observada en *Paspalum* es la presencia de especies para las que solo se conoce el citotipo tetraploide apomíctico. En estas especies sería esperable encontrar una baja variabilidad genética y el predominio de uno o unos pocos genotipos. Sin embargo, en poblaciones de especies exclusivamente tetraploides como *P. nicorae* y *P. lividum*, se han reportado altos niveles de diversidad genética y genotípica, probablemente como consecuencia de la generación de nuevas variantes a través de la sexualidad residual y las mutaciones (Sartor *et al.*, 2013). Los sistemas genéticos que involucran citotipos diploides sexuales y tetraploides apomícticos o exclusivamente tetraploides apomícticos son los más frecuentes en *Paspalum* (Ortíz *et al.*, 2013). Sin embargo existen combinaciones entre niveles de ploidía y sistemas reproductivos que aún no han sido caracterizadas.

Paspalum unispicatum Scribn. y Merr., pertenece al grupo informal Decumbentes del género *Paspalum* y se distribuye desde el Sur de Texas, Estados Unidos hasta América del Sur en Venezuela, Bolivia, Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. En la zona de estudio, la Región Fitogeográfica Chaqueña, *P. unispicatum* forma parte del estrato herbáceo de los bosques nativos donde predominan el quebracho colorado (*Schinopsis balansae*), el quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho blanco*) y los algarrobos (*Prosopis sp.*) Esta especie de *Paspalum* es una de las forrajeras nativas más consumidas por el ganado en toda la región, la cual además presenta altos valores nutritivos (Renolfi, 1990; Correa *et al.*, 2002; Navarro, 2002).

Morfológicamente se caracteriza por incluir plantas con inflorescencias terminales y axilares presentes en la última vaina foliar, con uno o dos racimos por inflorescencia y espiguillas con gluma inferior dimorfa (Zuloaga y Morrone *et al.*, 2005). Crece en campos, bordes de caminos y barrancas de ríos, sobre suelos modificados (Rosengurtt *et al.*, 1970). Para esta especie se han reportado citotipos diploides sexuales ($2n = 2x = 20$), triploides

apomíticos ($2n = 3x = 30$) y tetraploides apomíticos facultativos ($2n = 4x = 40$) (Burson, 1997; Galdeano *et al.*, 2016). Lo que hace particular a esta especie es el hecho de que los triploides se encuentran ampliamente distribuidos y en gran número, llegando inclusive a conformar verdaderas poblaciones (Sartor *et al.*, 2011). Dentro del género *Paspalum*, son escasos los ejemplos de especies en donde la triploidía es la situación más frecuentemente observada en la naturaleza, ya que en la mayoría de las especies, los triploides se encuentran eventualmente dentro de poblaciones diploides o en zonas de contacto entre poblaciones $2x$ y $4x$. Contar con información acerca de cómo está contenida la variabilidad en estas poblaciones triploides y si existe un flujo genético entre ploidías, relacionado además con su distribución geográfica, permitiría aumentar el conocimiento de la forma en que se genera, mantiene y moviliza la variabilidad en este tipo de especies multiploides.

Objetivos

General

Caracterizar y evaluar la variabilidad genética en poblaciones naturales de *Paspalum unispicatum* conformadas por individuos de diferente nivel de ploidía.

Particulares

1. Caracterizar mediante marcadores moleculares, los perfiles genéticos de individuos que representen diferentes niveles de ploidía en distintas poblaciones colectadas dentro del área de distribución natural de la especie.
2. Evaluar el flujo genético entre las distintas poblaciones estudiadas como así también entre diferentes citotipos.
3. Determinar la relación entre la distancia genética y la distancia geográfica observada en las poblaciones.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron 102 plantas de *P. unispicatum* previamente colectadas de poblaciones naturales dentro del área de distribución de la especie (Fig. 1). El lugar de procedencia y el nivel de ploidía de los individuos analizados para cada población se detallan en la Tabla 1. Las plantas fueron mantenidas en macetas con sustrato estéril en el invernáculo de la Cátedra de Genética, FCA-UNNE.

El nivel de ploidía de cada individuo fue previamente determinado por citometría de flujo en el laboratorio de la Cátedra de Genética de FCA-UNNE.

Determinación de la variación genética

La variación genotípica de cada población se estimó mediante la utilización de marcadores moleculares AFLPs y EST-SSR.

Microextracciones de ADN

Se cosecharon entre 0,2 y 0,4 gramos de hojas frescas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Luego fueron molidas en presencia de nitrógeno con mortero y pilón de porcelana. El polvo obtenido se colectó en tubos Eppendorf de 2 mL y se agregó una mezcla de

1,3 mL de buffer de extracción [Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), EDTA 50 mM (pH 8), NaCl 500 mM, SDS 2% y polivinilpirrolidona PM 360.000 1%] y 13 µL de β-mercaptoetanol, la cual fue previamente calentada a 68 °C. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 68 °C. Luego se agregaron 250 µL de acetato de potasio 5M y se incubaron en hielo entre 1 y 2 horas. Los tubos se sometieron a 20 minutos de centrifugación a 10000 rpm en centrífuga a 4 °C. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL limpio, al que se agregó 1 mL de isopropanol frío. Esta mezcla se mantuvo durante toda la noche a -20 °C. Luego, los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 10000 rpm a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes, se secaron los pellets y se resuspendieron en 250 µL de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8) y EDTA 1 mM (pH 8)]. Los tubos se agitaron durante una hora para disolver los pellets. Luego se realizó un tratamiento con 1 µL de RNAsa (10mg/mL) durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Cada muestra se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL, donde recibieron un tratamiento con fenol/cloroformo, donde se agregaron 125 µL de fenol y 125 µL de cloroformo. Los tubos fueron agitados por inversión y se centrifugaron a 14000 rpm. Se transfirieron 150 µL de la fase superior a tubos limpios y se agregó 10 µL de NaCl 5 M y 500 µL de etanol absoluto. Esta mezcla se mantuvo toda la noche a -20 °C. Luego las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol 70%. Las muestras nuevamente se centrifugaron 14000 rpm 10 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante. Las muestras se secaron en estufa a 37 °C. Una vez secas se resuspendieron en 25 µL agua ultrapura estéril.

Concentración y Calidad de ADN

La calidad y concentración del ADN se evaluaron a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TAE 1X [Tris-acético 40 mM y EDTA 1 mM (pH 8)]. Se sembró aproximadamente 1 µL de muestra con 1,5 µL buffer de siembra 1X (azul de bromofenol 0,25 %, xilen-cianol 0,25% y glicerol 30%) y agua ultra pura hasta llegar a un volumen de 10 µL. La electroforesis se llevó a cabo a 70V durante aproximadamente 2 horas, momento en el cual el frente de corrida alcanzó las tres cuartas partes del gel. Luego se realizó la tinción sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) por 30 minutos aproximadamente. Se determinó la calidad y concentración del ADN visualizando el gel en el transiluminador de luz ultravioleta.

Marcadores moleculares del tipo AFLP

Para llevar a cabo el estudio con AFLP se utilizó la técnica descripta por Vos *et al.* (1995), con modificaciones que se detallan a continuación.

Digestión

La digestión del ADN se realizó utilizando simultáneamente dos enzimas de restricción: *EcoRI* y *MseI*. Para realizar la digestión se seleccionó el buffer OPA 5X [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), Acetato de Magnesio 10 mM, Acetato de potasio 50 mM], que es compatible para ambas enzimas y para T4 DNA ligasa.

La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo la mezcla de reacción que se indica en la Tabla 2.

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

Generación de adaptadores

Los adaptadores utilizados se prepararon utilizando oligonucleótidos de cadena simple sintetizados por la Universidad de British Columbia. Para obtener adaptadores de doble cadena se mezclaron en tubos de PCR 10 µg de los oligonucleótidos *EcoRI* “forward” (5'-CTC GTG ACT GCG TAC C-3') y “reverse” (5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3') y 10 µg de los oligonucleótidos *MseI* “forward” (5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') y “reverse” (5'-TAC TCA GGA CTC ATC-3'). Las mezclas se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y luego a temperatura ambiente durante 30 minutos. Ambos adaptadores se diluyeron a 50 pM/µL. Los adaptadores *EcoRI* fueron diluidos nuevamente 1:10 para llevarlos a una concentración final de 5pM/µL.

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

3'-CTGACGCATGGTTAA-5'

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

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Ligación de adaptadores

La ligación de los adaptadores *EcoRI* y *MseI* se realizó en el mismo tubo donde se llevó a cabo la reacción de digestión. A cada tubo se agregaron 7,5 µL de solución de ligación de adaptadores (ATP 1mM, buffer OPA 1X, DTT 5mM, BSA 50 ng /µL), 5 pMoles de adaptador *EcoRI*, 50 pMoles de adaptador *MseI* y 5 unidades de T4 DNA ligasa. Las muestras se incubaron a 37°C durante 4 horas. Una vez finalizado el período de incubación las muestras se conservaron a -20 °C.

Amplificaciones

Para todas las reacciones de amplificación se utilizaron como cebadores oligonucleótidos sintetizados por la Universidad de British Columbia y la enzima polimerasa GoTaq® DNA Polymerase de Promega.

Preamplificaciones

Las reacciones de preamplificación se llevaron a cabo utilizando como templado el producto de la ligación y como cebadores los oligonucleótidos E01 (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3') y M01 (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AA-3'). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL con los componentes que se indican en la Tabla 3.

Las reacciones de preamplificación se llevaron a cabo en un termociclador *BIO-RAD thermocycler* programado como se indica en la Tabla 4.

Amplificaciones selectivas

Las amplificaciones selectivas se llevaron a cabo utilizando como templado una dilución 1:10 del producto de preamplificación y como cebadores se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores E y M las cuales se indican en la Tabla 5. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, conteniendo 2 µL de la dilución 1:10 del producto de preamplificación, 1.2 ng/µL de dNTP's, 30 ng de cada uno de los cebadores E y M, 1 unidad de DNA polimerasa GoTaq (Promega), 1X del buffer de la enzima GoTaq.

Las amplificaciones selectivas se realizaron en un termociclador *BIO-RAD thermocycler*, siguiendo las condiciones indicadas en Vos y colaboradores (1995). El programa de amplificación constó de 36 ciclos y se indica en la Tabla 6.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los marcadores moleculares de AFLP se resolvieron en geles de poliacrilamida al 6% [acrilamida:bisacrilamida (38:2); urea 7M, buffer TBE 0,5X] de 0,4 mm de espesor. Antes de realizar la siembra se adicionó a cada muestra el buffer de siembra 1X (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, formamida 95% y NaOH 10 mM) y luego fueron desnaturalizadas a 95 °C durante 5 minutos y colocadas inmediatamente en hielo. La electroforesis se realizó en una cuba electroforética Sequi-Gen GT/PowerPac 3000, 38 x 30 cm de BIO- Rad, utilizando para el reservorio inferior buffer TBE 1X y en el superior buffer TBE 0,5 X. Antes de realizar la siembra se realizó una pre-corrida del gel a una potencia constante de 60W por aproximadamente 1 hora, hasta alcanzar una temperatura de 50 °C. Una vez pre-corrido el gel se sembró 6 µL de cada muestra desnaturalizada. Para estimar el peso molecular de las bandas se utilizó el marcador de peso molecular CienMarker (Biodynamics). La corrida electroforética

se llevó a cabo a una potencia constante de 60W por aproximadamente 1 hora y 10 minutos, utilizando una fuente de poder marca Consort, modelo EV233.

