



*Universidad Nacional del Nordeste*



*Facultad de Ciencias Agrarias*

**Doctorado de la Universidad Nacional del Nordeste en el “Área Recursos Naturales”**

**Tesis para optar al Título de Doctor de la UNNE, en el  
Área de Recursos Naturales**

**Estudios citogenéticos clásicos y moleculares  
en *Andropogon* Sección *Notosolen* Stapf. del cono  
sur de Sudamérica.**

**Doctorando: Ing. Agr. María Irma de las Mercedes Hidalgo**

**Director: Dr. Guillermo A. Norrmann**

**Co-Director: Dr. Eduardo J. Greizerstein**

**Ciudad de Corrientes, República Argentina**

**2021**

**Estudios citogenéticos clásicos y moleculares en *Andropogon* Sección *Notosolen*  
Stapf. del cono sur de Sudamérica.**

María Irma de las Mercedes Hidalgo

Ingeniera Agrónoma-Faculta de Ciencias Agrarias-UNNE

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar el grado académico de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en el Área de Recursos Naturales. La misma no ha sido presentada con anterioridad para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio Genética y Mejoramiento de especies forrajeras (Cátedra de Genética) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE); Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET); Laboratorio de Biotecnología de la Cátedra de Mejoramiento Genético de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora (UNLZ); Laboratorio de Citogenética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UBA), bajo la dirección del Dr. Guillermo A. Norrmann, Profesor Titular Cátedra de Genética (FCA-UNNE), Docente-Investigador de la UNNE y el Dr. Eduardo J. Greizerstein Profesor Asociado-Docente –Investigador (FCA-UNLZ).

Dr. Guillermo A. Norrmann .....

Dr. Eduardo J. Greizerstein.....

Ing. Agr. María Irma de las Mercedes Hidalgo.....

Fecha de defensa: 26/05/2022

*A mis padres: Irma y Mirabeau  
quienes me inculcaron el amor por el  
estudio, el trabajo y la creatividad,  
siempre están acompañándome.  
A Memo, mi compañero de vida.*

*“Si sabes que estás en el camino correcto, si lo sientes, entonces...  
no importa lo que digan.”*

**Bárbara Mc Clintock**

## **RECONOCIMIENTOS**

En primer lugar, mi reconocimiento a las Instituciones que hicieron posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, por brindarme un lugar en su casa y siempre estar presente en cada crecimiento personal.

Al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-UNNE-CONICET), por brindarme el ámbito adecuado para realizar este trabajo.

Al Doctorado en el Área de Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, por haberme permitido desarrollar esta Tesis.

A las autoridades de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, por haberme brindado un espacio académico donde poder formarme.

Al Dr. Carlos Rossi, Decano y a las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora, por haberme permitido realizar gran parte de este trabajo en esa Institución.

Al Dr. Cesar López, titular de la Cátedra de Mejoramiento Genético, por haberme aceptado como una integrante más del laboratorio.

### **Financiamientos:**

A la Universidad Nacional del Nordeste por el financiamiento otorgado a mi Director a través de la Secretaría General de Ciencia y Técnica (SGCyT).

A la Universidad Nacional de Lomas de Zamora por el financiamiento otorgado a mi Codirector a través de los LOMACyT.



## AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a todas y cada una de las personas que me alentaron, apoyaron y acompañaron durante cada instancia de esta maravillosa experiencia, para poder llevar adelante este trabajo.

A mi director, el Dr. Guillermo Norrmann, por haber confiado en mí desde mi etapa de estudiante de grado. Gracias por transmitirme esa pasión por los *Andropogon*. Gracias por estar siempre, contenerme y alentarme en los momentos en que las cosas se ponían difíciles. Gracias por compartir conmigo tu tiempo, tus ideas, tus visiones que sin duda fueron parte fundamental de este trabajo, y obviamente, las horas de charlas. ¡Gracias Guillermo!

A mi Co-Director el Dr. Eduardo Greizerstein, por estar siempre presente y por acompañarme en esta experiencia. Por depositar en mí su confianza desde el principio, por brindarme los medios, los materiales y las posibilidades para llevar adelante esta propuesta. Por toda su enseñanza, sus consejos, su paciencia, sus críticas y sugerencias. Ha trabajado codo a codo conmigo, me ha contagiado su entusiasmo por la citogenética y, lo que es para mí mucho más importante, me ha brindado su incondicional amistad. ¡Gracias Eduardo...!!!

Mis agradecimientos a la Lic. Irene Caponio, por enseñarme muchísimo, Taxonomía, Botánica, Genética, Citogenética, manejo del invernáculo, trabajar en un laboratorio...docencia...y cuántas cosas más...!!! Pasamos por mucho amiga... Gracias Ire, por todo lo que me brindaste y transmitiste.

Un agradecimiento especial al Ing. Camilo Quarín, porque siempre ha tenido la palabra amiga, el consejo acertado y su presencia en el laboratorio que siempre es necesaria...nos das tranquilidad y seguridad.

A los integrantes de la Cátedra de Genética y del Laboratorio de Genética y Mejoramiento de especies forrajeras, mis compañeros y amigos: Guillermo Norrmann, Irene Caponio, Camilo Quarín, Francisco Espinoza, Eric Martínez, Mario Urbani, Marita Sartor, Florencia Galdeano, Patricia Novo, Andrea Brugnoli, Verena Reuteman, Alex Zilli, Mara Schedler, Werfil Wagner, Edmundo Barrios y muchos otros que siguieron sus rumbos, pero están en mi corazón. Con todos he compartido muchísimo en este

camino de formación, con los que he vivido tantas experiencias maravillosas y recuerdos imborrables (tengo fotos que atestiguan).

A mis compañeras y amigas de siempre Marita, Flopy y Pato. Incontables las veces que nos apoyamos mutuamente e hicimos nuestras catarsis, lágrimas de por medio, dándonos fuerza para sobrellevar lo que sea y seguir adelante. ¡Mil Gracias amigas...!!!

A Eduardo...siempre presente...

Al Sr. Edmundo Barrios, por su buena predisposición y colaboración en las tareas de invernáculo, por cuidar muchas veces de mis plantas.

A todo el personal del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE).

A la Dra. Carolina Peichoto, por sus valiosísimas enseñanzas en torno a la Taxonomía.

A la Dra. Graciela Lavia, por las charlas y por ser mi compañera de ruta, nuestros viajes a los Congresos son inolvidables. ¡Gracias amiga...!!!

Al Dr. César López, Profesor titular de la Cátedra de Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora y a cada uno de los integrantes de ese excelente grupo de trabajo: Eduardo, Salvador, Adriana, Maia, Daniela. Gracias por permitir que realice gran parte de mi trabajo de tesis en el laboratorio de la cátedra. Principalmente quiero agradecerles todo el cariño que me brindaron cada vez que fui a Lomas, por sus tiempos, sus consejos, por cuidarme, por compartir los almuerzos. Gracias por estar siempre que los necesité, brindándome una mano tanto en Lomas como en Buenos Aires. Además, gracias por cuidar de mis preparados en este tiempo de pandemia...

A la Lic. Adriana Riva, por la colaboración brindada, por su tiempo, por su amistad y compañerismo. ¡Gracias amiga...!!!

A la Dra. Maia Fradkin, por tus importantes aportes sobre Citogenética Molecular, por la amistad compartida, por los mates/almuerzos, en las horas de trabajo en el laboratorio, por haber compartido conmigo los “tips más secretos”. ¡Infinitas gracias amiga...!!!

A la Dra. María José Bressa, (Laboratorio de Citogenética y Evolución. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires). María, infinitas gracias por haberme facilitado herramientas que complementaron mi trabajo; por tus

importantes aportes sobre Citogenética y por lo más importante...la confianza y la amistad compartida, enriquecida durante estos años. ¡Gracias amiga...!!!

A la Dra. Lidia Poggio por sus charlas y consejos sobre las GISH, en el Lab 110 de Exactas (UBA) o en algún Congreso donde nos encontrábamos.

A la Dra. Graciela Gonzales, por su excelente predisposición, por brindarme su amistad y apoyo para lo que yo necesitara a pesar de la distancia. También tiempos de charlas y consejos técnicos. ¡Gracias Graciela...!!!

A Memo, mi compañero de vida, por creer en lo que hago, por la paciencia, por apoyarme a pesar de los momentos que no estuve por priorizar el trabajo.

Especialmente a *mis padres* Irma y Mirabeaw... que, aunque no están físicamente, me acompañaron en todo momento, inculcándome el amor por el estudio, el trabajo y la creatividad. Eternamente agradecida.

Parte de los resultados de esta tesis, fueron publicados y presentados en Congresos y Reuniones Científicas nacionales e internacionales.

#### Publicaciones derivadas de la tesis:

**Hidalgo, M. I.,** Greizerstein, E. J., & Norrmann, G. A. 2019. Cytogenetic studies in three diploid species of *Andropogon* (Andropogoneae), section Leptopogon. *Rodriguésia*, 70.

#### Presentación oral:

2020. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “Análisis de las relaciones genómicas entre las especies diploides y poliploides género *Andropogon* L. mediante GISH”. LIII Reunión Anual Sociedad de Genética de Chile. Santiago de Chile, Chile. Presentación oral.

2019. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “Análisis de la distribución de la heterocromatina en tres especies diploides del género *Andropogon* L.” Congreso Mesoamericano de Investigación UNACH. Ciudad de Chiapas, Mexico. Simposista.

2019. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, Eduardo; Norrmann, Guillermo A. “Abordaje desde la citogenética clásica y molecular de las relaciones entre especies de distintos niveles de ploidía en *Andropogon* L.”. Presentado en: “V Simposio de Citogenética y Evolución” del “XVII Congreso Latinoamericano de Genética; XLVII Congreso Argentino de Genética; LII Reunión Anual de la Soc. de Genética de Chile; VI Congreso de la Soc. Uruguay de Genética; V Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución. Ciudad de Mendoza, Argentina. Simposista.

#### Presentaciones:

2021. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G. A. “Estudios citogenéticos en *Andropogon* L.: Silenciamiento de regiones NOR en poliploides reveladas por FISH”. “IV Jornadas Paraguayas de Botánica” FACEN-Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Expositora.

2021. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G. A. “Patrones de bandas C-DAPI y DAPI-CMA<sub>3</sub> en especies diploides del género *Andropogon* L., Poaceae”. “XVIII Congreso Latinoamericano de Genética; LIV Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile; XLIX Congreso Argentino de Genética; VIII Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética; I Congreso Paraguay de Genética; V Congreso Latinoamericano de Genética Humana” Valdivia, Chile. Expositora.

2020. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “Análisis genómicas entre las especies diploides y poliploides género *Andropogon* L. mediante GISH”. “LIII Reunión Anual Sociedad de Genética de Chile. Santiago de Chile, Chile. Expositora.

2020. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “Análisis de los patrones de bandas C-DAPI en especies del género *Andropogon* L.”. “XLVIII Congreso Argentino de Genética. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Expositora.

2020. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “Patrones de bandas DAPI / CMA<sub>3</sub> en especies de *Andropogon* L.”. “XLVIII Congreso Argentino de Genética. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Expositora.

2019. **Hidalgo, M.I.;** Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “El Genoma S y su participación en los poliploides del género *Andropogon* L.”. “XVII Congreso Latinoamericano de Genética; XLVII Congreso Argentino de Genética; LII Reunión Anual de la Soc. de Genética de Chile; VI Congreso de la Soc. Uruguay de Genética; V Congreso Latinoamericano de Genética Humana y V Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución. Ciudad de Mendoza, Argentina. Expositora.

2018. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “El Genoma S. Origen de los poliploides de *Andropogon L.*”. “XXVI Reunión de comunicaciones Científicas, Tecnológicas y de Extensión”. Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE- Corrientes, Argentina. Expositora.

2016. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “Estudios cromosómicos en dos diploides sudamericanos de *Andropogon L.*”. XVI Congreso Latinoamericano de Genética. IV Congreso de la Soc. Uruguaya de Genética; XLIX Reunión Anual de la Soc. de Genética de Chile; XLV Congreso Argentino de Genética. Lugar: Montevideo, Uruguay. Expositora.

2016. **Hidalgo, M.I.**; Nagahama, Nicolás; Greizerstein, E.; Norrmann, G.A. “Origen genético de *Andropogon gerardii* basado en las homologías con *A. ternarius* y *A. gyrans* reveladas mediante Hibridación In Situ”. XVI Congreso Latinoamericano de Genética. IV Congreso de la Soc. Uruguaya de Genética; XLIX Reunión Anual de la Soc. de Genética de Chile; XLV Congreso Argentino de Genética. Lugar: Montevideo, Uruguay. Expositora.

2016. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E., Norrmann, G.A. “La Sección *Notosolen* (*Andropogon*, L.) del Cono sur de Sudamérica: Bando DAPI-CMA<sub>3</sub> en Híbridos Interspecíficos controlados.” Jornadas Regionales de Genética. Licenciatura, FACENA (UNNE); Sociedad Argentina de Genética (SAG); Regional NEA de la Sociedad Argentina de Genética; Laboratorio de Citogenética y Evolución Vegetal del IBONE (UNNE-CONICET). Corrientes, Argentina. Expositora.

2015. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E., Norrmann, G.A. “Bando C y DAPI/CMA<sub>3</sub> en tres especies diploides de *Andropogon* (GRAMINEAE) de la sección *Leptopogon*”. XLIV Congreso Argentino de Genética, V Reunión Regional SAG. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Expositora.

2014. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E., Norrmann, G.A. “Bando DAPI/CMA<sub>3</sub> en especies e híbridos de la Sección *Notosolen* (*Andropogon*, Gramineae) del cono sur de Sudamérica.” XLIII Congreso Argentino de Genética, IV Reunión Regional SAG. San Carlos de Bariloche, Patagonia, Argentina. Expositora.

2014. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E., Norrmann, G.A. “Bando DAPI/CMA<sub>3</sub> en especies e híbrido interspecífico de *Andropogon*, Gramineae.” XXIV<sup>º</sup> Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión. Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE. Corrientes, Argentina. Expositora.

2013. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E., Norrmann, G.A. “Bando DAPI-CMA<sub>3</sub> en la Sección *Notosolen* (*Andropogon*, Gramineae) en el cono sur de Sudamérica”. XLII Congreso Argentino de Genética y III Reunión Regional SAG-NOA. Salta, Argentina. Expositora.

2013. **Hidalgo, M.I.**; Greizerstein, E., Norrmann, G.A. “Bando DAPI-CMA<sub>3</sub> en dos híbridos interspecíficos de *Andropogon*, Gramineae”. XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica, Sistemática y Taxonomía. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Expositora.