Para visualizar los fragmentos de ADN, los geles fueron teñidos con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito en el manual técnico de Promega “DNA SilverStainingSystem”. Este protocolo consiste en una fijación en ácido acético al 10% durante 20 minutos, seguida de 3 lavados con agua bidestilada durante 2 minutos y un proceso de tinción con nitrato de plata al 0,1% y formaldehído 1,5 mL/litro de solución durante 30 minutos. Luego del paso de la tinción se realiza un lavado con agua bidestilada fría durante 5-10 segundos y posteriormente se revela con una solución desarrolladora (carbonato de sodio 3%, 1,5 mL de formaldehído 1,5 mL/litro y 2 mg/litro de tiosulfato de sodio). El gel se sumerge en esta solución y se agita lentamente hasta observar la coloración deseada. El revelado se detiene con ácido acético al 10% y luego se enjuaga el gel con agua bidestilada. Los geles se dejaron secar a temperatura ambiente.

Marcadores moleculares del tipo EST-SSR

Las condiciones de reacción y amplificación por PCR de los marcadores EST-SSR fueron realizadas según lo descrito por Siena *et al.* (2011). Los reactivos utilizados en las reacciones de PCR y sus respectivas concentraciones están detalladas en la Tabla 7. Las condiciones de amplificación consistieron de una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 10 ciclos con un paso de desnaturalización de 1 min a 94 °C, un paso de anillado de 1 minuto a 57,5° y un paso de extensión de 1 min a 72 °C. Luego se realizaron 35 ciclos de amplificación con una temperatura de anillado de 58°C. Por último se realizó un ciclo de elongación a 72 °C de 10 min. Los productos de amplificación fueron visualizados utilizando la técnica de tinción con bromuro de etidio.

Análisis de datos

Los datos moleculares obtenidos de cada población fueron convertidos en una matriz binaria utilizando el programa Microsoft Excel, donde (1) y (0) indican presencia y ausencia de bandas respectivamente.

Para obtener información acerca de la variabilidad genotípica de cada población, se determinaron parámetros de variabilidad genética y genotípica intra e interpoblacional utilizando el programa GENOTYPE/GENODIVE (Meirmans y Van Tienderen, 2004).

Utilizando el programa GenAlEx se determinó el grado de variabilidad genética dentro y entre poblaciones. Para ello se determinó la relación genética total entre individuos de una

misma población y de poblaciones diferentes a partir del análisis de coordenadas principales (en inglés Principal Coordinates Analysis, PCA). El análisis se basó en la matriz de distancia genética y la relación entre los individuos se evaluó en función de las dos primeras coordenadas principales. Utilizando el mismo programa, se determinó el porcentaje de alelos polimórficos para cada población y el número de alelos privados (alelos o marcadores presentes en un citotipo o población y ausente en los restantes) para cada población y, en aquellas poblaciones con más de un citotipo, para cada citotipo hallado. Además, se determinó el porcentaje de varianza molecular (AMOVA).

Para complementar los resultados obtenidos con el programa GenAlEx, se determinó la similitud genética intra e interpoblacional utilizando el programa PAST. La similitud se determinó mediante el índice de Jaccard y los valores obtenidos fueron representados en un dendrograma construido por el método UPGMA.

Resultados

En total, de las 102 plantas con las cuales se inició el trabajo experimental, se obtuvieron los perfiles genéticos de 78 plantas (AFLP) y 102 plantas (EST-SSR) representativas de las 6 poblaciones naturales de *P. unispicatum* aquí estudiadas. Para obtener dichos perfiles se utilizaron marcadores moleculares del tipo AFLPs y EST-SSR, realizando inicialmente una prueba y selección de cebadores informativos para cada tipo de marcador.

Prueba y selección de cebadores AFLP informativos

Se realizó la amplificación de 8 combinaciones diferentes de cebadores en 6 individuos representativos de las poblaciones a estudiar y de los 3 niveles de ploidía detectados para la especie (Tabla 8). El objetivo de este ensayo fue determinar cuáles de las combinaciones de cebadores presentaba mejores patrones de bandas. Se obtuvieron amplificaciones con todas las combinaciones de cebadores E y M ensayados y para todos los individuos analizados.

De las ocho combinaciones de cebadores probadas, se seleccionaron dos de ellas: E31M35 (combinación indicada con la letra G en la Fig. 2) y E33M33 (combinación indicada con la letra F en la Fig. 2), ya que permitieron obtener un mayor número de marcadores en un perfil claro y reproducible.

Con estas dos combinaciones de cebadores seleccionadas, se realizaron las amplificaciones selectivas de los 102 individuos, pertenecientes a 6 poblaciones, las cuales fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 6%. De los 102 individuos analizados, 78 presentaron patrones de bandas claros y reproducibles.

Prueba y selección de cebadores EST-SSR.

Se realizó la amplificación de 5 cebadores diferentes en 6 individuos representativos de las poblaciones a estudiar y de los 3 niveles de ploidía detectados para la especie (Tabla9).

El objetivo de este ensayo fue, al igual que para el marcador de tipo AFLP, determinar si todos los cebadores producían amplificación y cuáles de ellos presentaba un mejor patrón de bandas. Se obtuvieron amplificaciones con todos los cebadores ensayados y para todos los individuos analizados.

De los cinco cebadores probados, se seleccionaron dos: 124 y 143, ya que permitieron obtener un mayor número de marcadores en un perfil claro y reproducible (Fig. 3).

Con estos dos cebadores seleccionados, se realizaron las amplificaciones selectivas de 102 individuos, pertenecientes a 6 poblaciones, las cuales fueron resueltas en geles de agarosa al 2,5%. Todos los individuos analizados, presentaron un perfil de bandas claro y reproducible.

Caracterización de la variabilidad genética dentro de las poblaciones

Una vez obtenidos los productos de amplificación para cada tipo de marcador se realizó el análisis de la variabilidad genética intra e interpoblacional, cuyos resultados se presentan a continuación.

Caracterización de la variabilidad genética dentro de las poblaciones con marcadores AFLP

Los productos de amplificación de las 2 combinaciones de primers seleccionadas permitieron obtener 134 marcadores informativos (Tabla 10).

En base a los datos de presencia o ausencia de bandas se estableció el perfil genético de cada individuo en cada una de las poblaciones estudiadas y se hicieron cálculos de variabilidad genotípica y genética en las 6 poblaciones por separado. La variabilidad genotípica se refiere al número de genotipos multilocus (definidos por su patrón de bandas en todos los loci estudiados) que pueden distinguirse en una población (Ellstrand y Roose, 1987). La variabilidad genética está relacionada con el número de loci que presentan polimorfismos en la población. Para todas las poblaciones se determinó, el número de genotipos multilocus distintos (G), la proporción de genotipos distinguibles (G/N), la diversidad de genotipos multilocus (D) y la uniformidad genotípica (E). Los distintos estimadores son mostrados en la Tabla 11. Las poblaciones diploides puras (P1 y P3) presentaron un alto índice de diversidad genotípica (D), con valores de 0,94 y 0,98 respectivamente. En la P1, de los 12 individuos analizados, se obtuvieron 9 genotipos distintos, de los cuales 7 son distinguibles. En cuanto a la uniformidad entre estos genotipos, la misma fue alta con un valor de 0,80. Esto significa que los individuos tienen genotipos similares y que sus diferencias son pequeñas pero significativas. La otra población diploide pura (P3), mostró un comportamiento similar, con 9 genotipos encontrados en 10 individuos, lo cual se traduce en una diversidad genotípica del 98%. Estos genotipos son también muy similares entre sí, resultando el índice de uniformidad de 0,93.

La población P2, constituida en un 70% por individuos 3x y en un 30% por individuos 2x, presentó un 50% de genotipos con respecto a la cantidad de individuos analizados, (10 individuos analizados con 5 genotipos). Esto significa que dentro de la población existen individuos genéticamente iguales entre sí (clones). Los tres individuos 2x analizados presentaron el mismo perfil genético, por lo que los mismos tienen un origen clonal. La diversidad y uniformidad genotípica en esta población fueron menores que en las poblaciones

2x puras, con valores de un 0,80 y 0,71 respectivamente para cada índice, indicando una amplia variabilidad genotípica, con diferencias entre individuos mayores a las de los genotipos de las poblaciones P1 y P3.

En la población triploide P4, el número de individuos analizados fue mayor que en las demás poblaciones. De los 17 individuos analizados, se obtuvieron 10 genotipos distintos, de los cuales sólo pudieron diferenciarse efectivamente 5. Si bien estos resultados son similares a los obtenidos en la P2 (también triploide), el índice de diversidad genotípica de P4 fue el más bajo (0,84), al igual que el índice de uniformidad (0,47). Esto se traduce en que si bien existe un menor número de genotipos en la población P4, las diferencias entre genotipos son más marcadas que en las demás poblaciones.

En el análisis de la población P5, compuesta en un 28,6% de individuos 3x y en un 71,4% de individuos 4x, se pudo observar que el número de genotipos distinguibles fue alto, ya que de 14 individuos analizados se identificaron 11 genotipos. Si bien la diversidad genotípica en la población fue alta (0,98), el índice de uniformidad fue más bajo que en las otras poblaciones 3x analizadas (0,91), reflejando una menor diferenciación entre genotipos.

En la población P6, constituida por 15 individuos tetraploides, se obtuvieron 7 genotipos distinguibles. Los índices de diversidad y uniformidad genotípicas, de 0,91 y 0,76 respectivamente, nos muestran que estamos ante una población con alto grado de diversidad genotípica acompañado de un cierto grado de heterogeneidad.

Para profundizar el estudio de las poblaciones y en complemento al análisis realizado con el programa GenoType/GenoDive, se realizó el análisis de coordenadas principales para cada población basado en las distancias genéticas observadas entre individuos. En la Fig. 4A se puede observar que la población diploide P1 presentó un alto número de genotipos distintos.

La población diploide P3 también presentó un alto número de genotipos, sin embargo, la mayoría de ellos se agruparon más próximos entre sí con respecto a los diploides de P1, confirmando la baja diferenciación genética entre los genotipos de P3 (Fig. 4C). La planta 10 fue la única que mostró una diferenciación genética mayor con respecto a los demás individuos. En la población triploide/diploide P2, fue posible identificar 5 genotipos distintos, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el análisis con el programa GenoType/GenoDive (Fig.4B). Precisamente, uno de los genotipos correspondió a los tres individuos diploides que integran esta población. Los cuatro genotipos restantes correspondieron a genotipos de individuos triploides, los que a su vez presentaron una baja diferenciación entre sí y con una mayor distancia genética con respecto a los individuos diploides de esta población.

Por su parte, la población triploide P4 fue la población que menor índice de uniformidad había presentado. Esto se corroboró con el gráfico de coordenadas principales que mostró los distintos genotipos distribuidos en toda el área del gráfico (Fig.4D). Estos resultados podrían estar relacionados con la distribución de la población P4, ya que la colección de la misma abarcó una mayor área geográfica. En cuanto a la diversidad genotípica, fue posible identificar un grupo de individuos que presentaron un mismo genotipo, es decir que son clones.