## Índice general

<b>Resumen.....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>17</b>
Las Secciones.....	18
Sección <i>Notosolen</i> Stapf.....	19
Bandeos cromosómicos.....	20
Hibridación <i>In Situ</i> (ISH) .....	21
<b>Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo I</b>	
<b>Especies de la Sección <i>Notosolen</i> Stapf el cono sur de Sudamérica estudiadas en esta tesis</b>	
<b>Exomorfología.....</b>	<b>25</b>
<b>Resultados</b>	
Hábito.....	28
Tallo.....	29
Macollas.....	29
Altura de planta.....	29
Prefoliación.....	30
Hojas.....	31
Lígula.....	31
Vaina.....	32
Coloración del follaje.....	32
Inflorescencia.....	33
Tipología de las inflorescencias.....	35
Tipología de las especies de la sección <i>Notosolen</i> Stapf. del cono sur de Sudamérica.....	38
Entrenudo del raquis y pedicelo.....	48
Espiguillas.....	51
Gluma.....	54
Lemma.....	56
Palea.....	57
Lodícula.....	58
Androceo.....	59
Gineceo.....	59
Aspectos de la biología reproductiva.....	59
Modo de reproducción.....	60
Polinización.....	64
<b>Tratamiento taxonómico.....</b>	<b>66</b>
<i>Andropogon barretoii</i> Norrmann & Quarin.....	66
<i>Andropogon exaratus</i> E. Hackel.....	69
<i>Andropogon glaucophyllus</i> Roseng., B.R. Arrill. et Izag. ....	72
<i>Andropogon gayanus</i> Kunth.....	75
<b>Capítulo II</b>	
<b>Estudios Citogenéticos clásicos y Moleculares.....</b>	<b>80</b>

<b>Material vegetal</b> .....	80
<b>Métodos</b> .....	81
Medición del contenido de ADN.....	81
Viabilidad de granos de polen.....	83
Estudios de Citogenética clásica.....	83
Mitosis.....	83
Meiosis.....	85
Bandeo C/DAPI fluorescente.....	86
Bandeo CMA <sub>3</sub> /DAPI fluorescente.....	87
Estudios de Citogenética molecular.....	88
Experiencias de hibridación <i>in situ</i> .....	88
Para estudios de GISH.....	89
Para estudios de FISH.....	93
<b>Resultados</b> .....	113
<b>Especies diploides, sección <i>Leptopogon</i> Stapf</b> .....	114
<b>Citogenética clásica</b> .....	114
Características morfológicas generales de los cariotipos.....	114
Estudio de las regiones heterocromáticas.....	121
Distribución de la heterocromatina constitutiva C/DAPI.....	121
Distribución de la constitución de la heterocromatina CMA <sub>3</sub> /DAPI.....	130
<b>Especies tetraploide y hexaploides sección <i>Notosolen</i> Stapf</b> .....	140
<b>Citogenética clásica</b> .....	140
Características morfológicas generales de los cariotipos.....	140
Comportamiento meiótico.....	149
Estudio de las regiones heterocromáticas.....	155
Distribución de la heterocromatina constitutiva C/DAPI.....	155
Distribución de la constitución de la heterocromatina CMA <sub>3</sub> /DAPI.....	163
Contenido de ADN.....	171
<b>Citogenética molecular</b> .....	178
FISH.....	178
GISH.....	182
Afinidades genómicas entre especies de <i>Andropogon</i> .....	182
Afinidades genómicas entre las especies diploides ( <i>Leptopogon</i> ).....	183
Afinidades genómicas entre diploides y triploide ( <i>Leptopogon</i> ).....	186
Afinidades genómicas entre diploides ( <i>Leptopogon</i> ) y tetraploide ( <i>Notosolen</i> ).....	192
Afinidades genómicas entre triploide ( <i>Leptopogon</i> ) y tetraploide ( <i>Notosolen</i> ).....	195
Afinidades genómicas entre tetraploide ( <i>Leptopogon</i> ) y tetraploide ( <i>Notosolen</i> ).....	196
Afinidades genómicas entre diploide ( <i>Leptopogon</i> ) y hexaploides ( <i>Notosolen</i> ).....	197
Afinidades genómicas entre tetraploide y hexaploide, ambas ( <i>Notosolen</i> ).....	205
Afinidades genómicas entre diploide y tetraploide ( <i>Leptopogon</i> ).....	207
Afinidades genómicas entre diploide ( <i>Leptopogon</i> ) y hexaploide ( <i>Andropogon</i> ).....	208
Afinidades genómicas entre tetraploide ( <i>Leptopogon</i> ) y hexaploide ( <i>Andropogon</i> ).....	212
Afinidades genómicas entre una especie de <i>Bothriocloa</i> y hexaploide ( <i>Andropogon</i> ).....	215
<b>Discusión</b> .....	216
 <b>Capítulo III</b>	
<b>Híbridos controlados dentro de la sección <i>Notosolen</i></b> .....	270

<b>Tratamiento taxonómico</b> .....	270
<b>Híbridos entre las secciones <i>Andropogon</i> y <i>Notosolen</i></b> .....	281
<b>Tratamiento taxonómico</b> .....	281
<b>Resultados</b> .....	291
<b>Citogenética clásica</b> .....	292
Comportamiento meiótico.....	292
Estudio de las regiones heterocromáticas.....	308
<b>Citogenética Molecular</b> .....	316
FISH.....	316
<b>Conclusiones</b> .....	317
<b>Bibliografía</b> .....	322
<b>Anexos</b> .....	349
<b>Anexo I. Soluciones de trabajo</b> .....	350
<b>Anexo II. Índice de Tablas y Figuras</b> .....	367
<b>Anexo III. Imágenes del material vegetal</b> .....	370



## Resumen

### Estudios citogenéticos clásicos y moleculares en *Andropogon* Sección *Notosolen* Stapf. del cono sur de Sudamérica.

El género *Andropogon* L. fue descrito por Linnaeus en 1753, quien reconoció 12 especies en la primera edición de *Species Plantarum*. Actualmente dichas especies están re-distribuidas en 9 géneros representados en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. Considerado el género más representativo dentro de las Andropogoneae, actualmente cuenta con aproximadamente de 100 a 120 especies con diferentes niveles de ploidía, distribuidas principalmente en los pastizales naturales de América y África. El número cromosómico básico es  $x=10$ , aun cuando existen algunas excepciones en especies del viejo mundo. En el continente africano, la mayor parte de las especies son diploides o tetraploides ( $2n=2x=20$  o  $4x=40$ ). América del Sur, comparte con América Central algunos representantes diploides, siendo particularmente rica en especies hexaploides ( $2n=6x=60$ ) y América del Norte con numerosos representantes diploides y muy pocos hexaploides.

Dentro del género *Andropogon* L. se reconocen 4 secciones **(I)** La sección *Andropogon* presumiblemente originaria del continente africano; **(II)** la sección *Leptopogon* principalmente americana con pocos representantes en África; **(III)** la sección *Piestium* que cuenta con mayor cantidad de representantes en el continente africano; **(IV)** la sección *Notosolen*, citada originalmente solo para África, pero en la actualidad, algunos autores incluyeron dentro de esta sección a especies sudamericanas como *A. barretoi* Norrmann & Quarin, *A. exaratus* Hack y *A. glaucophyllus* Roseng., Arrill. e Izag. Se agrega a esta sección *A. gayanus* Kunth, principal componente de las sabanas de África tropical.

La presente tesis tiene como principal objetivo el estudio de las especies del cono sur de Sudamérica de la Sección *Notosolen* Stapf y las relaciones existentes entre ellas y con especies de igual o de distinto nivel de ploidía de las demás secciones del género.

Se realizó el análisis y tratamiento taxonómico clásico en las especies *A. gayanus*, *A. barretoi*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y en los híbridos obtenidos por cruzamientos controlados *A. barretoi* x *A. glaucophyllus*; *A. glaucophyllus* x *A. barretoi*; *A. barretoi* x *A. exaratus*; *A. exaratus* x *A. glaucophyllus*; *A. glaucophyllus* x *A. exaratus*; *A. gerardii* x *A. barretoi*; *A. gerardii* x *A. exaratus*; (*A. glaucophyllus* x *A. exaratus*) x *A. gerardii*.

En el presente trabajo se presenta el análisis tipológico de las sinflorescencias de: *A. gayanus* Kunth, *A. barretoii* Norrmann y Quarin, *A. exaratus* Hack. y *A. glaucophyllus* Roseng.t, Arrill. e Izag.

Los estudios de citogenética clásica permitieron proponer para las especies diploides *A. selloanus* (Hack) Hack., *A. macrothrix* Trin. y *A. gyrans* Ashe, la fórmula cariotípica  $18m + 2sm$ . Para el tetraploide *A. gayanus* la fórmula cariotípica  $40m + (0-2)Bs$ . Para *A. barretoii* la fórmula cariotípica  $52m + 6sm + 2t + (2-4)Bs$ . Para *A. exaratus* la fórmula cariotípica  $56m + 4sm + (2-4)Bs$ . Para *A. glaucophyllus* la fórmula cariotípica  $54m + 6t$ . Todas estas entidades presentan un cariotipo simétrico constituido en su mayoría por cromosomas metacéntricos.

Se analizó el comportamiento de los cromosomas en meiosis de las especies *A. gayanus* ( $2n=4x=40$ ), *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* ( $2n=6x=60$ ) y de los híbridos controlados. En todas las especies se observó una meiosis regular, con formación de 20 bivalentes (20 II) en el tetraploide y 30 bivalentes (30 II) en los hexaploides. En *A. barretoii* y *A. exaratus* se observó la presencia de cromosomas accesorios en número variable comportándose como univalentes, siendo la configuración meiótica más frecuente de  $30II + 2-8Bs$ .

El estudio del tamaño del genoma se realizó por primera vez en el género, en tres especies diploides de la Sección *Leptopogon*, en las especies de la Sección *Notosolen* que habitan el cono sur de Sudamérica y en una especie de la Sección *Andropogon*. El análisis del contenido de ADN permitió realizar las siguientes inferencias: -Entre las especies analizadas, se detectaron diferencias significativas en el contenido de ADN (2C) entre las especies diploides, entre diploides y tetraploides, y entre estas con las hexaploides. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las especies hexaploides. -Al relacionar el número cromosómico con el contenido de ADN por genoma básico C (pg), se observó que los poliploides *A. gayanus*, *A. gerardii*, *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. exaratus*, poseen un valor C más bajo que las entidades diploides analizadas. -En las entidades analizadas de *Andropogon*, se observó en general un aumento del valor 2C y una disminución del valor (C) a medida que aumentó el nivel de ploidía. -En las especies poliploides *A. gayanus*, *A. gerardii*, *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. exaratus*, se observó que los valores C son más bajos que los de las especies diploides. -Dentro de las entidades diploides, si bien sus cariotipos se presentan como

simétricos, mostraron diferencias significativas respecto al valor del contenido de ADN 2C. Sin embargo, las especies poliploides presentaron cariotipos simétricos y solo se detectó diferencias significativas entre la especie tetraploide con las entidades hexaploides, pero no entre estas últimas. -La correlación entre el contenido de ADN y algunos parámetros del cariotipo, registró que existe una alta correlación positiva directa.

Se analizó por primera vez la distribución y composición de la heterocromatina en: *A. selloanus*, *A. macrothrix*, *A. gyrans*, *A. gayanus*, *A. barretoii*, *A. glaucophyllus*, *A. exaratus* y *A. gerardii*, lo que permitió determinar la existencia de diferentes patrones de bandas C y DAPI/CMA<sub>3</sub>. Mediante la técnica de bandeo C, en los taxones diploides, se observó que todos los cromosomas presentaron patrones de heterocromatina constitutiva en forma homomórfica, obteniéndose patrones de distribución de las mismas característico para cada especie estudiada, permitiendo su identificación. En las especies poliploides, el patrón de distribución de la heterocromatina también es homomórfico, y muy semejante entre las mismas, existiendo variaciones en cuanto a la posición y número de las bandas presentes en cada cromosoma.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, las entidades analizadas, revelaron mayor número de secuencias ricas en AT y GC, siendo muy frecuente que la heterocromatina de las regiones nucleolares, se evidencien positivamente, por estar asociadas a heterocromatina rica en GC.

El empleo de la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) permitió por primera vez, el mapeo físico de las regiones de ADN ribosomal en las especies diploides, poliploides e híbridos analizados. El número y la ubicación de los sitios de ADN<sub>r</sub> en los taxones diploides fue constante mostrando un par de *loci* 45S, correspondiéndose con el n° de cromosomas con satélites, bandas C+ y CMA<sub>3</sub> +/- DAPI- observadas mostrando una alta homomorfía en el patrón FISH de cromosomas homólogos. En las especies hexaploides analizadas, se observó la presencia de un par de *loci* de ADN<sub>r</sub> 45S, lo cual podría estar indicando la pérdida de esas secuencias durante la formación del híbrido que dio lugar a estos poliploides y la existencia de silenciamiento de los organizadores nucleolares de una de las especies involucradas, por lo cual no fueron detectadas por FISH.

La técnica de Hibridación *in situ* Genómica (GISH), permitió comparar la homología entre genomas de diferentes niveles de ploidía y secciones: 1.- Comprobar la alta homología entre *A. selloanus* y *A. macrothrix*. 2.- Comprobar la homología entre el genoma de *A. selloanus* y el de *A. gyrans*. 3.- Evaluar la afinidad entre el genoma de los diploides y el genoma de *A. ternatus* y el de *A. ternarius*. 4.- Evaluar la afinidad genómica entre el genoma "S" y el de *A. gayanus*, *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*, (sección *Notosolen* Stapf). 5.- Se representó la hipótesis de Stebbins (1975). Según los resultados obtenidos, *A. gerardii*, podría haberse formado a partir de eventos ancestrales de poliploidización de un diploide norteamericano que habría originado al tetraploide *A. ternarius*. Los resultados de este trabajo, darían sostén a la primera premisa de dicha hipótesis.