Para la población triploide/tetraploide P5 se observó que la mayoría de los individuos presentan genotipos muy similares, independientemente de su nivel de ploidía (Fig. 4E). Sin embargo algunos pocos individuos presentaron genotipos marcadamente diferentes. De estos individuos, dos fueron triploides (identificados con los números 9 y 3) y uno fue tetraploide (individuo 7).

La población tetraploide P6 también presentó una alta uniformidad entre los distintos genotipos, con varios individuos presentando el mismo genotipo (Fig. 4F). Esto nos indica que entre las plantas coleccionadas de la P6 también existen algunas de origen clonal.

Caracterización de la variabilidad genética dentro de las poblaciones con marcadores EST-SSR

Los productos de amplificación de los 2 primers seleccionados permitieron obtener 22 fragmentos informativos (Tabla 12).

En base a los datos de presencia o ausencia de bandas se estableció el perfil genético de cada individuo en cada una de las poblaciones estudiadas y se hicieron cálculos de variabilidad genotípica y genética en las 6 poblaciones por separado. Los distintos estimadores son mostrados en la Tabla 13.

Las poblaciones P1 y P2 presentaron mayores índices de diversidad y uniformidad genotípica con respecto a las demás poblaciones analizadas. La población P1, compuesta por 13 individuos diploides, presentó 6 genotipos distinguibles. La diversidad entre estos genotipos distinguibles es bastante alta, presentando un valor de diversidad genotípica (D) de 0,91. En cuanto a la uniformidad genotípica (E), esta población presentó el valor más alto en relación a las demás poblaciones analizadas con EST-SSR (0,70), lo cual significa que las diferencias entre los genotipos fueron bajas. Para la población P2, integrada por 12 individuos en su mayoría triploides con algunos diploides, el análisis fue similar al de la población P1, encontrándose también en este caso individuos con el mismo genotipo. El índice de diversidad genotípica tuvo un valor de 0,85 y el de uniformidad genotípica, de 0,56. Esto significa que la población P2 es menos diversa genotípicamente que la población P1, pero las diferencias entre los genotipos

distinguibles es mayor, lo cual se traduce en una mayor distancia genética entre los individuos genotípicamente diferentes.

La población P3, integrada por 15 individuos diploides, mostró 5 genotipos distintos. En esta población el valor de diversidad genotípica fue bajo (0,48), al igual que el índice de uniformidad (0,36). Estos valores estarían indicando que, si bien son pocos los individuos genotípicamente distintos entre sí, estas diferencias son bien marcadas.

Para la población P4, 32 individuos triploides fueron analizados. Sobre el total de individuos se detectaron 12 genotipos distintos, con una muy baja uniformidad genotípica (0,21) y una diversidad genotípica media de 0,61. Esto quiere decir que, teniendo un 61% de diversidad genotípica dentro de la población, la distancia genética entre los genotipos detectados es grande, resultando éstos muy distintos entre sí.

La población P5, integrada por 11 individuos triploides y 4 tetraploides, mostró un comportamiento similar al de la población triploide P4, con un valor medio de diversidad genotípica (0,57) y un índice de uniformidad genotípica también bajo (0,36).

Cabe destacar que en las poblaciones P3, P4 y P5, además de observar individuos con el mismo genotipo, el número de genotipos efectivos se redujo a solo 2 genotipos distinguibles en cada población, lo que ratifica la baja diversidad genotípica detectada en estas poblaciones.

En la población P6, formada exclusivamente por tetraploides, se detectaron 8 genotipos distintos en una muestra de 15 individuos. Esto significa que más del 50% de los individuos de la población son genotípicamente diferentes entre sí. El índice de diversidad genotípica observado para esta población, con un valor de 0,79, fue mayor que el observado en las demás poblaciones poliploides analizadas. Por su parte, el índice de uniformidad genotípica mostró un valor de 0,48, indicando un valor intermedio de diferenciación entre genotipos.

Para profundizar el estudio de las poblaciones y en complemento al análisis realizado con el programa GenoType/GenoDive, se realizó el análisis de coordenadas principales (PCA) para cada población utilizando el programa GenAlEx (Fig. 5).

Para las poblaciones P1, P2, P3 y P5 (Fig.s 5A, B, C y E respectivamente), se pudo observar que casi todos los individuos presentaron genotipos diferentes, exceptuando algunos pocos individuos que mostraron el mismo genotipo.

En cuanto a la población P4 (Fig. 5D), los individuos que la integran fueron genéticamente menos distantes entre sí, comparado con los de las demás poblaciones. Se pudo observar que casi todos los genotipos, estuvieron representados por un solo individuo. Cuatro genotipos, se encontraron representados en 2 individuos cada uno, mientras que uno de los genotipos se encontró repetido en 3 individuos.

Finalmente, la población P6 presentó el mayor porcentaje de variabilidad (Fig. 5F). Se pueden observar 9 genotipos distintos, de los cuales dos de ellos se encuentran presentes en más de un individuo. Uno de estos dos genotipos está presente en 2 individuos, y el otro, en 6 individuos.

Caracterización de la variabilidad genética entre las poblaciones

Para determinar la relación genética total entre poblaciones se compararon los perfiles obtenidos con los marcadores de AFLP e EST-SSR entre todos los individuos de las seis poblaciones estudiadas.

Caracterización de la variabilidad genética entre las poblaciones con marcadores AFLP

A través del análisis de Coordenadas Principales fue posible determinar que existe gran variabilidad entre las poblaciones y que las mismas se agruparon en función de su localización geográfica (Fig. 6). Por un lado se pudo diferenciar un grupo formado por las poblaciones P1, P2 y P3 provenientes del Chaco, otro grupo integrado por las poblaciones P4 y P5 provenientes de Formosa y por último y de forma aislada, la población P6 proveniente de Salta. Estos mismos agrupamientos se observaron en el dendrograma construido por el método UPGMA (Fig. 7), basándose ambos métodos en el análisis de la distancia genética entre individuos y entre poblaciones. El dendrograma nos permitió observar con detalle cómo se agruparon las poblaciones y cómo lo hacen los individuos de cada población según su nivel de ploidía. En el primer grupo, representado por las poblaciones provenientes de la Provincia del Chaco (poblaciones P1, P2 y P3) se pudo observar que los individuos se agruparon también en función de su nivel de ploidía: por un lado los individuos diploides de las poblaciones P1, P3 y P2, y por otro lado, los individuos triploides de la población P2.

En un segundo agrupamiento, se encontraron las poblaciones originarias de Formosa (poblaciones P4 y P5). Estas poblaciones están compuestas principalmente por individuos triploides, con la presencia de algunos tetraploides provenientes de la población P5. Los tetraploides no se agruparon exclusivamente entre sí, sino que lo hicieron con algunos individuos triploides pertenecientes a la misma población.

Un tercer agrupamiento estuvo conformado por la población P6, originaria de Salta y compuesta exclusivamente por individuos tetraploides. En ella se pudo observar que 4 individuos (#3, #25, #43 y #46) fueron genéticamente iguales, es decir son clones. El resto de los individuos fueron genotípicamente diferentes.

Mediante la determinación del número de bandas privadas (alelos o marcadores presentes en un citotipo o población y ausente en los restantes) y el análisis de la varianza molecular (AMOVA), se realizó además un análisis de diferenciación entre citotipos y entre poblaciones. El análisis del número de bandas privadas permitió determinar que, en general, las poblaciones poseen un alto porcentaje de bandas compartidas (Fig. 8). En el caso de la población P6, se observó la presencia de un alto número de bandas privadas (22), es decir que esta población posee variantes genéticas que no se encuentran en las demás poblaciones. En las poblaciones restantes se observó un bajo número de bandas privadas (entre 1 y 4), lo que indicaría una baja diferenciación genética entre ellas.

Mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) se determinó que, al analizar en conjunto todas las poblaciones, el mayor porcentaje de varianza se encontró entre poblaciones (70%), mientras que sólo un 30% de la varianza se debió a la variabilidad encontrada dentro de las poblaciones (Fig. 9A). Sin embargo, al realizar el análisis excluyendo a la población P6 (proveniente de Salta), se observó que el porcentaje de varianza molecular interpoblacional se redujo a un 60% (Fig. 9B). Al analizar por separado las poblaciones provenientes del Chaco (P1, P2 y P3) y Formosa (P4 y P5), se observó que la varianza interpoblacional disminuyó a un 34% y 19%, respectivamente (Fig. 9C y 9D), indicando una menor diferenciación entre poblaciones originarias de la misma región geográfica.

Para verificar la existencia de una relación entre las distancias geográficas y genéticas detectadas entre las poblaciones, se realizó un análisis de correlación, comparando las matrices de distancias geográficas y genéticas. El valor de R^2 , fue de 0,8198, indicando que existe una alta correlación positiva entre las variables de distancias genéticas y geográficas analizadas, la cual además fue significativa con un $P=0,004$ (Fig.10). Esto significa que a mayor distancia geográfica entre las poblaciones, mayor fue la distancia genética entre ellas.

Caracterización de la variabilidad genética entre las poblaciones con marcadores EST-SSR

A través del análisis de Coordenadas Principales se pudo observar que tanto los individuos como las poblaciones se encuentran más dispersos que en el análisis basado en los marcadores del tipo AFLP (Fig.11). No se pudo identificar agrupamientos tan concretos, aunque sí se observó una tendencia en la que las poblaciones P1 y P2, ocuparon una misma región del gráfico y no se observó una distancia genética muy marcada entre ellas. La población P3 en cambio, está más dispersa en el gráfico, por lo que se comporta como un nexo o puente entre las poblaciones P1 y P2 con las poblaciones P4 y P5. Estas dos últimas se encuentran principalmente separadas por la segunda coordenada principal, que explica el

21,23% de la variabilidad. Sin embargo fue posible observar que algunos individuos de la población P4 que tienen una mayor similitud genética con los individuos de la P5.

La población P6, cuya distancia genética en el análisis con el marcador molecular AFLP fue grande con respecto a las demás poblaciones, no presentó el mismo grado de diferenciación con el análisis utilizando EST-SSR. Esta población se agrupó con las poblaciones del Chaco, presentando una mayor similitud con estas poblaciones que con las poblaciones de Formosa.

Mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) se determinó que, al analizar en conjunto todas las poblaciones, el mayor porcentaje de varianza se encontró dentro de las poblaciones (70%), mientras que sólo un 30% de la varianza se debe a la variabilidad interpoblacional (Fig. 12A). Estos valores son opuestos a los obtenidos en el AMOVA calculado a partir de los datos de AFLP, en donde el mayor porcentaje de variación se dio entre poblaciones. Estos resultados estarían indicando que para los marcadores génicos considerados, las poblaciones son muy similares y conservan características génicas comunes.

También se realizaron los análisis de varianza agrupando las poblaciones en función de su origen geográfico. En todos los casos, el valor de varianza siempre fue mayor para la varianza intrapoblacional. En el análisis de las poblaciones P1, P2, P3, P4 y P5 los resultados no cambiaron con respecto al AMOVA considerando las 6 poblaciones (Fig. 12B). Sin embargo, al analizar por separado las poblaciones provenientes del Chaco (P1, P2 y P3) y Formosa (P4 y P5), se observó que la varianza intrapoblacional aumentó a un 83% y 75%, respectivamente (Fig. 12C y D), indicando una baja diferenciación entre poblaciones originarias de la misma región geográfica.