## INTRODUCCIÓN

La Familia Poaceae Barnhart, constituye una de las familias más ricas en especies vegetales, son cosmopolitas y están presentes en todas las latitudes (Nicora y Rúgolo de Agrasar, 1987) constituyendo uno de los grupos de plantas más importantes desde el punto de vista taxonómico, económico y ecológico (Watson, 1990; Watson & Dallwitz, 1992). Aproximadamente un tercio de las tierras del mundo está cubierto por alguna especie de Poaceae y la mayoría de las poblaciones humanas dependen en gran medida de las gramíneas para su sustento diario (Mathews et al., 2000). Según Stebbins (1973), las Gramíneas no sólo han alcanzado el clímax en la evolución de las plantas con flores, sino que también constituyen la familia de mayor provecho para el hombre. En la familia Poaceae se reconocen 6 subfamilias: *Bambusoideae*, *Pooideae*, *Centothecoideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae* y *Panicoideae*, las cuales comprenden numerosas tribus y subtribus (Parodi, 1961a; Stebbins & Crampton, 1961; Clayton & Renvoize, 1986) y más de 10.000 especies agrupadas en aproximadamente entre 700 y 785 géneros (Clayton & Renvoize, 1986; Watson, 1990; Watson & Dallwitz, 1992). Dentro de la subfamilia *Panicoideae*, la tribu *Andropogoneae*, está compuesta por 11 subtribus con aproximadamente 85 géneros y alrededor de 960 especies (Clayton & Renvoize, 1986), de gran importancia económica, abundantemente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo y moderadamente en zonas templadas (Gould, 1956). Una de sus componentes, la subtribu *Andropogoninae*, está conformada por 6 géneros *Andropogon* L., *Bhidea* Bor., *Cymbopogon* Spreng., *Schizachyrium* Nees, *Arthraxon* Beauv., *Diheteropogon* Stapf. El género *Andropogon* L. fue descrito por Linnaeus en 1753, quien reconoció 12 especies en la primera edición de *Species Plantarum*, su nombre proviene del griego *andr* (hombre) y *pogon* (barba) (Hervé & Valls, 1980) aludiendo a las vellosidades de los pedicelos de las espiguillas estériles masculinas. Actualmente dichas especies están re-distribuidas en 9 géneros representados en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. Considerado un género pantropical, actualmente cuenta con aproximadamente de 100 (Clayton & Renvoize, 1986) a 120 especies (Campbell & Windisch, 1986) distribuidas principalmente en los pastizales naturales de América y África. Se considera que el número cromosómico básico para el género es  $x=10$  (Gould, 1967; Stebbins, 1975; Campbell, 1983b; Norrmann, 1985; Davidse et al., 1986), aun cuando existen algunas excepciones en

especies del viejo mundo, como *A. distachyus* L. ( $x = 9$ ), *A. abyssinicus* Fresen. ( $x = 8$ ) y *A. manii* Hook. f. ( $x = 7$ ) (Davidse et al., 1986). Mientras que las especies de *Andropogon* en América son básicamente diploides o hexaploides ( $2n=2x=20$  o  $2n=6x=60$ ) (Gould, 1967; Norrmann, 1985; Campbell & Windisch, 1986) con algunas pocas excepciones como *Andropogon ternarius* Michaux con citotipo tetraploide ( $2n=4x=40$ ) (Gould, 1956) y citotipo hexaploide ( $2n=6x=60$ ) (Church, 1940), *A. gerardii* Vitman con citotipo hexaploide ( $2n=6x=60$ ) y citotipo enneaploide ( $2n=9x=90$ ) (Gould, 1967, 1968a; Keeler 1990, 1992; Norrmann et al. 1997; Normann & Keeler 2003), en África la mayoría de las especies son diploides o tetraploides ( $2n=2x=20$  o  $4x=40$ ) (Campbell, 1983b; Campbell & Windisch, 1986; Norrmann, 1999a) con excepciones como *A. huillensis* Rendle con citotipo diploide ( $2n=2x=20$ ) (Dujardin, 1978), citotipo hexaploide ( $2n=6x=60$ ) (de Wet, 1960) y citotipo decaploide ( $2n=10x=100$ ) (Spies & du Plessis, 1987). En el continente americano el género es considerado muy heterogéneo (Clayton, 1964; Gould, 1967; Norrmann, 1985; Kellogg & Campbell, 1987) y complejo en su clasificación. Está representado por unas 73 especies de las cuales menos de la mitad han sido caracterizadas cromosómica y reproductivamente (Gould, 1967; Stebbins, 1975; Campbell, 1983b; Norrmann, 1985; Campbell & Windisch, 1986; Norrmann & Quarin, 1987; Norrmann & Quarin, 1991; Killeen, 1990; Norrmann et al. 1994, Norrmann et al. 1997; Wipff, 1996).

## Las Secciones

Dentro del género *Andropogon* L. se reconocen 4 secciones (Stapf, 1917-1919): *Euandropogon* (=Andropogon) Stapf, *Leptopogon* Stapf, *Notosolen* Stapf y *Piestium* Stapf. Esta división fue realizada para especies presentes en el continente africano y se basó especialmente en el estudio de la forma del pedicelo, en el entrenudo del raquis y en características de la gluma inferior de la espiguilla sésil, incluyendo su forma, superficie y presencia o ausencia de nervaduras entre las carenas. En 1986, Clayton & Renvoize propusieron la extensión de estas secciones a todas las especies de *Andropogon* a nivel mundial con algunas ligeras modificaciones: (i) La sección *Andropogon* presumiblemente originaria del continente africano; (ii) la sección *Leptopogon* principalmente americana con pocos representantes en África; (iii) la sección *Piestium* es la que cuenta con mayor cantidad de representantes en el

continente africano; (iv) a sección *Notosolen*, citada originalmente por Clayton & Renvoize, (1986) solo para África.

América es excepcionalmente rica en miembros de la sección *Leptopogon* Stapf, pero con escasos representantes de las otras secciones; por el contrario, África posee al menos un representante en las 4 secciones (Clayton, 1972a; Clayton & Renvoize, 1982). Gould (1967), sugirió la incorporación de las especies americanas dentro de las tres primeras secciones, hecho que fue reconocido por Clayton & Renvoize (1986) y luego fueron aceptadas por autores norteamericanos como Campbell (1983b) e Hilu (1984).

### Sección *Notosolen* Stapf

Esta sección fue citada originalmente por Clayton & Renvoize (1986) para el continente africano. Actualmente algunos autores sudamericanos incluyeron dentro de esta sección a especies sudamericanas como *A. crispifolius* Guala & Filgueiras, *A. pohlianus* Hackel (Guala & Filgueiras, 1995), *A. exaratus*, *A. barretoii* y *A. glaucophyllus* (Norrman, 1999). Sólo tres de estas especies incluidas en la sección cuentan con recuentos cromosómicos: *A. barretoii* Norrmann y Quarín, *A. exaratus* Hack. y *A. glaucophyllus* Roseng., Arrill. e Izag. todas ellas con  $2n=6x=60$  cromosomas. La distribución de las mismas es restringida y no son simpátricas, sin embargo, aun siendo distantes geográficamente, al someter a algunas de ellas a cruzamientos controlados, se obtuvieron híbridos fértiles (Norrman, 1999) por lo cual se infirió que entre ellas existía una alta homología genómica y probablemente un origen común.

Actualmente, uno de los representantes africanos de la sección es *Andropogon gayanus* Kunth, distribuida en la mayor parte de la sabana de África tropical. Olorode (1972), reportó citotipos tetraploides ( $2n=4x=40$ ) para todos los individuos provenientes de Nigeria, sin embargo, otros recuentos cromosómicos para el material nigeriano reportaron citotipos diploides ( $2n=2x=20$ ), y plantas aneuploides con  $2n = 35$ ,  $2n = 42$  y  $2n = 43$  cromosomas (Singh y Godwar, 1960). Foster (1962) encontró indicios de cruzamientos naturales entre *A. gayanus* var. *tridentatus* ( $2n=2x=20$ ) con *A. tectorum* Schum. y Thonn. ( $2n=2x=20$ ) una especie estrechamente relacionada con *A. gayanus* (Keeler-Grein y Rainer Schultze-Kraft, 1989).

Se ha considerado a la sección *Notosolen* como la sección más primitiva del género en el contexto del cono sur de América, especialmente en base a su estructura floral, diseminación y sistema de autoincompatibilidad (Norrman, 1999).

Existen diferentes caminos para evaluar la mayor o menor cercanía “filogenética” entre taxones. El origen de los taxa aloploidos y sus relaciones con sus parientes diploides es un tema que ha sido abordado ampliamente mediante el uso de metodologías diversas. Las técnicas citogenéticas han sido ampliamente utilizadas para dilucidar de dónde provienen muchos taxa poliploides en los grupos mediante el análisis genómico (Mason-Gamer, 2001). La citogenética molecular utilizando herramientas como la hibridación *in situ* genómica (GISH) permite conocer el origen de los genomas en los aloploidos (Bennett, 1995; Schwarzacher & Heslop Harrison, 2000).

Los taxónomos y evolucionistas están familiarizados con el hecho de que los cromosomas son parte de un sistema dinámico que está moldeando el proceso de evolución, variación que se expresa en características fácilmente analizables como el número, forma y tamaño de los cromosomas. El hallazgo de técnicas para la identificación de genomas y cromosomas en preparados de rutina ha representado un gran progreso en la citogenética vegetal, ya que disponer de marcadores cromosómicos permite estudiar la organización del genoma y la arquitectura nuclear (Poggio & Naranjo, 2004).

### **Bandeo Cromosómico**

La heterocromatina es uno de los componentes cromosómicos que ha atraído mayormente la atención de los citogenetistas, debido a su función aún desconocida, a su aparente falta de genes y por el hecho de que se tiñe en forma diferente al resto del cromosoma, existiendo suficientes registros que reportan su presencia, variabilidad, composición molecular, efectos directos e indirectos sobre el cariotipo, etc. (Guerra, 2000).

Uno de los más básicos pero no menos importantes aspectos en la investigación de la heterocromatina, es el estudio de su distribución en bandas o bloques localizadas en las regiones cromosómicas (Guerra, 2000), sugiriendo que la heterocromatina tiene un significado funcional y evolutivo que podría no ser el mismo para todas las especies y un



único modelo de distribución para todas las Angiospermas podría no existir, solo existirían tendencias o patrones preferenciales para diferentes genomas y cariotipos (Guerra, 2000).

El estudio de las regiones heterocromáticas permite reconocer regiones de ADN altamente repetitivo que ocupan alrededor del 95% del ADN total (Schmidt et al., 1998). Las regiones ricas en heterocromatina son bloques de secuencias de ADN repetitivo. Estas regiones son altamente variables entre especies y evolucionan de manera acelerada provocando cambios en la distribución y en el número de las secuencias, pudiendo resultar altamente variables aún entre especies vecinas. Estos rasgos característicos las convierten en una herramienta muy útil para estudios comparativos de genomas y para el análisis de relaciones evolutivas y filogenéticas entre especies (Schwarzacher, 2003).

### **Hibridación *In Situ***

El gran potencial de las técnicas de hibridación *in situ*, resulta de combinar información acerca de la morfología nuclear o cromosómica con la información molecular de la estructura de las secuencias.

La técnica de GISH (Hibridación *In Situ* Genómica), muy utilizada en plantas, se basa en el mismo principio que la técnica de FISH sólo que en este caso la sonda está formada por el ADN genómico total de una especie.

La hibridación *in situ* utilizando ADN genómico como sonda es una técnica molecular muy utilizada hoy en día para caracterizar directamente relaciones genómicas y para el estudio de genomas parentales en especies poliploides (Schwarzacher et al., 1989; Thomas et al., 1996; Kosina & Heslop-Harrison, 1996; Snowdon et al., 1997; King et al., 1998; Fukui et al., 1998; Raina et al., 1998; Benabdelmouna et al., 2001).

Numerosos son los trabajos que, actualmente ejemplifican la aplicación de las técnicas de Hibridación *in situ* utilizadas en diversos tipos de estudios (sistemáticos, filogenéticos, evolutivos, de mejoramiento y biotecnológicos), aportando enormemente al conocimiento de la estructura, función, organización y evolución de genes y genomas (Leitch et al. 1990; Bennett y Bennett, 1992; Hinnisdaels et al., 1992; Kenton et al., 1993; Jacobsen et al., 1995; Bejarano et al., 1996; Garriga-Calderé et al., 1997; Schubert et al., 1998; Poggio et al., 1999 a y b, Poggio et al., 2000 a y b; Ali Mohammed et al., 2000; Cao

et al., 2000; Fedak et al., 2000; Raina y Rani, 2001; Irigoyen et al. 2002; De Melo y Guerra 2003; Gonzalez et al, 2004; Seijo et al. 2004; 2007; Ferrari et al. 2005; Hamom et al. 2009; Perthuy et al., 2010; Ramzan et al. 2017; Silva et al., 2020).

La técnica de FISH (Hibridación *In Situ* Fluorescente) consiste en el apareamiento de determinado segmento de DNA o RNA con una secuencia de nucleótidos complementarios dentro de la célula permitiendo verificar si la célula contiene esa secuencia y observar su exacta localización. Esta técnica está siendo muy utilizada para facilitar el mapeo cromosómico y ha permitido la detección de secuencias de ADN ribosomal, ADN altamente repetido y ADN poco repetido o de secuencia única en plantas. (Ambros et al., 1986a, Mouras et al., 1987; Mouras & Negrutiu 1989; Moscone et al., 1996). La detección de transgenes mediante FISH comenzó en plantas de petunia (Fransz et al., 1996; Hoopen et al., 1996) y se ha extendido a muchos cereales (Pedersen et al., 1997; Carlson et al., 2001; Salvo-Garrido et al., 2001)

Aunque estas técnicas se conocen desde 1969 utilizando marcación radioactiva, en plantas se comenzó a aplicar a fines de la década del '80 debido a la gran disponibilidad de secuencias clonadas para utilizar como sonda. La posibilidad de utilizar ADN genómico total como sonda (GISH) y modernos sistemas de marcación y detección no radioactivos han impulsado el uso de esta técnica en forma rutinaria, complementando los resultados obtenidos por metodologías más clásicas (Bennett, 1995).

Para explorar las relaciones genómicas entre las especies de *Andropogon*, se realizaron cruzamientos controlados interespecíficos entre citotipos diploides (Galdeano & Norrmann, 2000), entre citotipos diploides y triploides (Norrmann & Quarin, 1987), entre citotipos hexaploides (Peters & Newells, 1961; Norrmann et al., 1997) y entre citotipos hexaploide con nanoploides y aneuploides (Norrmann et al., 1997; Norrmann & Keeler, 2003), a partir de los resultados obtenidos mediante el análisis del comportamiento de los cromosomas en meiosis sugiriéndose que las especies diploides sudamericanas *Andropogon selloanus* (Hack.) Hack., *A. ternatus* Nees y *A. macrothrix* Trin., comparten un genoma común denominado genoma "S" (Norrmann & Quarin, 1987).

Norrmann et al. (2004), mediante la técnica de hibridación *in situ* genómica (GISH), exploraron las relaciones genómicas de algunas especies diploides. Utilizando el ADN genómico total de *A. macrothrix* diploide sudamericano ( $2n=2x=20$ ) como sonda

hibridaron los cromosomas de *A. selloanus* diploide sudamericano ( $2n=2x=20$ ), resultando todos los cromosomas uniformemente hibridados, infiriendo que estas especies comparten el genoma básico “S” como fue propuesto previamente por Galdeano & Norrmann (2000). Cuando los cromosomas meióticos de la especie sudamericana *A. selloanus* fueron hibridados con el ADN genómico del diploide norteamericano *A. gyrans*, también todos los cromosomas resultaron uniformemente hibridados. Estos resultados también sugirieron que el genoma “S”, originalmente definido para el diploide sudamericano también es compartido por el diploide norteamericano *A. gyrans*. Dado que *A. gyrans* es miembro del Complejo *Andropogon virginicus*, grupo cuya monofilia fue demostrada por medio de taxonomía clásica, es muy posible que los restantes 12 miembros de dicho grupo también contengan el genoma “S” (Norrmann et al., 2004).

Posteriormente, los mismos autores explorando las relaciones genómicas entre las especies del género con diferentes niveles de ploidía hibridaron con ADN genómico del sudamericano *A. selloanus* los cromosomas mitóticos de la especie hexaploide *A. lateralis*, observando que solo 20 de los 60 cromosomas de esta última hibridaron. Por lo tanto, sugirieron que *A. lateralis* es un alohexaploide en el cual el genoma “S” representa a solo uno de genomas involucrados. Cuando los cromosomas meióticos de *A. lateralis* fueron hibridados con el ADN genómico de la especie norteamericana *A. gyrans*, los resultados fueron similares, sugiriendo que, entre las especies americanas, ciertos citotipos diploides (Sect. *Leptopogon*) y hexaploides presentan el genoma “S” postulando que estas especies diploides estarían involucradas en la formación de dichos hexaploides.

## HIPOTESIS

Las especies de la sección *Notosolen* del cono sur de Sudamérica forman un grupo natural abarcando tanto las especies sudamericanas como las africanas.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

- La presente tesis de doctorado se centrará en el estudio de las especies del cono sur de Sudamérica de la Sección *Notosolen* Stapf y las relaciones existentes entre ellas y con especies de igual o de distinto nivel de ploidía de las demás secciones del género.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar cariotípicamente a las especies con distinto nivel de ploidía mediante Bandeos C y DAPI-CMA<sub>3</sub>, FISH.
- Obtener secuencias de ADN ribosomal 45S y 5S mediante el desarrollo de primers adecuados y amplificación por PCR.
- Determinar el número y posición de las Regiones Organizadoras Nucleolares 45S mediante FISH.
- Relacionar genómicamente las especies diploides del género con los poliploides del cono sur de Sudamérica de la sección mediante “Hibridación *In Situ*”.
- Establecer las relaciones genómicas entre las especies hexaploides en estudio mediante GISH.
- Analizar las relaciones genómicas entre las especies del cono sur de Sudamérica de la sección *Notosolen* y las especies *Andropogon gayanus* (4x) africana (sección *Notosolen*) y *A. gerardii* (6x) norteamericana perteneciente (sección *Andropogon*).
- Analizar las variaciones del contenido de ADN en las especies estudiadas.

## Capítulo 1

### Especies de la Sección *Notosolen* Stapf el cono sur de Sudamérica estudiadas en esta tesis

#### Exomorfología

##### Material estudiado

Los estudios taxonómicos de las especies del género *Andropogon*, se realizaron utilizando plantas vivas y material de herbario. El material vivo, proviene de semillas y trozos de matas, coleccionadas durante los diferentes viajes de colección realizados por el Dr. Guillermo Norrmann, por el cono sur de Sudamérica (Argentina, Sur de Brasil, Uruguay y Paraguay). Las mismas, se encuentran cultivadas bajo condiciones naturales en el Jardín experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina) y bajo condiciones controladas en el invernáculo del Laboratorio Genética y Mejoramiento de especies forrajeras (FCA-IBONE-UNNE). Los vouchers correspondientes a cada ejemplar se encuentran depositados en las siguientes Instituciones: CTES, BAA, SI, LIL, US, NY, G, F, MB, MBM.

Los taxones analizados son: Tribu Andropogoneae Dumort., subtribu *Andropogoninae* Presl.: *A. barretoii* Norrmann et Quarin nov.sp.; *A. exaratus* E. Hackel; *A. glaucophyllus* Rosengurtt, Arrillaga e Izaguirre; *A. gayanus* Kunth.

#### Métodos

##### Análisis exomorfológicos:

Este análisis se realizó basado en observaciones de las plantas en cultivo, para lo cual se tuvieron en cuenta descripciones taxonómicas y revisiones publicadas de los taxones considerados utilizando la metodología clásica empleada en taxonomía vegetal.

Para el análisis exomorfológico, se tomaron en consideración los siguientes caracteres:

- Forma de la planta y hábito.
- Altura de planta: en estado vegetativo y en plena floración.
- Lámina: longitud, ancho, prefoliación y características.
- Lígula: longitud, forma, consistencia y características.
- Vaina: longitud y forma.

- Caña florífera: longitud y características.
- Inflorescencia: longitud y forma
- Espateola: longitud y forma.
- Racimos: número, longitud y características del raquis.

### **Análisis micromorfológicos**

Las observaciones, disecciones, análisis y mediciones de los distintos componentes de las espiguillas, se realizaron con Microscopio estereoscópico Leica EZ4, perteneciente al Laboratorio de Genética y Mejoramiento de especies forrajeras, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, UNNE-CONICET y las mediciones se realizaron con un calibre digital (Electronic IP65, 797B Series, Starrett®). La terminología descriptiva utilizada está basada en Font Quer (1953).

Para el análisis micromorfológico se tomaron en consideración los siguientes caracteres:

- Entrenudo del raquis (artejo): longitud y características.
- Espiguilla sésil: longitud, ancho y características de las glumas (inferior y superior), lemmas, páleas, lodículas, androceo y gineceo, características.
- Cariopsis: forma, longitud y ancho.
- Espiguilla pedicelada: longitud, ancho y características de las glumas (inferior y superior), lemmas, páleas, lodículas, androceo y gineceo, características de la espiguilla.
- Pedicelo: longitud y características.

Para cada entidad se registró toda la variabilidad observada en el material disponible. Siguiendo este plan, los caracteres vegetativos y reproductivos fueron medidos y descriptos.

### **Estudio de las inflorescencias**

Con el propósito de evaluar el desarrollo y evolución de las inflorescencias, se analizaron plantas cultivadas bajo condiciones naturales en el Jardín experimental y Campo Didáctico de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina) y bajo condiciones de invernáculo (FCA-UNNE). El estudio, se

complementó con el análisis de material conservado en alcohol 70° y ejemplares de herbario. Los caracteres fueron analizados con Microscopio estereoscópico Leica EZ4.

Para la interpretación y descripción de las inflorescencias se utilizó el sistema tipológico definido por Troll (1964) y Weberling (1989). Se elaboraron figuras para ilustrar las interpretaciones y se usaron las abreviaturas de Vegetti & Müller-Doblies (2004) para las referencias de las figuras.

Los taxones analizados se detallan a continuación, consignándose para cada caso nombre de los colectores y el número del material de herbario. Datos más completos del material analizado se detallan en el tratamiento taxonómico correspondiente. En el texto se utilizaron las siguientes abreviaturas: **Dpto**: departamento; **FCA**: Facultad de Ciencias Agrarias; **UNNE**: Universidad Nacional del Nordeste; **Est. Exp.**: Estación Experimental; **Co.**: Condado (en inglés: Pawnee County); **State.**: Estado. **RS.**: Estado de Río Grande do Sul.

#### **Taxones pertenecientes a la Sección *Notosolen* Stapf que habitan el cono sur de Sudamérica**

*A. barretoii* Norrmann et Quarin nov.sp.: **BRASIL. Estado de Río Grande do Sul:** *Norrmann & Barreto* 310, III-1994. Candelaria, Boticaí, RS 240. Cultivada en FCA-UNNE, Corrientes a partir de semillas (CTES). *Norrmann, Keeler & Barreto* 146, III-1994. RS 509, 60 km E de Santa María. Cultivada en la FCA-UNNE, Corrientes (holotipo ICN), isotipo (CTES, US).

*A. exaratus* E. Hackel: **ARGENTINA. Provincia de Corrientes. Dpto. Ituzaingó:** *Norrmann* 305. 11 km N de San Carlos. Cultivado en la FCA-UNNE, Corrientes (CTES, SI). **Villa Olivari:** *Norrmann* 101 II-1984. 24 km E de Ituzaingó, 2n = 60, cultivado en al FCA-UNNE, Corrientes, (CTES, LIL, BAA); **Villa Olivari:** *Norrmann* 102 II-1984. 24 km E de Ituzaingó, 2n = 60 + 2 cromosomas accesorios, cultivado en la FCA-UNNE, Corrientes (CTES, LIL, BAA). *Norrmann* 38, 29-III-1982, desembocadura Arroyo Garapé en el Río Paraná, 45 km E de Ituzaingó, cultivada en al FCA-UNNE, Corrientes (CTES, BAA). **Dpto. Capital:** *Norrmann* 107, 19-II-1991. Ruta 12, 12 km W de Posadas, cultivado en al FCA-UNNE, Corrientes, (CTES). **Dpto. San Ignacio:** *Norrmann* 106, 19-II-1991. Bañados del Yabebiry, ruta 12, 5 km SW de San Ignacio, cultivado en la FCA-UNNE, Corrientes, (CTES).

*A. glaucophyllus* Rosenurt, Arrillaga e Izaguirre: **BRASIL. Estado de Río Grande do Sul:** *Norrmann* 103. Morro da Policia, cultivado en Est. Exp. Guaiba (*Valls* 4810), obtenido por multiplicación vegetativa y cultivado en FCA-UNNE, Corrientes, (CTES, SI). **Estado de Santa Catarina:** *Norrmann* 315, I-1997. Laguna, *Valls et al.* 7374, 22-V-83 (CTES); Laguna, Farol de Santa Marta, (CTES).

**Taxón perteneciente a la Sección *Notosolen* Stapf que habita en el continente africano.**

*A. gayanus* Kunth: Semillas y plantas provistas por el Dr. José Francisco Montenegro Valls.

## Resultados:

### - Hábito:

Las especies de sudamericanas de *Andropogon*, en su mayoría son perennes con pocas especies anuales. Clayton & Renvoize (1982), mencionan tres especies anuales para África, *A. abyssinicus* Fresen., *A. fastigiatus* Sw., y *A. pseudoapricus* Stapf. Pohl & Davidse (1994), citan para Brasil, solo dos especies de ciclo anual: *A. fastigiatus* Sw. y *A. angustatus* (J. Presl) Steud., presentando tallos delgados, hojas delicadas y un sistema radicular superficialmente desarrollado, compuesto de raíces tenues, muy fasciculadas, mientras que las especies perennes generalmente son más robustas, de tallos gruesos, con sistema radicular de mayor diámetro y con mayor profundidad de arraigamiento, que dependerá del tipo de suelo en el cual crezcan.

En general, las plantas de *Andropogon* forman matas cespitosas, a veces robustas, con sistema radicular fasciculado, no hay formación de rizomas a excepción de algunas especies, por ejemplo, *A. gerardii* Vitman y sus subespecies, las cuales poseen rizomas definidos pudiendo formar clones de más de 1 m de diámetro (Norrmann, 1999).

Bowden (1963b), para *A. gayanus* var. *bisquamulatus*, describió tres tipos de raíces: i) raíces fibrosas, finas, las cuales crecen horizontales, inmediatamente por debajo la superficie del suelo, desde el centro del macollo hasta aproximadamente 1 m de longitud; ii) raíces verticales, finas, de crecimiento vertical, observando que pueden llegar a penetrar en el suelo hasta 3 m de profundidad si se dan las condiciones; iii) raíces cordadas, son cortas, gruesas, crecen tanto lateral como verticalmente. Según Bowden



(1963b), estos tres tipos de raíces son, en parte, las responsables de la resistencia a las sequías que posee la planta. También observó la presencia de rizomas de ramificación corta, formando una masa compacta cerca de la superficie del suelo.

Rose-Innes & Clayton W. (1977), describió a *A. gayanus* var. *gayanus*, como rizomatosa y de raíces fúlcreas, de gran valor para cubrir laderas de diques y riberas de ríos erosionadas.

#### - Tallo

Las especies del género presentan tallos o cañas erectas, cilíndricas, de consistencia herbácea, diferenciándose nudos y entrenudos. La distancia entre los nudos se alarga conforme crece la caña en longitud.

#### - Macollas

Generalmente en la base de las cañas, se desarrollan ramificaciones a partir de las yemas de los nudos inferiores. Estas innovaciones o macollos son basales, poseen tallos cortos con entrenudos breves, son intravaginales, es decir que, se desarrollan hacia adentro de la vaina de la hoja tectriz, con crecimiento paralelo al eje madre, sin atravesar la base de la vaina, creciendo el brote joven protegido por la hoja tectriz (Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987).

#### - Altura de planta

El desarrollo de la planta y su altura, están influenciados por las características del ambiente en el que habita, las condiciones climáticas, el tipo de suelo, las condiciones de drenaje. Es conveniente considerar el desarrollo de la planta en dos fases o etapas, una vegetativa y la otra reproductiva.

En América del Norte, el llamado Complejo "*Andropogon virginicus*", de aproximadamente 9 entidades diploides estrechamente interrelacionadas (Campbell, 1982, 1983b), *A. arctatus* Chapman, *A. brachystachyus* Chapman, *A. floridanus* Scribn., *A. glomeratus* (Walter) B.S.P. (var. *glomeratus* (Walter) B.S.P.; var. *glaucopsis* Mohr; var. *hirsutior* (Hack.) C. Mohr; var. *pumilus* (Vasey) L. H. Dewey), *A. gyrans* Ashe (var. *gyrans* Ashe; var. *stenophyllus* (Hackel) Campbell), *A. longiberbis* Hackel, *A. liebmanii* Hackel (var. *A. liebmanii* Hackel; var. *pungensis* (Ashe) Campbell), *A. tracyi* Nash, *A. virginicus* L. (var. *virginicus* L.; var. *glaucus* Hackel), presenta plantas cespitosas, perennes, de poco

más de 1 m de altura (Stebbins, 1957; Lelong, 1965; Kannenberg & Allard, 1967, Campbell, 1983b), contrastando con el grupo *A. gerardii* Vitman-*A. halli* E. Hackel, el cual presenta plantas cespitosas, perennes, de más de 1,5-2 (3) de altura.

Una situación similar a la que ocurre en América del Norte, ha observado Norrmann (1985, 1999) en Sudamérica, sugiriendo que se puede discriminar al género *Andropogon* en dos grupos principales según su nivel de ploidia. Un grupo constituido por entidades cuya altura en floración no supera 1 m (0,40 - 0,80 cm), de habito ruderal, con inflorescencias vellosas y nivel cromosómico diploide ( $2n = 2x = 20$ ): *A. selloanus* (Hack.) Hack., *A. macrothrix* Trin. y *A. leucostachyus* Kunth, pudiendo agregarse a este grupo a *A. ternatus* (Spreng.) Nees., un triploide ( $2n = 3x = 30$ ) con un sistema de poliploidía impar permanente que se transmite por vía sexual (Norrmann, 1985; Norrmann & Quarin, 1987). Y un segundo grupo, integrado por entidades más robustas, de mayor porte, las cuales en floración superan el 1,5 m de altura (1,5-3), con nivel cromosómico hexaploide ( $2n = 6x = 60$ ): *A. lateralis* Nees, *A. hypogynus* E. Hackel, *A. glaziovii* E. Hackel, *A. bicornis* L., *A. arenarius* E. Hackel, *A. exaratus* E. Hackel, *A. barretoii* Norrmann et Quarin sp.nov., *A. glaucophyllus* Rosengurtt, Arrillaga e Izaguirre.

Las especies de *Andropogon*, de la sección *Notosolen*, que habitan el cono sur de Sudamérica, en la fase vegetativa, tienen una altura que varía desde 1,20-1,30 m (*A. glaucophyllus*) a 1,50 m de altura (*A. exaratus*, *A. barretoii*) y, cuando florecen, emiten vástagos o cañas floríferas erectas que alcanzan hasta 2-3 y 4 m de altura. Estas entidades corresponderían al segundo grupo propuesto por Norrmann (1999). A este último grupo se incorporaría, *A. gyanus* que, si bien es un citotipo tetraploide, su altura concuerda con las entidades anteriormente mencionadas.

#### - Prefoliación

La prefoliación es la disposición de la lámina en el macollo antes de salir totalmente de la vaina (Parodi, 1958). En América, algunas especies del género, miembros de la sección *Andropogon* (*A. gerardii*), *Leptopogon* (*A. bicornis*, *A. canaliglumis*, *A. ekmanii*, *A. glaziovii*, *A. glomeratus*, *A. gyrans*, *A. hypogynus*, *A. lateralis*, *A. leucostachyus*, *A. lindmanii*, *A. macrothrix*, *A. selloanus*, *A. ternatus*, *A. ternarius*, *A. virginicus*), presentan prefoliación conduplicada y sus láminas foliares son levemente estrechas en la base, a excepción de *A. arenarius*, que si bien pertenece a esta sección, posee hojas junciformes

(Norrman, 1999). En cambio, los miembros de la sección *Piestium* (*A. angustatus*) y *Notosolen*, representados en Sudamérica por *A. glaucophyllus*, *A. exaratus*, *A. barretoii*, *A. gayanus*, *A. indetonsus*, *A. crispifolius*, presentan prefoliación convoluta y sus láminas foliares son largamente estrechadas en la base dándoles una apariencia pseupeciolas.