Al analizar el patrón de bandas para cada población (Fig. 13), se pudo determinar que sólo algunas de las poblaciones presentan unas pocas bandas privadas (poblaciones P1, P3 y P5). Esto indicaría que para los genes analizados no existe un alto grado de variación interpoblacional. Por otro lado, el mayor número de bandas se registró en las poblaciones constituidas por individuos triploides.

Discusión

El principal objetivo de esta tesina fue evaluar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones de *Paspalum unispicatum* y su relación con la disposición geográfica de las poblaciones analizadas, teniendo en cuenta los niveles de ploidía y los sistemas reproductivos que pueden encontrarse en esta especie multiploide.

Los resultados presentados muestran que existe una gran variabilidad genética, sobre todo intrapoblacional, entre los individuos de las 6 poblaciones estudiadas de *Paspalum unispicatum*. Las poblaciones diploides puras fueron las que presentaron mayores valores de diversidad genotípica, lo que podría estar relacionado con el modo en que los individuos con este nivel de ploidía se reproducen, ya que recientemente Galdeano y col. (2016) han publicado que los diploides se reproducen por sexualidad en condiciones de polinización abierta. Si bien se ha encontrado un gran número de genotipos en las poblaciones diploides, los mismos son genéticamente similares entre sí. Esta baja diversidad genética podría deberse al origen de las poblaciones, ya que las mismas podrían haberse establecido inicialmente a partir de unos pocos individuos, los que a su vez habrían originado nuevos individuos diploides para llegar a formar una población más grande.

Si bien en esta tesina no se ha determinado el sistema reproductivo de los individuos 3x, Galdeano y col. (2016) establecieron que, la planta 3x identificada como Q4211 (colectada a 10km noroeste de Pozo del Tigre, Formosa), se reproduce por apomixis. También se analizó el sistema reproductivo de algunos individuos 3x de la población P5 (Sartor, datos no publicados), los cuales fueron clasificados como apomícticos. Estos antecedentes nos permitirían inferir que la apomixis sería el principal modo de reproducción de los triploides de *P. unispicatum*. En poblaciones formadas por individuos de reproducción apomíctica es de esperar una baja diversidad genotípica y una alta uniformidad entre genotipos (Hörandl y Paun, 2007). Sin embargo, la presencia de un gran número de genotipos sería esperable en poblaciones apomícticas antiguas, sobre las cuales es posible observar el efecto de las fuerzas generadoras de variabilidad, como las mutaciones, los eventos de poliploidización recurrente y la sexualidad residual (Paun *et al.*, 2006a; Richards, 2003). Los resultados obtenidos para las poblaciones 3x aquí estudiadas sugieren que las mismas se tratarían de poblaciones antiguas, ya que las tres presentaron valores altos de diversidad genotípica y variables de diversidad genética, los cuales podrían ser el resultado de la acción de las fuerzas generadoras de variabilidad.

En el caso de la población P2, donde los triploides coexisten con individuos 2x y se encuentran próximos a otras poblaciones 2x, la poliploidización recurrente podría estar

formando nuevos triploides a partir de los individuos diploides [$2n(2x) + n(x)$]. Si bien los diploides se reproducen por sexualidad, podrían eventualmente formar sacos apospóricos los cuales podrían ser funcionales bajo determinadas condiciones. Eventos similares se han registrado en *Paspalum rufum*, en donde los diploides producen eventualmente sacos apospóricos no reducidos que pueden ser fecundados cuando la planta es forzada a autopolinizarse o cuando es polinizada con polen proveniente de individuos con nivel de ploidía diferente (Siena y col., 2008). Es posible que los individuos diploides de la población P2 sean sexuales y autoincompatibles y que, al no contar con polen de otros genotipos $2x$, utilice el polen propio rompiendo las barreras de autoincompatibilidad a través de polen mentor o que utilice polen proveniente de los individuos $3x$ ($n=x$). Ambos tipos de polen podrían fecundar un eventual saco apospórico $2n$ dando lugar a un nuevo triploide.

Es interesante destacar que la población P4 (formada exclusivamente por individuos $3x$) fue la que presentó menor uniformidad entre genotipos. Esto podría deberse a que la colección de esta población abarcó un mayor área geográfica, a lo largo de la cual podrían haberse establecido diferentes genotipos triploides los que se multiplicaron luego por la vía apomítica. Las otras dos poblaciones con predominancia de triploides, presentaron individuos con genotipos muy similares e inclusive, idénticos en algunos casos, indicando la presencia de clones. Sin embargo, los niveles de diversidad genotípica aún son mayores a los que podrían esperarse teniendo en cuenta que los triploides de esta población probablemente son apomíticos.

En el caso de la población P5, se ha encontrado que junto a los individuos $3x$ coexisten algunos individuos $4x$. Estos $4x$ podrían haberse originado por poliploidización recurrente [$2n(3x) + n(x)$] a partir de los triploides, proceso por el cual, según Quarín (1992) se originan los tetraploides en las especies de *Paspalum*. Los tetraploides de la población P5, al igual que otros $4x$ ya caracterizados (Galdeano y col., 2016) podrían estar generando nuevos individuos $4x$ por la vía sexual, gracias a que aún conservan la capacidad de generar progenie por esta vía (sexualidad residual). Este tipo de reproducción podría explicar el hecho de que dentro de esta población se hayan encontrado altos valores de variabilidad, ya que cuatro de los individuos estudiados en esta población fueron $4x$ y presentaron genotipos diferentes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para algunas razas tetraploides naturales de *Paspalum notatum*, en las que se pudo determinar, mediante análisis cito-embriológicos y moleculares, que existen genotipos $4x$ naturales de reproducción apomítica que conservan en mayor o menor grado algún potencial para la reproducción sexual (Ortiz *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2001; Espinoza *et al.*, 2006; Rebozzio *et al.*, 2010).

El caso de la población P6, resulta diferente a las demás poblaciones. Al tratarse de una población puramente tetraploide, cuyo sistema reproductivo sería principalmente la apomixis, sería esperable que presentara una baja variabilidad y un reducido número de genotipos. Sin embargo, P6 presentó un alto grado de diversidad genotípica acompañado de un grado de heterogeneidad también alto. Resultados similares fueron observados en poblaciones de *Paspalum nicorae* conformadas por individuos 4x de reproducción apomítica facultativa. En el caso de esta especie, se ha propuesto que la sexualidad residual sería la principal fuente de variabilidad (Sartor *et al.*, 2013). El hecho de que la población P6 de *P. unispicatum* presente características similares a las de las poblaciones de *P. nicorae*, nos permitiría inferir que para esta población, la sexualidad residual también sería la fuente principal de variabilidad, la que estaría generando nuevas combinaciones genotípicas dentro de la población.

Al analizar la variabilidad interpoblacional y el flujo genético entre poblaciones se pudo establecer que existe, en función a las distancias genéticas observadas entre individuos, un agrupamiento de las poblaciones en función del origen geográfico: aquellas provenientes del Chaco (Poblaciones P1, P2 y P3), las originarias de Formosa (Poblaciones P4 y P5) y la población coleccionada en Salta (Población P6).

El primer grupo (proveniente del Chaco) está compuesto por dos poblaciones diploides puras (P1 y P3) y una población mixta integrada por individuos en su mayoría triploides y unos pocos diploides (P2). La similitud entre los genotipos de las tres poblaciones fue bastante alta, lo que indicaría que las mismas no se encuentran aisladas, sino que existe un flujo genético entre los individuos de estas poblaciones. El hecho de que los triploides sean genéticamente similares a los diploides podría estar sugiriendo que las plantas 3x estarían siendo generadas a partir de la fecundación de gametos no reducidos producidos por individuos 2x ($2n=2x + n=x$). A su vez estos 3x podrían estar aumentando el número de individuos 3x por apomixis.

Una situación similar de base genética compartida fue observada entre las poblaciones provenientes de Formosa (P4 y P5). Entre estas poblaciones, la variabilidad genética interpoblacional fue menor aún que entre las poblaciones del Chaco. Este hecho podría estar relacionado con el citotipo que predomina en Formosa. El hecho de que casi todos los individuos sean triploides (entre los que predominaría la reproducción apomítica), sugiere que estas poblaciones podrían haberse establecido a partir de algunos individuos 3x, los cuales a través de la reproducción apomítica, aumentaron el tamaño poblacional y lograron colonizar gran parte de la región.

Es interesante destacar que las poblaciones del Chaco y Formosa son genéticamente más similares entre sí, en comparación con la población proveniente de Salta. Teniendo en cuenta

que las poblaciones P1 y P3 están compuestas por diploides, es posible sugerir que éstos podrían haber originado triploides a través de la fecundación de gametos no reducidos ($2n=2x + n=x$), los que lograron establecer las poblaciones de Formosa. En *Paspalum*, los citotipos triploides generalmente forman parte de los complejos agámicos y se encuentran en una muy baja frecuencia en las poblaciones naturales, actuando como puente de transferencia de genes desde los diploides sexuales coespecíficos a sus contrapartes tetraploides (Quarin 1992). El hecho de haber encontrado individuos 4x en una de las poblaciones 3x de Formosa y que estos 3x presenten similitudes genéticas con los diploides del Chaco sugiere que existe un flujo genético entre 2x y 4x, en el que los 3x actúan como un puente que conecta ambos niveles de ploidía. Sin embargo en el caso de *P. unispicatum*, los triploides no sólo estarían actuando como puente para transferir genes entre diploides y tetraploides, sino que en combinación con la apomixis constituirían un sistema más exitoso para competir y adaptarse en los hábitat disponibles, en donde tendrían la posibilidad de establecerse formando poblaciones. Este tipo de triploides apomícticos exitosos se ha observado también en *P. quadrifarium*, en donde los triploides constituyen el citotipo más comúnmente encontrado, con una amplia distribución geográfica (Quarin y Lombardo, 1986).

En el caso del tercer grupo, los individuos provenientes de Salta (Población P6), se encontrarían genéticamente diferenciados de los individuos de las poblaciones de Chaco y Formosa. El hecho de que exista una mayor separación geográfica entre las poblaciones de Chaco y Formosa con respecto a la población de Salta, podría estar indicando la presencia de barreras geográficas que impedirían el flujo genético entre estas poblaciones. Además, se observaron bandas privadas en la población 4x de Salta, lo cual reafirmaría la hipótesis de una barrera geográfica entre poblaciones, la que mantendría aislada la variabilidad contenida en esta población. Los resultados obtenidos del análisis de variabilidad interpoblacional sugieren que entre las poblaciones estudiadas, existe una relación entre distancias genéticas y distancias geográficas. Esta relación fue corroborada mediante un análisis de correlación, la cual resultó ser positiva y altamente significativa. Esto quiere decir que a mayor distancia geográfica, mayor es la distancia genética entre poblaciones.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesina indican que tanto los marcadores moleculares del tipo AFLP como los del tipo EST-SSR son herramientas eficaces para caracterizar los perfiles genéticos de individuos de diferentes niveles ploidía de poblaciones naturales de *Paspalum unispicatum*. Debido a la naturaleza de los marcadores mencionados, se observó que los datos obtenidos a partir de los marcadores de AFLP son más confiables el análisis de variabilidad genética, ya que se obtiene un perfil genético con una mayor cantidad de bandas y se reduce el error experimental.