#### - Hoja

En general, la lámina foliar, es plana o conduplicada, linear, lanceolada o sublanceolada, de ápice acuminado o largamente acuminado, glabra o pubescente en ambas superficies, con la base de la lámina recta, trunca o estrechándose casi a la nervadura central engrosada formando un pseudopécíolo, con márgenes escabrosos, nervio medio prominente, de color verde o blanquecino.

*Andropogon barretoii*, *A. glaucophyllus*, *A. exaratus* y *A. gayanus*, presentan láminas foliares planas, linear, con ápice largamente acuminado, de márgenes escabrosos.

Ambas superficies de la lámina son glabras en *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. exaratus* y pubescente solo la cara adaxial en *A. gayanus*; en las cuatro entidades, la base de la lámina se estrecha casi hasta la nervadura central, engrosándose y dando el aspecto de un pseudopécíolo, el nervio central es prominente, blanquecino en la cara adaxial y verde en la cara abaxial. La coloración blanquecina del nervio central no se extiende más allá de la mitad de la lámina.

#### - Lígula

La lígula es un apéndice o lámina blanquecina, membranacea que se encuentra en la región superior ventral de la vaina en el límite con la lámina foliar (Parodi, 1958; Nicora & Rúlogo de Agrasar, 1987). Tanto la longitud, la forma, el tipo de margen que posee la lígula, aportan caracteres de valor taxonómico que contribuyen a la identificación de especies (Rosengurtt & Arrillaga, 1958; Rosengurtt et al. 1960; Klapp, 1983; Rosengurtt & Arrillaga, 1987). En *Andropogoneae*, la lígula puede presentarse aguda, obtusa, truncada, entera o crenada, membranacea o papirácea, glabra o pilosa en el dorso, con presencia de aurículas o no, el collar de la lígula generalmente es dividido, glabro, de coloración verde, pálido o vináceo. En *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. exaratus*, la lígula es truncada, membranacea-papirácea de 1-3 mm de longitud, de margen sinuoso, con collar dividido de coloración verde amarillento. Tanto *A. barretoii* como *A. exaratus*, presentan aurículas de la vaina, semejantes a las observadas en *Paspalum repens* Bergius

(Rosengurtt & Arrillaga, 1987), de ápice agudo, que sobrepasan la membrana de la lígula proyectándose en dirección más o menos paralela al eje foliar, con escasas cilias hialinas de 1-1,5-2 mm de longitud. En *A. barretoii* miden 3-3,5 mm x 2 mm y en *A. exaratus*, son más breves, de 2 mm x 0,9 mm. La morfología de la lígula, se un carácter muy útil, que permite separar a *A. gayanus* de las demás entidades de la sección *Notosolen* de cono sur de Sudamérica. Su lígula es de 1-1,5 mm de longitud, membranácea, con coloración fuertemente púrpura y con abundantes cilias de 3-4 mm en el borde superior, no posee aurículas, tiene un collar muy pubescente, con tonalidad vinácea, dividido y presencia de nectarios extraflorales a ambos lados de la región de la lígula (zona de coloración fuertemente púrpura y abundantemente pilosa). La presencia de nectarios extraflorales fue descrita por Bowden (1971) en *A. gayanus* var. *bisquamulatus* (Hochst.) Hack. Siendo esta una característica de importancia y exclusiva de esta especie, ya que no ha sido observada en ninguna otra entidad de la sección *Notosolen* ni de otra sección en Sudamérica.

#### - Vaina

La vaina está inserta en el nudo rodeando en forma más o menos estrecha a la caña o tallo. Su longitud puede variar, siendo mayor o menor que el entrenudo que cubre (Rosengurtt & Arrillaga, 1987). Es paralelinervada, glabra o pilosa, cilíndrica, de color verde, glauca o púrpura, con márgenes membranáceos o hialinos, que pueden estar solapados o juntos y entonces la vaina es abierta o hendida, o pueden presentarse unidos y formar una vaina entera o cerrada (Rosengurtt & Arrillaga, 1987). En *A. barretoii*, *A. glaucophyllus*, *A. exaratus* y *A. gayanus*, la vaina es abierta, de la misma coloración que la lámina, con márgenes solapados, glabra en ambas caras en *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. exaratus*; y fuertemente pubescente en la cara externa en *A. gayanus*, especialmente en estados jóvenes de la planta.

#### - Coloración del follaje

La variación de la coloración del follaje, en hojas y cañas, fue referida por Campbell (1983b), Norrmann (1999) y Zanin (2001). Esta variación se puede observar en *A. lateralis*, comúnmente conocido como “paja colorada”, justamente por la coloración

rojiza que adquiere el follaje luego de la floración; también se ha observado una tonalidad púrpura-vinácea en las hojas adultas y en las vainas de *A. gerardii*, *A. barretoii* y *A. exaratus*, los cuales mantienen su color verde durante todo su ciclo de vida, en cambio, *A. glaucophyllus*, presentan en su follaje un tono glauco-azulino. Esta coloración muy particular, se debe a la presencia de una capa cerosa blanquecina en el follaje, lo que la diferencia de las otras especies aquí tratadas. Posiblemente, esta particularidad sea producida en aquellas especies que están expuestas a una intensa radiación solar (Barber, 1955; Barthlott, 1981; Campbell, 1983b), de hecho, *A. glaucophyllus* habita los suelos arenosos del litoral marítimo de Uruguay y morros graníticos de estados de Rio Grande do Sul y Santa Catarina.

#### - Inflorescencias

En Andropogoneae, debido a su alta complejidad, una de las mayores fuentes de variación es la inflorescencia (Clayton, 1972a, 1981). En esta tribu, las estructuras reproductivas generalmente se originan partir de las ramificaciones de los nudos superiores de las varas florales. Troll (1964) y Weberling (1989b), denominan inflorescencia al sistema de vástagos especializados para la formación de flores, que puede presentarse con muchas variantes. La disposición y forma que adquiera la inflorescencia, determinará la apariencia externa de la planta pudiendo brindar importantes elementos comparativos (Weberling, 1989b). Son numerosos los trabajos que describen la arquitectura y variación de las inflorescencias de algunos géneros dentro de la tribu, incluyendo algunas especies dentro del género, utilizando el sistema de análisis tipológico desarrollado por Troll (1964) y Weberling (1989b) para la interpretación de las inflorescencias. Dicho sistema, ha demostrado ser de gran utilidad tanto para la descripción de las inflorescencias (Rua, 1999), como así también, para reconocer caracteres de valor filogenético (Nickol, 1995; Rua & Aliscioni, 2002; Rua, 2003; Liu et al., 2005; Reinheimer & Vegetti, 2008).

Diversos autores (Vegetti, 1986, 1987, 1991, 1992a, 1992b, 1993, 1994, 1997, 1999; Vegetti & Tivano, 1991; Cámara Hernández & Rua, 1991; Schneider & Vegetti, 1992; Cámara Hernández & Miente Alzogaray, 1994; Vegetti & Anton, 1995; Vegetti & Weberling, 1996; Vega, 1997; Rua & Weberling, 1998; Vegetti & Anton, 2000; Vegetti & Müller-Doblies, 2004; Peichoto & Vegetti, 2007; Reinheimer & Vegetti, 2008; Nagahama

et al., 2013), analizaron tipológicamente, diferentes representantes de las Poaceae, estableciendo relaciones y comparaciones entre los distintos taxones.

Entre los caracteres a menudo considerados para la identificación de taxones, el análisis de la inflorescencia, una estructura muy característica a nivel de la tribu, ha sido uno de los menos utilizados, quizá porque no siempre ha sido bien interpretada, sin embargo, su valor es muy relevante (Vegetti & Anton, 1995; Nagahama et al., 2013). Clayton (1987), remarcó la necesidad de contar con estudios detallados para conocer el grado de variación en la arquitectura de su inflorescencia, una panícula compuesta típica de la tribu Andropogoneae.

Los taxones pertenecientes a la sección *Notosolen* del cono sur de Sudamérica, presentan las varas florales de 1,50-3 m de longitud, erguidas, con nudos glabros. *Andropogon barretoi*, presenta en cada nudo, 2-3 ramificaciones simples (terminando en un grupo de racimos) y 1-3 subramosos. Inflorescencia con 5-6-15 (-16) racimos erguidos, espiciformes, digitados o subdigitados, de 7-12 cm de longitud, con 12-25 artejos; espateola de 10-18 cm de longitud, estrecha, lanceolada, aguda, excerta de los racimos. En *A. exaratus*, la inflorescencia consta de 2-4 (-5) racimos espiciformes, desiguales en longitud, de 4-10 cm de largo, gráciles, erectos; espateola angosta, escabérula, notablemente excerta de los racimos. En *A. glaucophyllus* las varas florales son de 1-2 m de longitud, con nudos glabros. En cada nudo con 2-3 inflorescencias simples y 1-3 subramosas. La inflorescencia es laxa, alargada, compuesta por unidades de inflorescencias terminales y axilares de 6-11 cm de longitud, con 2-30 ramos floríferos simples o con ramificaciones secundarias desiguales en su longitud, exertos o parcialmente incluidos en la espateola. Las ramificaciones axilares en número superior a 5; espateola estrecha, lanceolada, aguda, de 10-18 cm de longitud. *Andropogon gayanus*, laxa, erguida, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares de 5-6 cm de longitud, con 2 racimos de espiguillas simples, iguales o diferentes en longitud, espiciformes, conjugados o subdigitados, excertos o parcialmente incluidos en la espateola. Espateola de 5-6-6,5-7 cm de longitud, lanceolada, de ápice mucronado, mucrón de 2 mm de longitud; raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sésil. El diásporo terminal de cada racimo de espiguillas compuesto por una espiguilla sésil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas, el diásporo medio compuesto por 1 espiguilla sésil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejo rectilíneo,

subclavado, coriáceo, de 5 mm x 1 mm, lado dorsal convexo, lado ventral plano y levemente hendido, ápice levemente dilatado, fuertemente cóncavo, notablemente oblicuo, dentado, con una hilera de ciliás hialinas en ambas márgenes, ciliás de 4-4,5 mm de longitud desde la mitad del artejo hacia el ápice, hacia la base ciliás de 1,5-2 mm de longitud. Callo oblicuo de 0,5 mm, piloso, con ciliás rígidas, hialinas, de 0,5-1 mm de longitud.

### **Tipología de las Inflorescencias**

La familia de las Poaceae, es una de las familias más interesantes dentro de las Monocotiledóneas, particularmente por la morfología de sus inflorescencias, las cuales son consideradas extremadamente complejas (Troll, 1969; Stebbins, 1982).

Se define como inflorescencia a todo vástago o sistema de vástagos portadores de flores (Rua, 1999), o al sistema de vástagos especializados para la formación de flores, el cual sufre modificaciones de mayor o menor grado (Troll, 1964; Weberling, 1989b). Este término estaría estrictamente referido a la porción del vástago, en la cual no habría desarrollo de hojas o follaje, ya que el límite entre la región vegetativa y la inflorescencia fue establecido basándose en la posición de la última hoja del follaje (Goebel, 1931). Troll (1964), considera que los órganos foliares pueden formar parte o no de las inflorescencias, demostrando que no se puede delimitar las inflorescencias en base a la formación de follaje, coincidiendo con Weberling (1989a), en que los órganos vegetativos presentes en las inflorescencias, pueden ser similares a los ya existentes en las porciones vegetativas o estar modificados.

En las gramíneas, las plantas, poseen brotes de orden consecutivo de ramificación (Moore & Mooser, 1995; Nagahama et al., 2013). Cada uno de ellos constituye un vástago o innovación, el cual, normalmente, acorde con la tipología de Troll, culmina y constituye una sinflorescencia (Vegetti 1991; Tivano et al., 2008; Perreta et al., 2009).

De acuerdo con Vegetti (1994), en Andropogoneae, la inflorescencia está compuesta de vástagos floríferos poco o muy ramificados, pudiendo presentarse, digitados, geminados o solitarios, apanojados, sin brácteas o integrados a un sistema folioso muy desarrollado.

Según el tipo de inflorescencia que forman estos vástagos, Vegetti (1994), identificó el “Tipo *Andropogon*”, donde la inflorescencia de este tipo, está formada por un vástago

florífero terminal y 1 (-2) ramas laterales que llevan pares de espiguillas sin brácteas y un número variable de vástagos laterales, de grado variable de ramificación, que surgen de las axilas de brácteas del eje principal. A su vez, de este tipo se desprenden varios subtipos:

- \* “Subtipo *Andropogon selloanus*”, que se caracteriza por un número reducido de vástagos laterales primarios (3-4) que pueden llevar ramas profilares de hasta orden 4; siendo más comunes inflorescencias con ramificaciones primarias o secundarias.
- \* “Subtipo *Andropogon lateralis*”, formada por un número reducido de vástagos floríferos laterales primarios (3-4) que se ramifican a partir de la yema axilar de sus profilos, originando ramas de hasta séptimo orden. Estos vástagos, a su vez, pueden ramificarse a partir de la a axila de sus brácteas a excepción de la bráctea distal.
- \* “Subtipo *Andropogon bicornis*”, está formada por numerosos vástagos floríferos laterales con profilos y un número importante de brácteas (5-6). A partir de la yema axilar de los profilos y de las brácteas se generan vástagos laterales consecutivos profusamente ramificados.

El término sinflorescencia, se aplica al sistema completo de vástagos floríferos originados a partir de una yema apical del eje embrional o de una yema de innovación (Rua, 1999), la cual podría ser de un período de crecimiento anual o perenne. Uno de esos vástagos es el eje principal de la planta y los otros son los brotes axilares, es decir, las ramificaciones basales o innovaciones, generados en una zona basal de entrenudos cortos (Rua & Weberling, 1998).

Para aplicar el concepto de sinflorescencia en Poaceae, es importante conocer el plan estructural de todo el sistema de floración, en el cual, de acuerdo con Troll (1964) y Weberling (1965), se debería reconocer una **zona de innovación (ZI)**, una **zona de inhibición (ZH)** y una **zona paracladial o de enriquecimiento (ZP ó ZE)**.

- **Zona de innovación (ZI)**: es la zona en la que se originan los brotes llamados innovaciones o vástagos de orden consecutivos. La porción proximal de estos brotes, posee yemas, que dan lugar a innovaciones de segundo orden y así sucesivamente. Todas estas innovaciones, son producidos durante el mismo período vegetativo que el eje principal, de los cuales algunos se desarrollan hasta florecer (Cámara-Hernández & Rua, 1991).



- **Zona de inhibición (ZH):** es la zona que se encuentra por sobre la **ZI** e inmediatamente por debajo de la zona paracladial. En la zona de inhibición, los entrenudos se alargan, las yemas axilares no generan vástagos y las hojas presentes están más desarrolladas, diferenciándose en lámina y vaina. El desarrollo de paracladios está generalmente inhibido. En esta zona podemos encontrar a la hoja bandera.
- **Zona paracladial o de enriquecimiento (ZP ó ZE):** se encuentra por encima de la **ZH**. En esta región, las yemas axilares generan brotes llamados paracladios, pudiendo reconocerse una **subzona de paracladios cortos (zPc)** y una **subzona de paracladios largos (zPl)**. Para una mejor interpretación, la subzona de paracladios cortos, forma el “racimo de espiguillas espiciformes” (Vegetti, 1994, 1999).

En la mayoría de las especies de Andropogoneae, el paracladio corto, está compuesto por un par de espiguillas, por lo cual es un paracladio corto de segundo grado (Vegetti, 1994, 1999), a excepción de *Dimeria ornithopoda* Trinius, donde cada paracladio corto consiste en una única espiguilla; o como en el género *Polytrias* Hackel y en algunas especies de *Lasiurus* Boissier (Clayton & Renvoize 1986) donde forma tríadas.

En esta zona, también llamada de enriquecimiento, los vástagos o innovaciones, son ejes de enriquecimiento que culminan en inflorescencias laterales, generalmente similar a la inflorescencia terminal (Vegetti & Weberling, 1996).

En cada sinflorescencia se pueden reconocer el **trofotagma (TT)** y la **unidad de inflorescencia (UIF)**. El término **trofotagma (TT)**, fue introducido por Hagemann (1990), para designar la región vegetativa basal de los brotes, la zona de alimentación de entrenudos cortos (zona de innovación), el área de entrenudos largos (zona de inhibición) y la porción basal de la zona de enriquecimiento (Vegetti & Weberling, 1996).

En algunas especies de Andropogoneae, los nudos del eje principal que no desarrollan la bráctea tectriz, pueden originar paracladios largos, y a su vez estos, carecen de brácteas y profilos, con excepción de las que forman las espiguillas, a estos se los denomina **paracladios largos sin trofotagma (IPst)** (Vegetti, 1994, 1999; Vegetti & Weberling, 1996; Rua & Weberling, 1998; Vegetti & Müller-Doblies, 2004; Nagahama et al., 2013); mientras que en otras, se originan a partir de yemas axilares de brácteas con hojas desarrolladas y así poseen brácteas y profilos, a estos se los denomina

**paracladios largos con trofotagma (IPct)** (Vegetti, 1994, 1999; Vegetti & Weberling, 1996; Rua & Weberling, 1998; Vegetti & Müller-Doblies, 2004).

Las brácteas, aquí presentes, pueden ir reduciendo su lámina acrópetamente, las distales reciben el nombre de **espateolas** y las que se disponen sobre el eje principal **espatas**. A partir de los brotes axilares de estos ejes de enriquecimiento, se pueden originar nuevos ejes con sistemas complejos de estructuras similares, formados por paracladios largos de orden consecutivo (Vegetti & Weberling, 1996), contribuyendo así, al incremento de ramas floríferas en la planta (Rua & Weberling, 1998).

### **Descripción de la tipología de las especies de la sección *Notosolen* Stapf. del cono sur de Sudamérica**

#### **Zona de la Sinflorescencia:**

En las entidades de la sección *Notosolen* estudiadas, cada planta está compuesta de un grupo de vástagos que forman ramificaciones de orden consecutivo, originándose en la **zona de innovación**. Estos vástagos representan las sinflorescencias. En cada sinflorescencia reconocemos el **trofotagma (TT)** y la **unidad de inflorescencia (UIF)**. La zona de trofotagma, tiene catafilos proximales y hojas de follaje y por lo general, comprende una zona proximal con entrenudos cortos (**zona de entrenudos cortos, SIZ**), y una zona distal de entrenudos largos (**zona de entrenudos largos, LIZ**). Las yemas axilares del **SIZ**, desarrollan brotes laterales intravaginales (innovaciones), y, en consecuencia, el **SIZ** representa la **zona de innovación**. En esta zona, las hojas están bien desarrolladas, formadas por una vaina, un pseudopécíolo y una lámina, en la que la vaina es más larga que los entrenudos. La **LIZ**, está representada por una **zona de inhibición proximal (ZH)**, donde no hay desarrollo de las yemas axilares de las hojas, y una **zona de enriquecimiento distal (ZE)**, donde las yemas pueden generar vástagos floríferos. Estos vástagos son los ejes de enriquecimiento o **paracladios del trofotagma (Pc<sub>TT</sub>)**.

La **zona de innovación (ZI)** (Figura 1 y 3 A) de *A. barretoii* y *A. glaucophyllus*, y mide 14-16 cm de longitud. Es una zona de 10-11 entrenudos, destacándose entrenudos muy cortos, de 0.2-0.5 cm de longitud en *A. barretoii* y de 0,6-0,9 en *A. glaucophyllus* y entrenudos cortos de 1,5-8 cm de longitud en ambos taxones. En *A. exaratus* (Figura 2 A) mide 4,5-6 cm de longitud, con entrenudos muy cortos, de 1-1,5 cm de longitud, y en *A. gayanus* (Figura 4 A) esta zona mide 10-15 cm de longitud, con 4-5 entrenudos cortos de 2-6 cm de longitud. En esta zona, todos los taxones poseen hojas bien desarrolladas

constituidas por vaina, lígula, pseudopécíolo y lámina. Tanto las yemas axilares de los entrenudos cortos, de los vástagos basales y de vástagos erguidos aéreos generan innovaciones (macollas), las cuales son abundantes en *A. glaucophyllus* y *A. gayanus*, y menos frecuentes en *A. barretoii* y *A. exaratus*.

La **zona de inhibición (ZH)**, de *Andropogon barretoii* (Figura 1 A) es de 60-75 cm de longitud y presenta 5-6 entrenudos largos; en *A. glaucophyllus* (Figura 3 A) esta zona mide 65-70 cm de longitud, con 5-7 entrenudos largos; en *A. exaratus* (Figura 2 A) esta zona mide 90-120 cm de longitud y cuenta con 8-10 entrenudos largos; en *A. gayanus* (Figura 4 A) esta zona mide 50-75 cm, donde se encuentran hojas bien desarrolladas y algunas yemas axilares pueden generar macollos en vástagos aéreos. En algunos ejemplares analizados de *A. gayanus*, no se observó la zona de inhibición, mostrando la formación de vástagos floríferos, inmediatamente después de la zona de innovación.

En los nudos de la **SIZ** y **HZ** de todas las entidades analizadas, se originan hojas de follaje bien desarrolladas, constituidas de vaina, lígula, pseudopécíolo y lámina. Siendo la vaina de mayor longitud que los entrenudos (Figura 1, 2, 3 y 4 A).

#### **Análisis de la zona de enriquecimiento:**

La variabilidad entre las sinflorescencias dentro de la sección, se debe principalmente, al grado de desarrollo de la **zona de enriquecimiento**. El análisis de la longitud y número de entrenudos de la **zona de enriquecimiento** del eje principal, mostraron que, la misma, en *A. barretoii* y *A. glaucophyllus* (Figura 1 y 3 A) es larga (94,5 cm y 80 cm, respectivamente) y en *A. exaratus* (Figura 2 A) es corta (36,5 cm). En estas especies, dicha zona está compuesta por pocos entrenudos (5-7 en *A. barretoii* y *A. glaucophyllus*; y 4-6 en *A. exaratus*). Como resultado, las sinflorescencias son poco ramificadas y de aspecto laxo. Comparada con las otras entidades analizadas, *A. gayanus* (Figura 4 A) muestra la zona de enriquecimiento de mayor longitud (177,5-180 cm), la cual está compuesta por numerosos entrenudos (11-12), y las sinflorescencias se muestran muy ramificadas y foliosa.

En la zona de enriquecimiento o zona paracladial, las yemas axilares de las hojas desarrolladas, generan vástagos floríferos, son los paracladios. Cuando estos paracladios constan de perfilos y de 1-numerosas brácteas, constituyen los **paracladios largos con trofotagma (IPC<sub>TT</sub>)**; en cambio, cuando estos paracladios carecen de perfilos

y brácteas (a excepción de las que constituyen las espiguillas) se denominan **paracladios largos sin trofotagma ( $IP_{c_{\pi}}$ )**. A partir de la yema axilar del profilo, puede desarrollarse un paracladio largo secundario, con el mismo patrón estructural que el anterior (Vegetti, 1992).

En la **ZE** de *A. barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gayanus*, (Figura 1, 2, 3 y 4 A) la vaina continúa teniendo mayor longitud que el entrenudo, aunque, disminuyendo hacia la región distal del eje principal. Cada nudo presenta una hoja bien desarrollada, en las cuales, el pseudopeciolo está ausente o se acorta hasta desaparecer (*A. gayanus*) (Figura 4 A), quedando la hoja conformada por vaina, lígula y lámina, la cual también disminuye notablemente su longitud (1-1,5 cm) hacia la zona distal.

En cada nudo del eje principal de la **ZE** de *A. barretoii* y *A. glaucophyllus* (Figura 1 y 3 A) se observan **paracladios largos con trofotagma ( $IP_{c_{\pi}}$ )**, es decir, que estos paracladios poseen hojas en la porción basal y se originan a partir de las yemas axilares de las brácteas. Estas brácteas corresponden a las hojas desarrolladas, en las cuales, en esta zona de enriquecimiento, se acorta el pseudopeciolo hasta desaparecer. Además, se observa, 1 profilo adaxial de 11-16,5 cm x 0,5 cm, linear y estrecho cercano al eje principal, el cual protege al primer  **$IP_{c_{\pi}}$**  envolviéndolo, y 2 perfiles, de 6-7,5 cm de longitud, lineares y muy estrechos (0,2 cm). La región de  **$IP_{c_{\pi}}$**  abarca de 1-4 nudos sobre el eje principal y su longitud es de 12-20 cm.

La yema axilar del profilo de cada paracladio largo con trofotagma, puede originar un paracladio largo de características similares al primario ( **$IP_{c_{\pi}}$** ), en el cual la yema axilar del profilo, origina otros paracladios largos con trofotagma de orden superior al primario y consecutivo. En *A. barretoii* se observaron paracladios largos de trofotagma de segundo orden ( **$IP_{c_{\pi'}}$** ) y hasta de tercer orden ( **$IP_{c_{\pi''}}$** ) (Figura 1 A).

En los  **$IP_{c_{\pi}}$**  de orden consecutivo, la bráctea distal (espateola), es estéril, linear, lanceolada, de ápice agudo, la cual al principio encierra a la unidad de inflorescencia (**UIF**) inmadura, para luego hacerse excerta a medida que los racimos espiciformes maduran.

Los paracladios del trofotagma constan de un corto hipopodio, un profilo adaxial, un epipodio largo y un numero variable de brácteas, por ejemplo 2-3 en *A. barretoii* y *A. glaucophyllus*; 2-4 en *A. exaratus* y 6 en *A. gayanus*. A partir de la yema axilar del profilo y de las brácteas, pueden originarse paracladios largos con trofotagma de orden

siguiente, a excepción de la hoja distal estéril (hoja bandera) de cada  $Pc_{TT}$ , cuyas yemas axilares no generan brotes.

En el extremo distal del eje principal y de cada paracladio del trofotagma, se encuentra la **UIF**, constituida por los **paracladios de la unidad de inflorescencia ( $Pc_{UIF}$ ) o subzona de paracladios cortos ( $zPc$ )**. En esta **subzona**, los paracladios cortos se concentran sobre un raquis articulado, formado según la especie, un número variable de racimos de espiguillas espiciformes, digitados o subdigitados, de diferentes longitudes (5-13 cm), los cuales se unen al eje principal del vástago florífero a través de pedúnculos cortos (0,2-0,5-1,5 cm), adquiriendo todo el conjunto un aspecto laxo y grácil (Figura 1, 2, 3 y 4 A, B y C)

Cada **paracladio corto ( $zPc$ )**, está representado por un par de espiguillas, una sésil y la otra pedicelada, con la excepción del **paracladio corto distal** (paracladio corto terminal **TsP**) el cual se reduce a una espiguilla individual y, según Weberling et al. (1993), correspondería a un paracladio corto de segundo orden (Figura 1, 2, 3 y 4 A, B).

En *A. exaratus*, en cada nudo del eje principal de la **ZE**, se observan **paracladios largos con trofotagma ( $IPc_{TT}$ )**, los cuales se originan a partir de las yemas axilares de las brácteas. Estas brácteas corresponden a las hojas desarrolladas, las cuales son lanceoladas, lineares, de ápice agudo. La vaina de esas brácteas, disminuye su longitud acrópetamente hasta reducirse a una vaina (bráctea distal del eje principal y de cada paracladio largo con trofotagma). Además, se observan, 1 perfil de 4,5-12 cm x 0,5 cm, cercano al eje principal, que protege al primer  **$IPc_{TT}$** , envolviéndolo. También se observan 2-3 perfiles, de 2,5-5 cm de longitud, lineares, estrechísimos, que, cuando se presentan 3 perfiles, 2 de ellos tienen la misma longitud y el otro es de mayor longitud (Figura 2 A).

Cada  **$IPc_{TT}$** , presenta 1-2-(-3) nudos con sus brácteas respectivas, de 9,5-14 cm de longitud, de lámina aguda, estrecha, de 1-1,5 cm x 0,5 cm y 1-2 perfiles de 2-8 cm de longitud. En el  **$IPc_{TT}$  inferior**, la yema axilar del perfil genera un paracladio de similares características que el primario ( **$IPc_{TT}$** ), en el cual la yema axilar del perfil, origina otros paracladios de orden superior al primario y consecutivo. En *A. exaratus* se observaron paracladios largos de trofotagma de segundo orden ( **$IPc_{TT'}$** ) y de tercer orden ( **$IPc_{TT''}$** ) aunque rara vez.

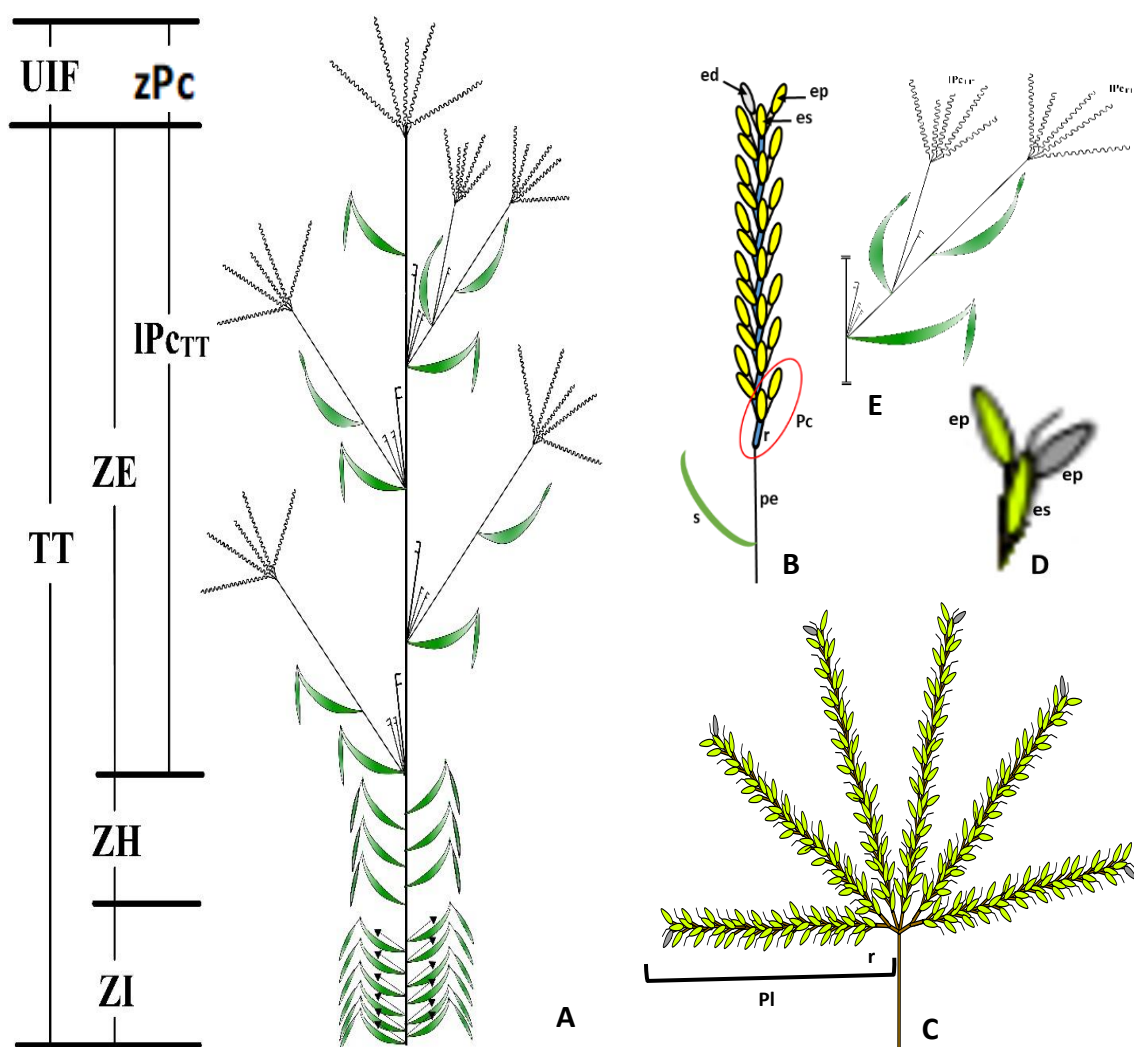
La bráctea distal (**espateola**), es estéril, linear, lanceolada, de ápice agudo, de 8-10-13 cm de longitud que al principio encierra a la **unidad de inflorescencia (UIF)** inmadura, para luego hacerse excerta a medida que los racimos maduran.