En cuanto al estudio de la variabilidad genética de las poblaciones, los resultados revelan que la especie multiploide *P. unispicatum* presenta una gran diversidad genética y genotípica asociada a los citotipos y sus sistemas reproductivos. Las poblaciones diploides de reproducción sexual presentaron mayores niveles de variabilidad, mientras que entre las poblaciones con citotipos poliploides y apomícticos existe un amplio rango de diversidad: desde poblaciones constituidas por pocos genotipos con alta variabilidad genética, hasta poblaciones donde la mayoría de los individuos representan genotipos diferentes, pero que tienen mayores similitudes entre sí. Esta diversidad encontrada entre las poblaciones es el reflejo de la variedad de sistemas genéticos que presenta *P. unispicatum* y su interacción con los mecanismos que generan variabilidad en las poblaciones naturales.

La coexistencia de individuos triploides, por un lado con diploides y, por el otro, con individuos tetraploides, confirmaría la existencia de flujo génico entre diploides y tetraploides, en donde los triploides actuarían como un puente para la transferencia de genes. También es posible decir que estos citotipos estarían formando una unidad evolutiva cohesiva en la cual el conjunto de genes es compartido por las razas que conforman el complejo agámico. Por otra parte, es posible decir que existe una estrecha relación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre poblaciones.

El conjunto de los resultados obtenidos en esta tesina pone en evidencia la gran dinámica existente entre las poblaciones naturales de la especie *Paspalum unispicatum*, lo cual está estrechamente relacionado con el sistema genético de la especie y su distribución geográfica. Esta tesina provee información valiosa desde el punto de vista de la conservación de los recursos naturales, ya que *P. unispicatum* es una de las especies de mayor valor forrajero dentro del estrato herbáceo de los bosques nativos de la Región Fitogeográfica Chaqueña. Esta información podría ser utilizada en programas de mejoramiento genético de forrajeras que involucren especies nativas.

Tablas

Tabla 1. Origen y nivel de ploidía de las plantas analizadas, pertenecientes a seis poblaciones naturales de *Paspalum unispicatum*, colectadas en Argentina.

Población	Origen	Nº Individuos	Ploidía
P1	Avia Terai, Chaco	13	2x
P2	Colonia José Mármol, Chaco	3	2x
		9	3x
P3	El Boquerón, Chaco	15	2x
P4	Ibarreta, Formosa	32	3x
P5	Pozo del Tigre, Formosa	11	3x
		4	4x
P6	Metán, Salta	15	4x

Tabla 2. Componentes de mezcla de digestión *EcoRI-MseI*.

Componentes	Concentración final
Buffer OPA	1X
DTT	5 mM
<i>EcoRI</i>	5 unidades
<i>MseI</i>	5 unidades
ADN	1 µg

Tabla 3. Componentes de mezcla de preamplificación.

Componentes	Concentración final
Producto de ligación	2 µl
dNTP's	1.2 ng/µl
Cebador E01	30 ng
Cebador M01	30 ng
GoTaq	1 unidad
Buffer	1X

Tabla 4. Esquema de ciclado de preamplificaciones.

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1 ciclo	94 °C	60 s
20 ciclos	94 °C	30 s
	56 °C	60 s
	72 °C	60 s
1 ciclo	72 °C	120 s

Tabla 5. Combinaciones de cebadores E y M ensayadas para las amplificaciones selectivas de AFLP. Las combinaciones de primers fueron denominadas de la siguiente manera: A (E31M31), B (E33 M31), C (E31M32), D (E33M32), E (E31M33), F (E33M33), G (E31M35) y H (E33M35).

Nomenclatura	Combinación de cebadores	Secuencia de cebadores
A	E31	5' -GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
	M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA A-3'
B	E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
	M31	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA A-3'
C	E31	5' -GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
	M32	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA C-3'
D	E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
	M32	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA C-3'
E	E31	5' -GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
	M33	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA G-3'
F	E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
	M33	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA G-3'
G	E31	5' -GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
	M35	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC A-3'
H	E33	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3'
	M35	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC A-3'

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

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1 a 13	94 °C	30s
	65 °C	30s
	72 °C	60s
14 a 24	94 °C	30s
	56 °C	30s
	72 °C	60s

Tabla 7. Protocolo de amplificación EST-SSR.

Componentes	Concentración final*
H ₂ O	
Buffer con Cl ₂ Mg	5X
dNTP's	5mM
Cebador Forward	5μM
Cebador Reverse	5μM
GoTaq	5 U/μl
ADN	10ng/μl

*Para un volumen final de 25μl

Tabla 8. Individuos utilizados en la amplificación de prueba de cebadores de AFLP, detallando su nivel de ploidía.

Individuo	Población a la que pertenece	Nivel de ploidía
#73	P1	2x
#5	P3	2x
#27	P4	3x
#12	P2	3x
#1	P5	4x
#7	P5	4x

Tabla 9. Individuos utilizados en la amplificación de prueba de cebadores de EST-SSR, detallando su nivel de ploidía.

Individuo	Población a la que pertenece	Nivel de ploidía
#1	P2	2x
#3	P2	2x
#3	P3	3x
#15	P3	3x
#5	P5	4x
#6	P5	4x

Tabla 10. Número de marcadores obtenidos con dos combinaciones de primers de AFLP en seis poblaciones naturales de *Paspalum unispicatum*.

Número de bandas observadas		
	Primers E31M35	Primers E33M33
Nº bandas monomórficas	8	2
Nº bandas polimórficas	42	82
Subtotal	50	84
Total	134	

Tabla 11. Índices de diversidad clonal obtenidos a partir de marcadores moleculares del tipo AFLP.

Índices de diversidad clonal					
Población	Número de individuos (N)	Número de genotipos (G)	Proporción de genotipos distinguibles (G/N)	Diversidad genotípica (D)	Uniformidad genotípica (E)
P1	12	9	7	0,94	0,8
P2	10	5	4	0,8	0,71
P3	10	9	8	0,98	0,93
P4	17	10	5	0,84	0,47
P5	14	12	11	0,98	0,91
P6	15	9	7	0,91	0,76

Tabla 12. Número de bandas observadas de dos primers de EST-SSR en seis poblaciones naturales de *Paspalum unispicatum*.

Número de bandas observadas	
Primer 124	Primer 143
8	14

Tabla 13. Índices de diversidad clonal obtenidos a partir de marcadores moleculares del tipo EST-SSR.

Índices de diversidad clonal					
Población	Número de individuos (N)	Número de genotipos (G)	Proporción de genotipos distinguibles (G/N)	Diversidad genotípica (D)	Uniformidad genotípica (E)
P1	13	9	6	0,91	0,70
P2	12	8	5	0,85	0,56
P3	15	5	2	0,48	0,36
P4	32	12	2	0,61	0,21
P5	15	6	2	0,57	0,36
P6	15	8	4	0,79	0,48

Figuras

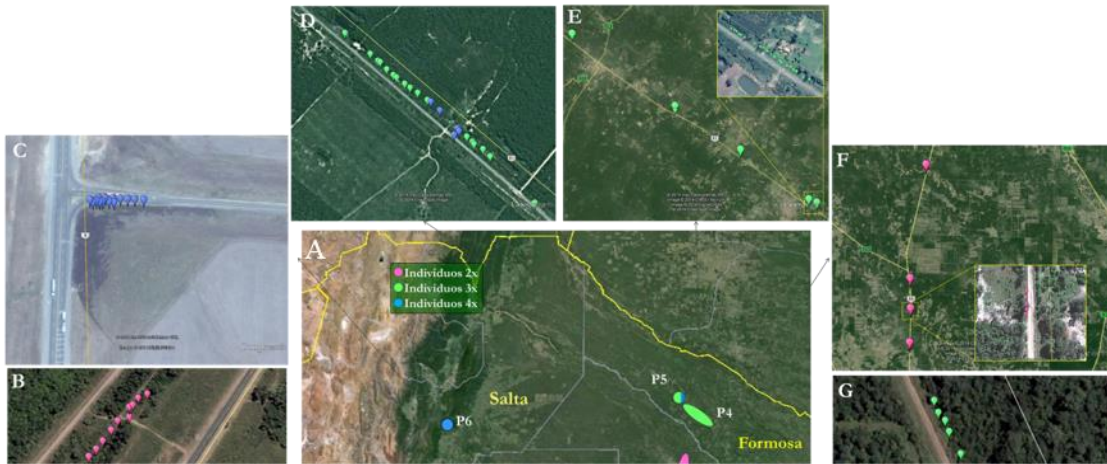


Fig. 1. A. Localización geográfica de las 6 poblaciones de *P. unispicatum* estudiadas. B – G. Detalle de la distribución de los individuos en las poblaciones. Los diferentes niveles de ploidía se indican con colores.

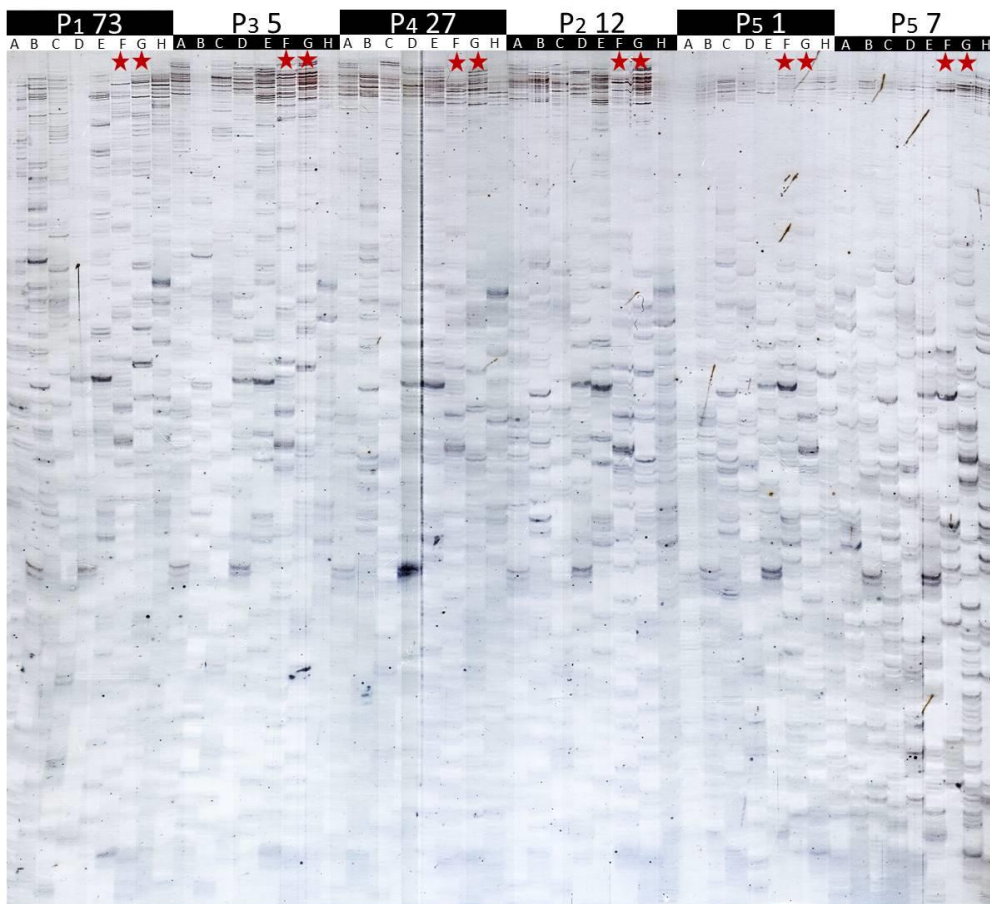


Fig. 2. Amplificación de 8 combinaciones diferentes de cebadores en 6 individuos representativos. Las combinaciones de cebadores se simbolizan desde la A hasta la H: A (E31 M31), B (E33 M31), C (E31 M32), D (E33 M32), E (E31 M33), F (E33 M33), G (E31 M35) y H (E33 M35). Las estrellas indican los cebadores seleccionados por presentar mayor número de marcadores en un perfil claro y reproducible.