En el extremo distal del eje principal y de cada paracladio del trofotagma, se encuentra la **UIF**, constituida por la **subzona de paracladios cortos (zPc)** (Figura 1, 2, 3 y 4 A, B y C). En esta zona, los paracladios cortos se concentran sobre un raquis articulado, formado de 2-3-(-4) racimos de espiguillas espiciformes, digitados, de diferentes longitudes (3,5-10 cm), los cuales se unen al eje del vástago florífero a través de pedúnculos cortos (0,5-1,5 cm), que pueden articularse entre sí, adquiriendo todo el conjunto un aspecto laxo y grácil. En la mayoría de las **UIF**, en el ángulo entre dos pedúnculos, se observa un **paracladio corto**.

Cada **paracladio corto (zPc)**, está representado por un par de espiguillas, una sésil y la otra pedicelada, con la excepción del **paracladio corto distal** (paracladio corto terminal **TsP**) el cual se reduce a una espiguilla individual.

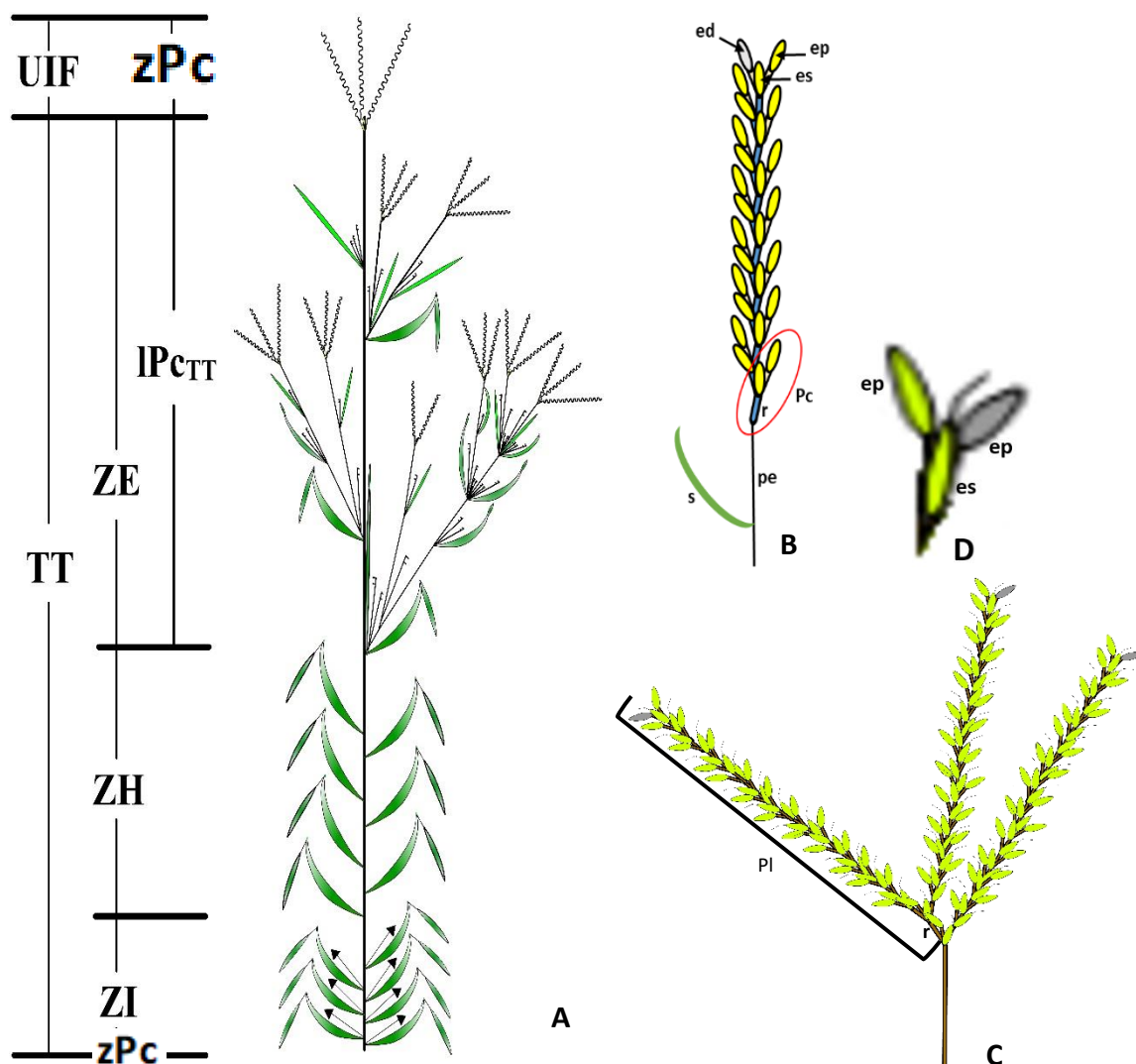
En *A. gayanus*, en cada nudo del eje principal de la **ZE**, se observan **paracladios largos con trofotagma (IPcTT)** (Figura 4 A), los cuales se originan a partir de las yemas axilares de las brácteas. Estas brácteas corresponden a las hojas desarrolladas constituidas por vaina, lígula, pseudopeciolo y lámina. La vaina, disminuye su longitud acrópetamente hasta reducirse a una bráctea distal tanto en el eje principal como en cada paracladio largo con trofotagma. Además, se observan, 1 profilo de 5,5-12,5 cm x 0,5 cm, cercano al eje principal, el cual protege al primer **IPcTT**, envolviéndolo.

Cada **IPcTT**, va acompañado de 1 profilo estrecho (0,2-0,3 cm), de ápice marcadamente bidentificado. En el **IPcTT**, la yema axilar del profilo genera un paracladio de similares características (**IPcTT de primer orden**). Luego, la yema axilar del profilo del paracladio de primer orden desarrolla un paracladio de segundo orden (**IPcTT'**); la yema axilar del profilo del paracladio de segundo orden, desarrolla un paracladio de tercer orden (**IPcTT''**) y así sucesivamente formando **IPcTT de orden consecutivo**, cada uno con 1 profilo, observándose **IPcTT** de hasta 18° orden. El eje de cada **IPcTT** presenta 1 nudo con una bráctea distal (**espateola**), la cual es estéril, linear, lanceolada, estrecha, de ápice agudo, cuya longitud aumenta hasta alcanzar 12-12,5 cm. Esta bráctea, protege en su interior al **racimo espiciforme** inmaduro, para luego hacerse excerta a medida que los racimos maduran.



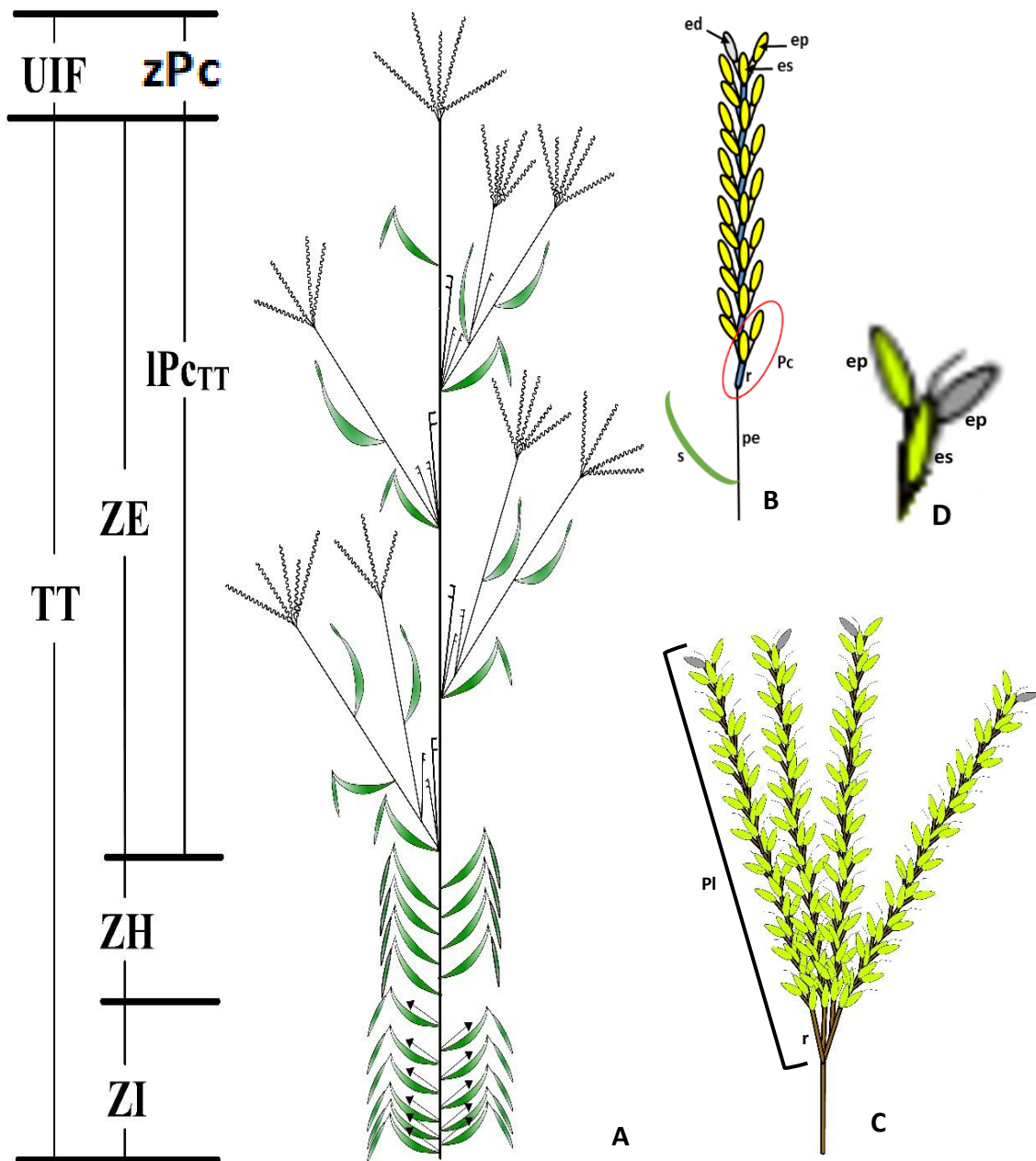
**Figura 1. A. Esquema de la Sinflorescencia de *A. barrettoi*. B. Zona de paraclados cortos. C. Conjunto de paraclados largos. D. Diásporo terminal. E. Ramificación de segundo orden, a partir de una bráctea y un profiko. Referencias: Pc: paracladio corto; Pc<sub>TT</sub>: subzona de paraclados del trofotagma (Pc<sub>TT1</sub> paraclados del trofotagma primario; Pc<sub>TT2</sub> secundario; Pc<sub>TT3</sub> terciario; Pc<sub>TT4</sub> cuaternario de primer orden y Pc<sub>TT4'</sub> de segundo orden); Pl: paracladio largo; UIF: unidad de inflorescencia; ZE: zona de enriquecimiento; ZH: zona de inhibición; ZI: zona de innovación; zPc: subzona de paraclados cortos; TT: trofotagma; ed: espiguilla distal; ep: espiguilla pedicelada; es: espiguilla sésil; pe: pedúnculo; r: artejo del raquis; s: espateola.**