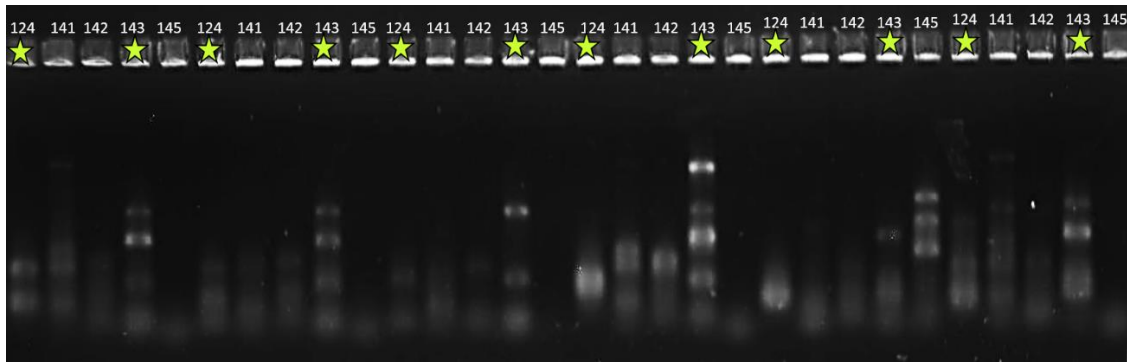


Fig. 3. Amplificación de 5 cebadores diferentes de EST-SSR en 6 individuos representativos. Las estrellas indican los cebadores seleccionados por presentar mayor número de marcadores en un perfil claro y reproducible. Los individuos analizados fueron: P₂1, P₂3, P₃3, P₃15, P₅5 y P₅6.

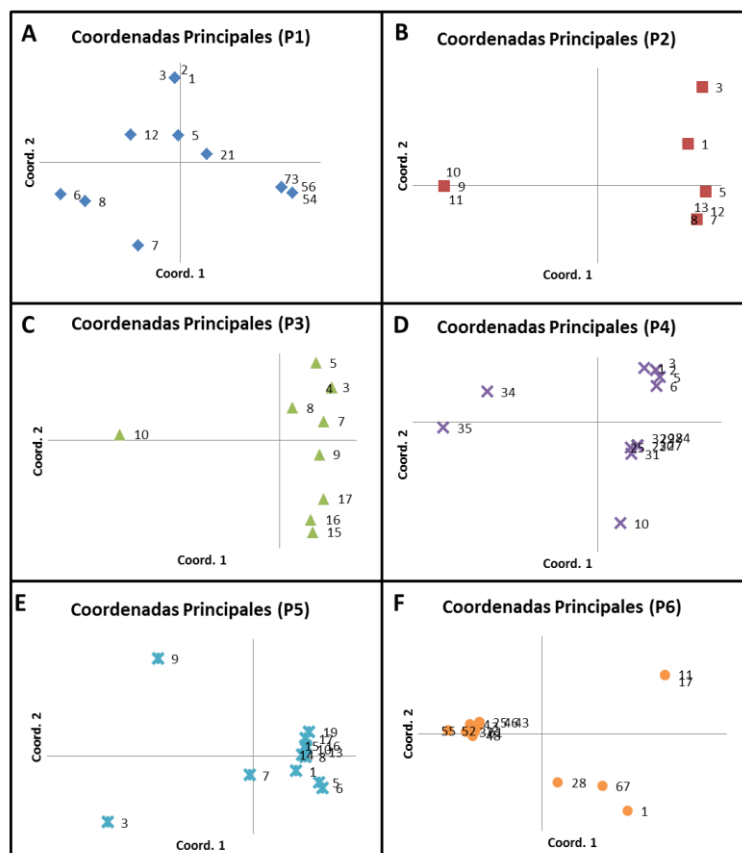


Fig. 4. Relación genética total entre individuos de la misma población, evaluada a partir del análisis de coordenadas principales (en inglés Principal Coordinates Analysis, PCA) a partir de marcadores moleculares del tipo AFLP: A) Población P1; B) Población P2; C) Población P3; D) Población P4; E) Población P5 y F) Población P6.

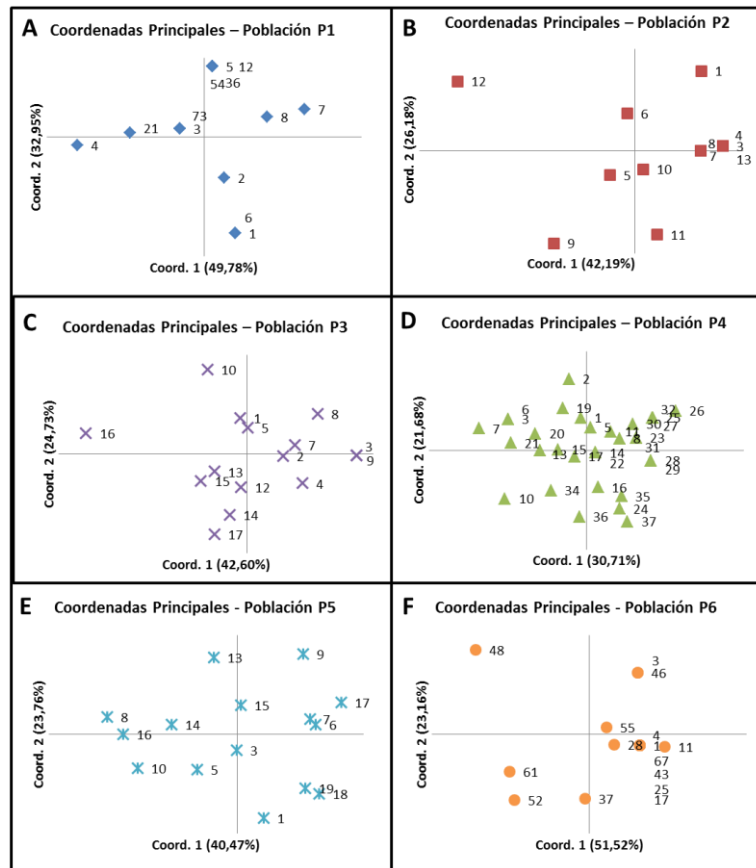


Fig. 5. Relación genética total entre individuos de la misma población, evaluada a partir del análisis de coordenadas principales (en inglés Principal Coordinates Analysis, PCA) a partir de marcadores moleculares del tipo EST-SSR: A) Población P1; B) Población P2; C) Población P3; D) Población P4; E) Población P5 y F) Población P6.

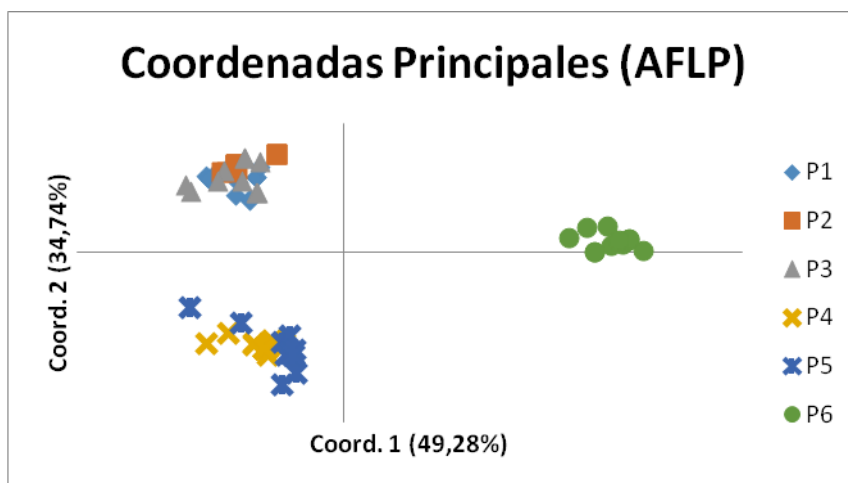


Fig. 6. Relación genética total entre poblaciones, evaluada a partir del análisis de coordenadas principales (en inglés Principal Coordinates Analysis, PCA) a partir de marcadores moleculares del tipo AFLP.

Dendrograma de similitud genética entre individuos

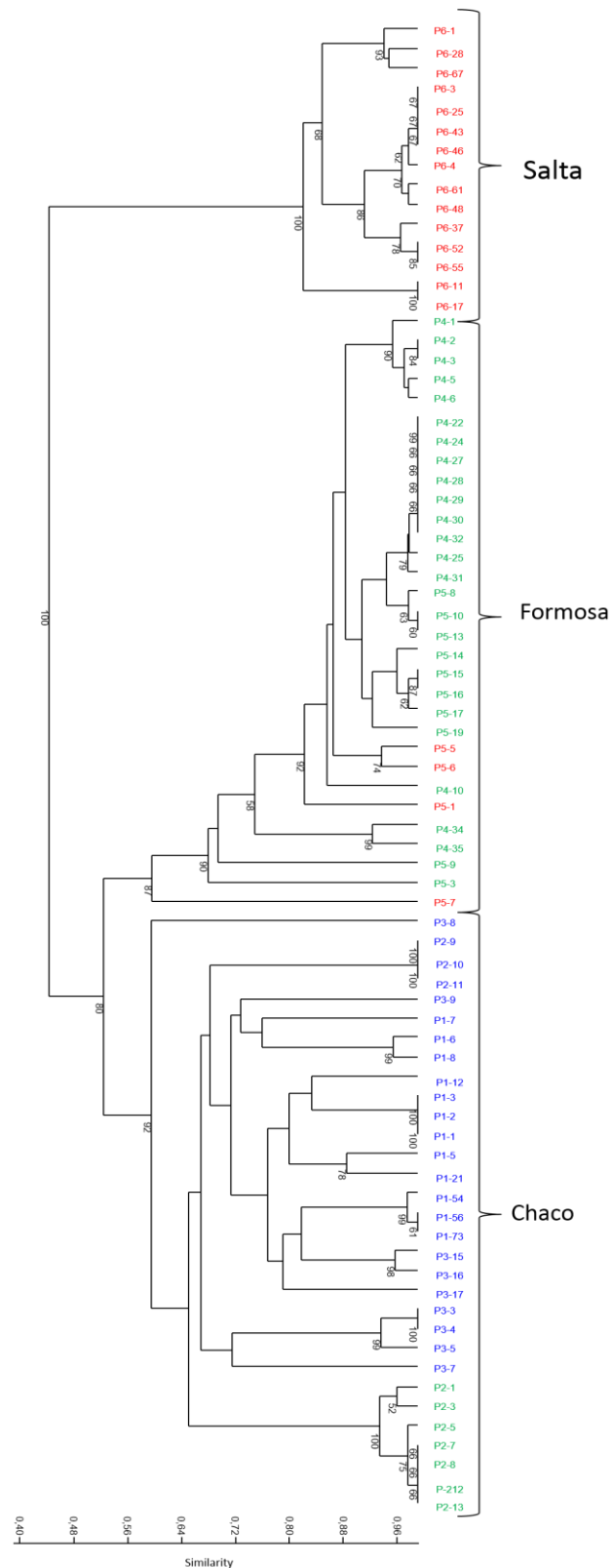


Figura 7: Gráfico de similitud genética intra e interpoblacional, construido por el método UPGMA. Con azul se indican los individuos diploides (2x), con verde, los triploides (3x) y con rojo, los individuos tetraploides (4x). Las llaves referencian el lugar de origen de cada grupo de individuos.

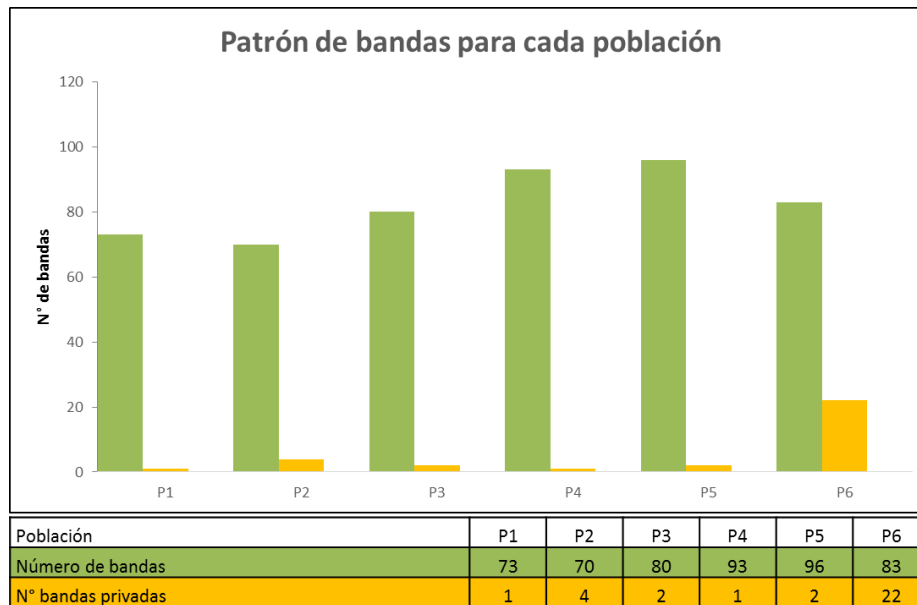


Fig. 8. Patrón de bandas para cada población obtenido a partir de marcadores moleculares del tipo AFLP.

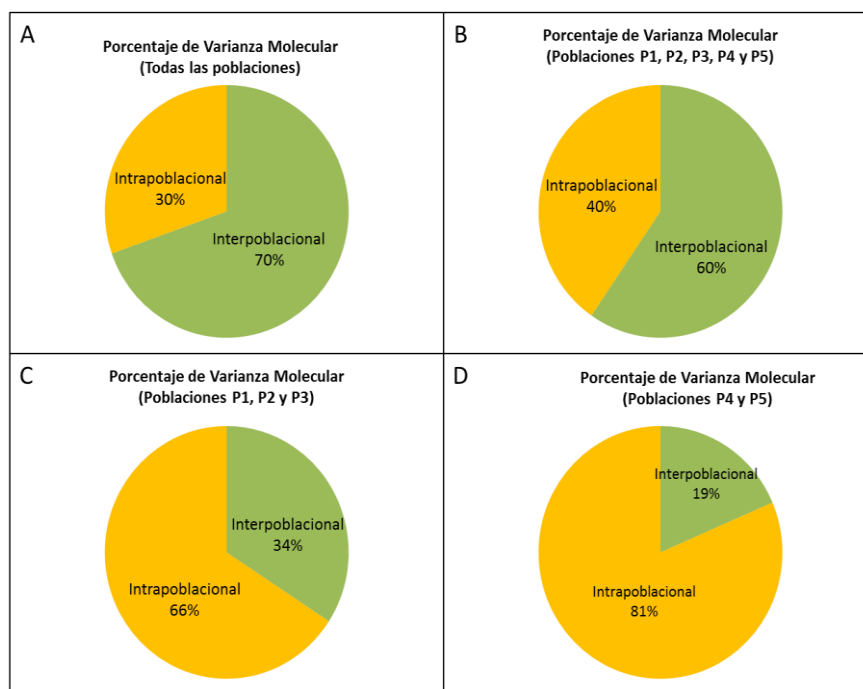


Fig. 9. Análisis del porcentaje de varianza molecular (AMOVA) entre poblaciones, en base a marcadores moleculares AFLP: A) Entre todas las poblaciones; B) Entre poblaciones P1, P2, P3, P4 y P5; C) Entre poblaciones P1, P2 y P3; D) Entre poblaciones P4 y P5.

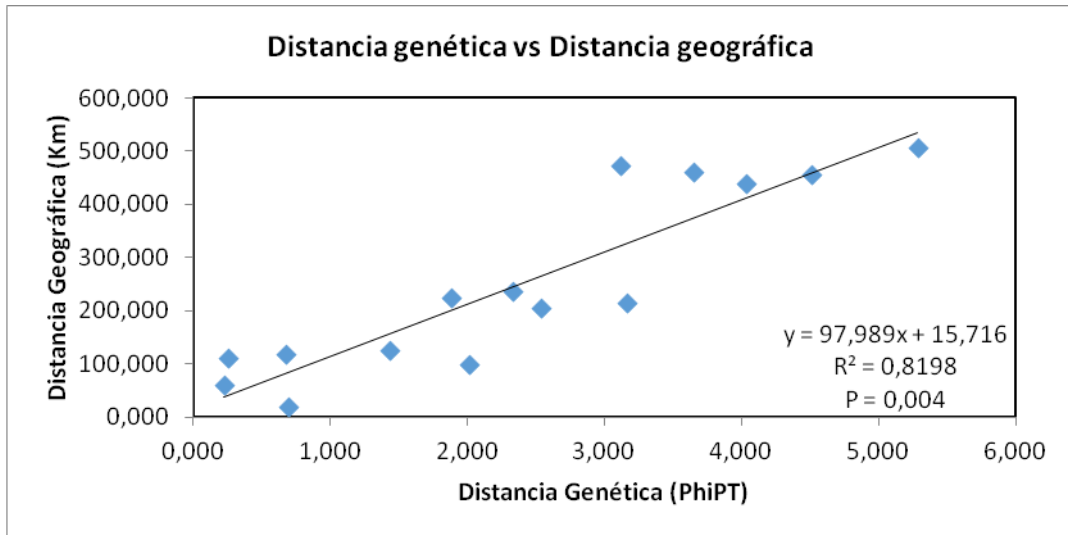


Fig. 10. Análisis de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones analizadas, en base a marcadores moleculares AFLP.

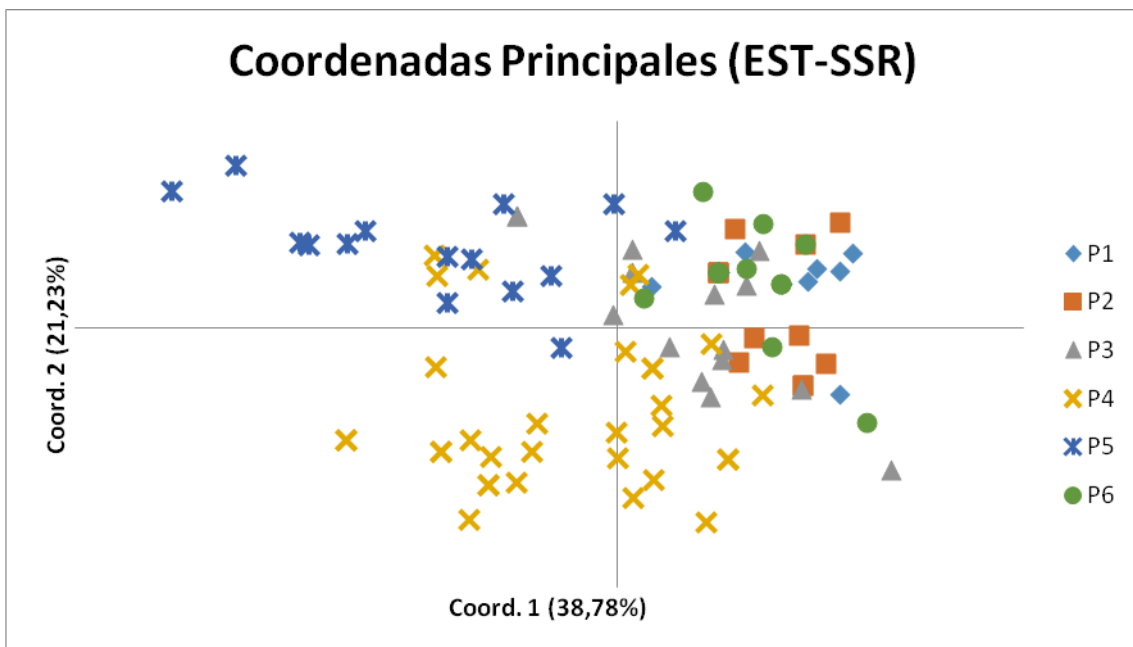


Fig. 11. Relación genética total entre poblaciones, evaluada a partir del análisis de coordenadas principales (en inglés Principal Coordinates Analysis, PCA) a partir de marcadores moleculares del tipo EST-SSR.

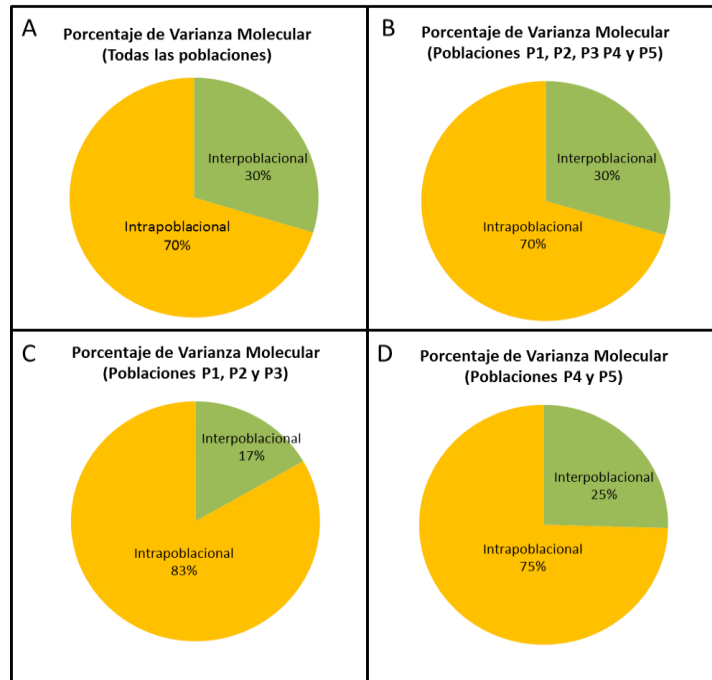


Fig. 12. Análisis del porcentaje de varianza molecular (AMOVA) entre poblaciones, en base a marcadores moleculares EST-SSR: A) Entre todas las poblaciones; B) Entre poblaciones P1, P2, P3, P4 y P5; C) Entre poblaciones P1, P2 y P3; D) Entre poblaciones P4 y P5.

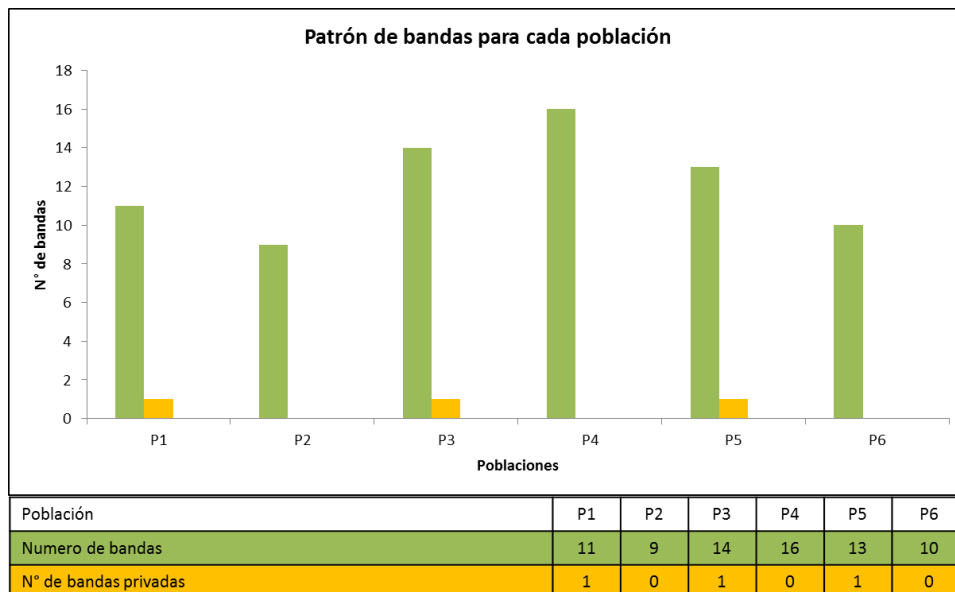


Fig. 13. Patrón de bandas para cada población a partir de marcadores moleculares del tipo EST-SSR.

Bibliografía

- Bashaw EC, Hovin AW, Holt EC (1970). Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. M.J.T. Norman, eds. *Proceed International Grassland Congress*, 11th, Surfers Paradise, QLD, Australia. 13–23 Apr. 1970. St. Lucia: University of Queensland Press. 245–248.
- Bayer RJ (1990). Patterns of clonal diversity in the *Anntenaria rosea* (Asteraceae) polyploid agamic complex. *American Journal of Botany* **77**:1313-1319.
- Brugnoli EA, Urbani MH, Quarín CL, Zilli AL, Martínez EJ, Acuña CA (2014). Diversity in Apomictic Populations of *Paspalum simplex* Morong. *Crop Science* **54**:1–9.
- Burson BL (1997). Apomixis and sexuality in some *Paspalum* species. *Crop Science* **34**:1347-1351.
- Burton GW (1948). The method of reproduction in common bahia grass, *Paspalum notatum*. *Journal of the American Society of Agronomy* **40**:443-452.
- Burton GW, Forbes IJr (1960). The genetics and manipulation of obligate apomixis in Common bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge). En: *Proceedings of the XVI International Grassland Congress*. Oxford, Gran Bretaña pp. 66-71.
- Burton GW, Hanna WW (1986). Bahiagrass tetraploids produced by making (apomictic tetraploid x diploid) x diploid hybrids. *Crop Science* **26**:1254–1256.
- Cidade FW, Dall'Agnol M, Bered F, De Souza-Chies TT (2008). Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flugge (Paniceae: Panicoideae). *Genetic Resources and Crop Evolution* **55**:235–246. doi: 10.1007/s10722-007-9231-8.
- Correa RJ, Quiroga A, Watkins PH (2002). Valor Nutritivo Estival de Especies Forrajeras Herbáceas del Pastizal Natural de la Subcuenca del Río Los Puestos, Ambato, Catamarca. *Congreso Regional de Ciencia y Tecnología*. Secretaría de Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Catamarca.
- Daurelio LD, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC (2004). Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematics and Evolution* **244**:189-199.
- Ellstrand NC, Roose ML (1987). Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**:123-131.

- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM, Quarin CL (2006). Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution* **258**:147-159.
- Galdeano F, Urbani MH, Sartor ME, Honfi AI, Espinoza F, Quarin CL (2016). Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research*. DOI 10.1007/s10265-016-0813-4.
- Gates RN, Quarin CL, Pedreira CGS (2004). Bahiagrass. In: L.E. Moser et al., editors, Warm-season (C4) grasses. *Agronomy Monograph* **45**. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 651–680.
- Hanna WW, Burton GW (1986). Cytogenetics and breeding behavior of an apomictic triploid in bahiagrass. *Journal of Heredity* **77**:457–459.
- Hanna WW, Bashaw EC (1987). Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science* **27**:1136-1139.
- Hörandl E, Paun O (2007). Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials and ecology. En: Hörandl E, Grossniklaus U, Van Dijk PJ & Sharbel T (eds). *Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives*. ARG-Gantner Ruggell; Liechtenstein pp. 169-174.
- Houlston GJ, Chapman HM (2004). Reproductive strategy and population variability in the facultative apomict *Hieracium pilosella* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **91**:37-44.
- Jungmann L, Vigna BB, Boldrini KR, Sousa AC, do Valle CB, Resende RM, et al. (2010). Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. *Genome* **53**:698–709. doi:10.1139/G10-055
- Levin D (2002) The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford University Press: New York.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarin CL, Ortiz JPA (2001). Inheritance of apospory, *Paspalum notatum*. *Hereditas* **135**:19-25.
- Meirmans PG, Van Tienderen PH (2004). Genotype and Genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* **4**:792–794
- Menken SBJ, Smit E, Den Nijs HJCM (1995). Genetical structure in plants: Genetical flow between diploid sexual and triploid asexual dandelion (*Taraxacum* section *Rudelaria*). *Evolution* **49**:1108-1118.

- Navarro HE (2002). Catamarca, Regiones fitogeográficas. Página web http://www.catamarcaguaia.com.ar/Geografia/Reg_Fitogeograficas.php
- Nogler GA (1984a). Gametophytic apomixis. En: Johri BM (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin pp. 475-518.
- Nogler GA (1984b). Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusions. *Botanica Helvetica* **94**:411-422.
- Norrman GA, Quarin CL, Burson BL (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* **80**:24-28.
- Norrman GA, Bovo OA, Quarin CL (1994). Post-zygotic seed abortion in sexual diploid X apomictic tetraploid intraspecific *Paspalum* crosses. *Australian Journal of Botany* **42**:449-456.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD, Quarin CL (1997). Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theoretical and Applied Genetics* **95**:850-856.
- Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña CA, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* **112**:767-787. doi:10.1093/aob/mct152
- Paun O, Hörandl E (2006). Evolution of hypervariable microsatellites in apomictic polyploid lineages of *Ranunculus carpaticola*: directional bias at dinucleotide loci. *Genetics* **174**:387-398.
- Paun O, Greilhuber J, Temsch E, Hörandl E (2006a). Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). *Molecular Ecology* **15**:897-910.
- Paun O, Stuessy TF, Hörandl E (2006b). The role of hybridization, polyploidization and glaciation in the origin and evolution of the apomictic *Ranunculus cassubicus* complex. *New Phytologist* **171**:223-236.
- Quarin CL (1992). The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* **5**:8-15.
- Quarin CL, Burson BL, Burton GW (1984). Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Botanical Gazette* **145**:420-426.
- Quarin CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC, Bovo OA (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* **1**:243-249.

- Quarin CL, Hanna WW (1980). Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* **20**:69-75.
- Quarin CL, Lombardo EP (1986). Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* **7**:101-107.
- Quarin CL, Norrmann GA (1987). Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. En: *Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica*, Bogotá, Colombia **3**:25-35.
- Quarin CL, Norrmann GA, Urbani MH (1989). Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsletter* **2**:44-46.
- Quarin CL, Pozzobon MT, Valls JFM (1996). Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wildforage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica* **90**:345-349.
- Rebozzio RN, Rodríguez MP, Stein J, Quarin CL, Ortiz JPA, Espinoza F (2010). Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. *Molecular Breeding* DOI 10.1007/s11032-010-9537-7.
- Renolfi RF (1990). Ecosistema Chaqueño. En: *Introducción, conservación y evaluación de germoplasma forrajero en el Cono Sur*. Editor: Dr. Juan P. Puignau.
- Reyno, R, Narancio R, Speranza P, Do Canto J, Lopez Carro B, Hernandez P, Burgueno J, et al., (2012). Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge) native to Uruguay. *Genet. Resour. Crop Evolution* **59**:1823–1832. doi:10.1007/s10722-012-9806-x.
- Richards AJ (2003). Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society. London B* **358**:1085-1093.
- Rosengurtt B, Arrillaga de MB, Izaguirre A (1970). Gramíneas uruguayas. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay 490 pp.
- Sartor ME, Quarin CL, Urbani MH, Espinoza F (2011). Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Systematics and Evolution* **293**:31–41.
- Sartor, M.E., R.N. Rebozzio, C.L. Quarin, and F. Espinoza (2013). Patterns of genetic diversity in natural populations of *Paspalum* agamic complexes. *Plant Systematics and Evolution* **299**:1295–1306. doi:10.1007/s00606-013-0797-7
- Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarin CL, Ortiz JPA (2008). Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent autopolyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction* **21**: 205–215.

- Siena LA, Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F, Ortiz JPA (2014). Transference of Wheat Expressed Sequence Tag–Simple Sequence Repeats to *Paspalum* Species and Cross-Species Amplification of *Paspalum notatum* Simple Sequence Repeats: Potential Use in Phylogenetic Analysis and Mapping. *Crop Science* **54**:1–15. doi: 10.2135/cropsci2013.04.0275.
- Sousa ACB, Jank L, de Campos T, Sforca DA, Zucchi ME, de Souza AP (2011). Molecular diversity and genetic structure of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.), a tropical pasture grass. *Tropical Plant Biology* **4**:185–202. doi: 10.1007/s12042-011-9081-6.
- Urbani MU, Quarin CL, Espinoza F, Penteado MIO, Rodrigues IF (2002). Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Systematic and Evolution* **236**:99–105.
- Vos PR, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters, A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**:4407-4414.