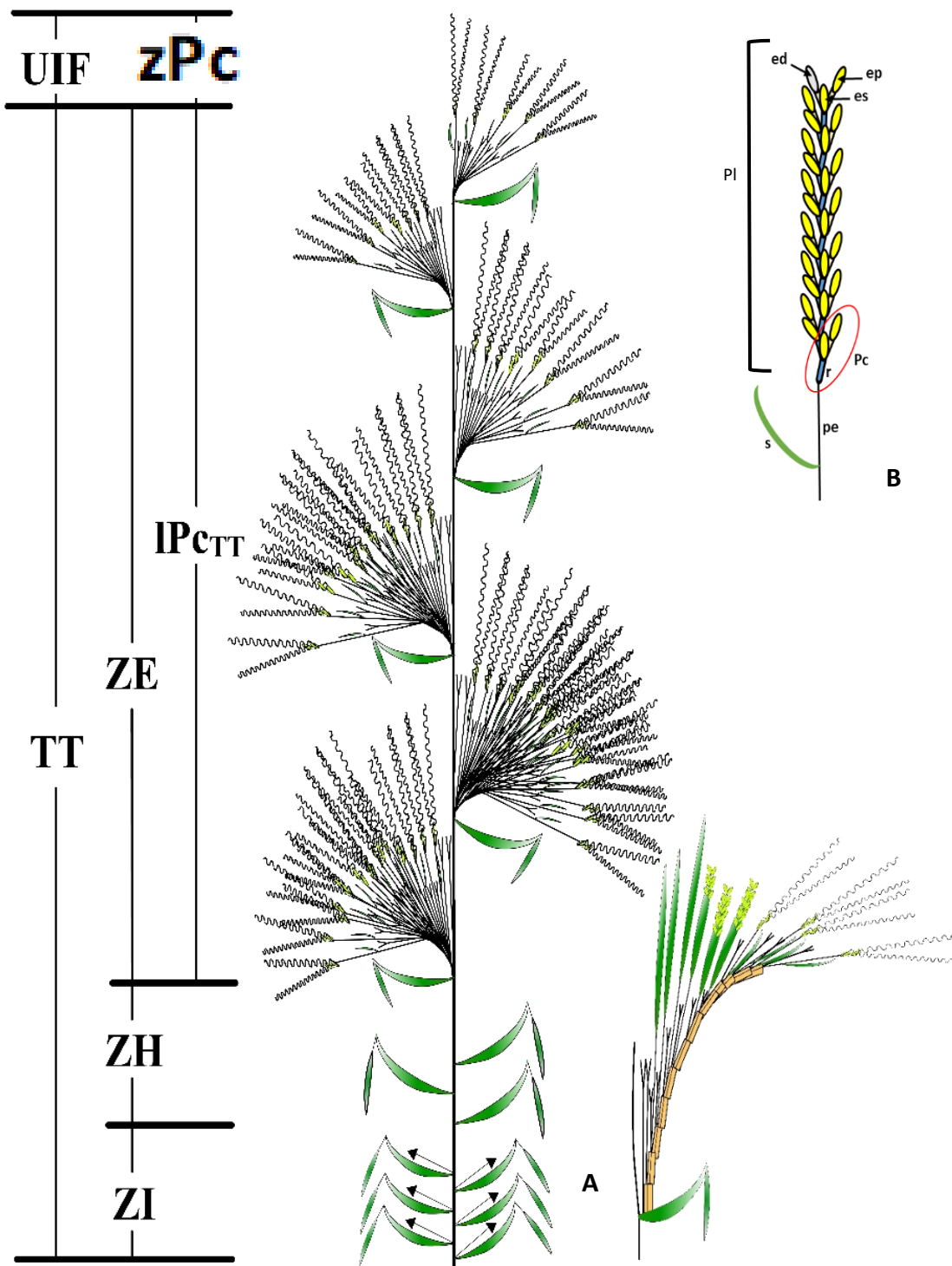


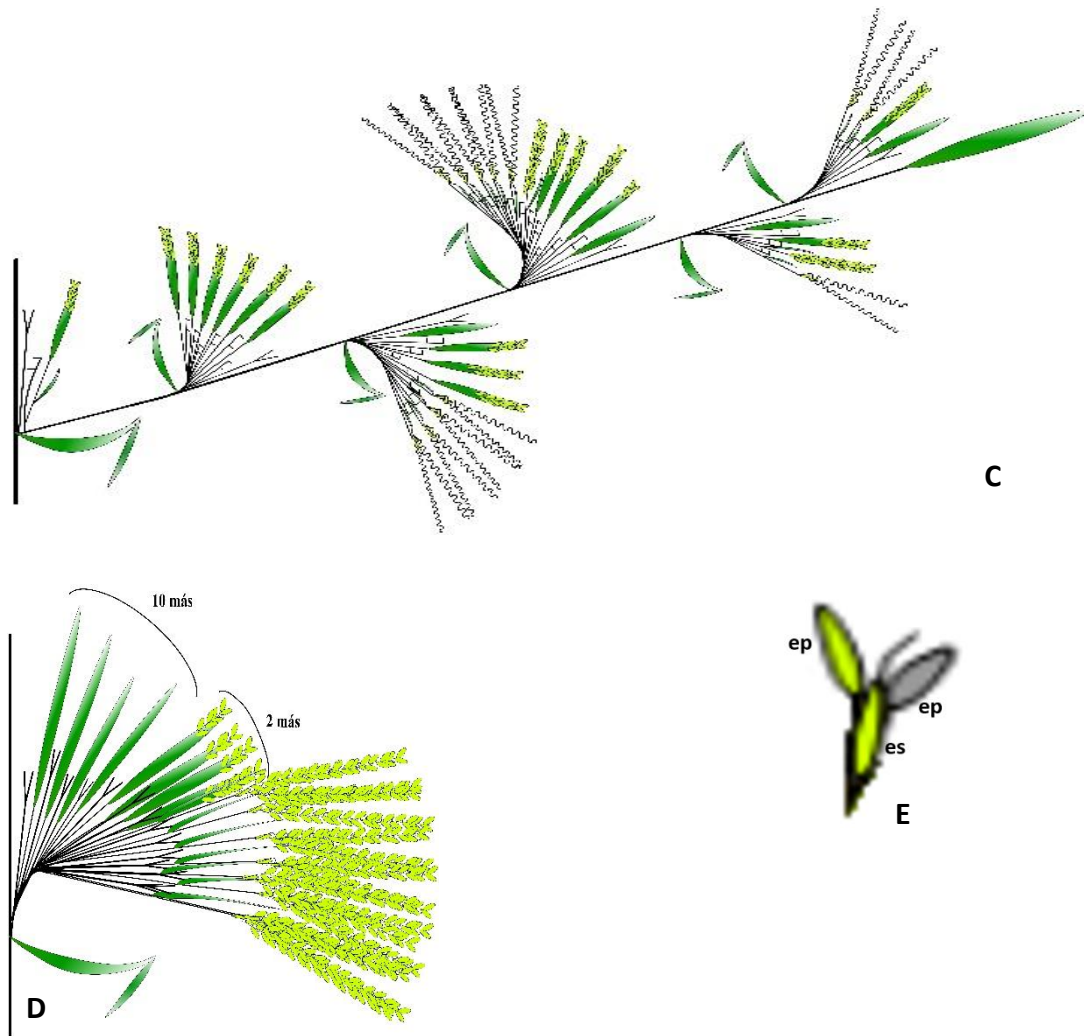
**Figura 2. A. Esquema de la Sinflorescencia de *A. exaratus*. B. Zona de paracladios cortos. C. Conjuntode paracladios largos. D. Diásporo terminal.** Referencias: Pc: paracladio corto;  $Pc_{TT}$ : subzona de paracladios del trofotagma ( $Pc_{TT1}$  paracladios del trafotagma primario;  $Pc_{TT2}$  secundario;  $Pc_{TT3}$  terciario;  $Pc_{TT4}$  cuaternario de primer orden y  $Pc_{TT4'}$  de segundo orden); Pl: paracladio largo; UIF: unidad de inflorescencia; ZE: zona de enriquecimiento; ZH: zona de inhibición; ZI: zona de innovación; zPc: subzona de paracladios cortos; TT: trofotagma; ed: espiguilla distal; ep: espiguilla pedicelada; es: espiguilla sésil; pe: pedúnculo; r: artejo del raquis; s: espateola.





**Figura 3. A. Esquema de la Sinflorescencia de *A. glaucophyllus*. B. Zona de paraclados cortos. C. Conjuntode paraclados largos. D. Diásporo terminal.** Referencias: Pc: paracladio corto; Pc<sub>TT</sub>: subzona de paraclados del trofotagma (Pc<sub>TT</sub>1 paraclados del trafotagma primario; Pc<sub>TT</sub>2 secundario; Pc<sub>TT</sub>3 terciario; Pc<sub>TT</sub>4 cuaternario de primer orden y Pc<sub>TT</sub>4' de segundo orden); Pl: paracladio largo; UIF: unidad de inflorescencia; ZE: zona de enriquecimiento; ZH: zona de inhibición; ZI: zona de innovación; zPc: subzona de paraclados cortos; TT: trofotagma; ed: espiguilla distal; ep: espiguilla pedicelada; es: espiguilla sésil; pe: pedúnculo; r: artejo del raquis; s: espateola.





**Figura 4. A. Esquema de la Sinflorescencia de *A. gayanus*. B. Rrepresentación de la inserción de los paracladios cortos. C-D. Ramificación de orden consecutivo a partir de una bráctea y un perfil. E. Diásporo terminal.** Referencias: Pc: paracladio corto;  $Pc_{TT}$ : subzona de paracladios del trofotagma ( $Pc_{TT1}$  paracladios del trafotagma primario;  $Pc_{TT2}$  secundario;  $Pc_{TT3}$  terciario;  $Pc_{TT4}$  cuaternario de primer orden y  $Pc_{TT4'}$  de segundo orden); Pl: paracladio largo; UIF: unidad de inflorescencia; ZE: zona de enriquecimiento; ZH: zona de inhibición; ZI: zona de innovación; zPc: subzona de paracladios cortos; TT: trofotagma; ed: espiguilla distal; ep: espiguilla pedicelada; es: espiguilla sésil; pe: pedúnculo; r: artejo del raquis; s: espateola.

### - Entrenudo del raquis y pedicelo

El estudio de la forma del entrenudo del raquis, del pedicelo y las características de la gluma inferior de la espiguilla sésil, son características de importancia para la identificación de las especies y su ubicación en las diferentes secciones delineadas por Stapf (1917-1919), incluyendo a las especies africanas. Mientras que la forma filiforme o linear fue caracterizada para las secciones *Andropogon* y *Leptopogon*, las formas clavadas, cuneada u oboval lo fueron para las secciones *Notosolen* y *Piestium* (Stapf, 1917, 1919; Clayton & Renvoize, 1986). En *A. barretoi*, los entrenudos del raquis y los pedicelos son filiformes a subclavados, con ensanchamiento sólo en el ápice; en *A. exaratus* son cuneiformes; en *A. glaucophyllus* son subclavados a cuneiformes y en *A. gayanus* son clavados a subclavados.

Las Andropogoneae, poseen un raquis con nudos frágiles (Clayton, 1972b), los cuales, a su madurez, se desarticulan por debajo de la espiguilla sésil, liberando la espiguilla sésil, el artejo del raquis, el pedicelo y la espiguilla pedicelada (Clayton, 1969). A este conjunto de órganos Campbell (1983a), lo denominó: unidad de dispersión, diáspora o disemínulo, la cual constituye la principal fuente de variación en esta tribu (Clayton, 1987) y, como lo expresara Clayton (1972b), son caracteres que abren el camino a un desarrollo evolutivo mediante el cual la función de diseminación se transfiere de la espiguilla individual al entrenudo del raquis y sus dos espiguillas. La plasticidad de esta nueva unidad morfológica es la que le da a las Andropogoneas su sabor distintivo, relacionado con su evolución (Clayton, 1972b, 1987).

En las especies de la sección *Notosolen*, aquí estudiadas, artejos (entrenudos del raquis) y pedicelos de la unidad de dispersión, se presentan huecos, con pelos hialinos (0,5-3 mm), distribuyéndose en longitud creciente hacia la porción distal y en ambos márgenes. La presencia de pelos es una característica para facilitar la dispersión del diásporo por medio del viento (Campbell, 1983a). En estas entidades, la pilosidad es más densa en los pedicelos de las espiguillas pediceladas que en los entrenudos del raquis, extendiéndose casi horizontalmente cuando el ambiente está seco, quedando en condición de ser dispersado eólicamente. La densidad de la pilosidad y la longitud de la misma en relación con la longitud de la espiguilla sésil, es un carácter de importancia considerado por algunos autores (Trinius, 1832; Hervé & Valls, 1980; Zanin, 2001; Zanin

et al., 2011) para la delimitación de taxones a niveles más específicos. En todos los representantes sudamericanos de la sección *Notosolen* aquí analizados, inclusive *A. gayanus* de origen africano, se observó que la longitud de los pelos es menor que la longitud de la espiguilla sésil, característica a la que también hace referencia Zanin (2001), para un grupo de especies que viven en Brasil, *A. angustatus*, *A. bogotensis* (Hack.) A. Zanin, *A. campestris*, *A. crispifolius*, *A. durifolius*, *A. fastigiatus*, *A. gayanus*, *A. glaucophyllus*, *A. hypogynus*, *A. monocladius*, *A. palustris* y *A. pohlianus*. Por otro lado, y coincidiendo con Zanin (2001), he observado la existencia de entidades que presentan largos pelos hialinos, que superan 3-4 veces la longitud de la espiguilla sésil: *A. arenarius*, *A. selloanus*, *A. leucostachyus*, *A. macrothrix*, *A. bicornis*, *A. ternatus*, *A. lindmanii* Hack.

En la base del disemínulo, se encuentra el callo, considerada una estructura nodal, glabra o pilosa, de variadas características morfológicas según los diferentes taxones (Jackes-Félix, 1962; Clayton & Renvoize, 1986; Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987), cuya función también estaría relacionada con la dispersión del fruto. De las entidades aquí analizadas, se observó que *A. exaratus*, presenta callo glabro y corto (0,5 mm de diámetro). En cambio, la presencia de callo piloso se encontró en *A. barretoii* y *A. glaucophyllus*. En estas especies, el callo es corto (0,5 mm de diámetro), obtuso, oblicuo, con pelos hialinos, blanquecinos rígidos de 0,5 a 1,5 mm de longitud, habiendo mayor densidad de pelos cortos. En *A. gayanus*, el callo es densamente piloso, varía de 0,8-1 mm de diámetro, obtuso, oblicuo, rodeado de una corona de pelos hialinos, blanquecinos, rígidos, de 1-1,5 mm de longitud. Como lo define Clayton (1969), el callo, es un constituyente esencial de la diáspora en las Andropogoneae, que ha ido evolucionando debido a la modificación del artejo del raquis (Clayton, 1969). Cuando la diáspora se desarticula del raquis, puede observarse la presencia del callo; al separarse la espiguilla sésil y el pedicelo llevan consigo porciones de callo con pelos, dando a la espiguilla sésil y al pedicelo el aspecto de pilosos.

Otra característica que ayuda a la dispersión de la diáspora es la presencia de aristas. Estas generalmente se corresponden con el nervio medio de la lemma o de la gluma. Pueden ser cilíndricas o aplanadas, rectas o curvas, pueden ser lineares o presentar base retorcida, un genículo y una porción apical recta llamada súbula (Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987). *Andropogon barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gayanus* presentan la arista originada como prolongación del nervio medio de la lemma superior

de la espiguilla sésil, de 3-4-6 mm de longitud, cuya base es retorcida en espiral, de color castaño, geniculada, súbula hialina y rectilínea (*A. barretoii* y *A. glaucophylla*); de 4-5,5 mm de longitud, columna de color púrpura o vinácea, geniculada, luego rectilínea (*A. exaratus*). En *A. gayanus*, se observó la presencia de 2 aristas. Una de ellas se origina como continuación del nervio medio de la lemma superior de la espiguilla sésil, de 10-23 mm de longitud, con la base retorcida en espiral, de color castaño, geniculada, súbula hialina y linear; la otra arista se origina de la gluma inferior de la espiguilla pedicelada, es de 5,5-6 mm de longitud, de color castaño, rígida y rectilínea.

Sin duda, todas estas características del disemínulo o diáspora tienen la función de efectivizar su dispersión y anclaje en un ambiente adecuado. De acuerdo con Campbell (1983a), la presencia de pelos y su densidad estarían relacionados con la dispersión eólica; la distancia de dispersión, está en relación con la altura de liberación de la diáspora, la velocidad del viento y los movimientos del aire. El carácter hueco de entrenudo del raquis y pedicelos, disminuye el peso del disemínulo, facilitando también, su dispersión por el viento y por el agua, *A. glaucophyllus* habita áreas cercanas al mar, cerros ("morros") graníticos de Brasil y litoral marítimo; *A. exaratus* habita en áreas de pantanos herbáceos, arroyos y bañados.

La presencia de arista, es un carácter relacionado con la protección del órgano que lleva el fruto, que, en la mayoría de las entidades aquí estudiadas, sería la espiguilla sésil, actuando como un arma amenazante a los ojos de las aves predatoras. Sin embargo, dadas las características morfológicas de las aristas, también actúan como verdaderas herramientas para facilitar la dispersión y su anclaje, o adherencia ya sea a la piel de los animales, a la vestimenta del hombre o al suelo, asegurándose un destino apropiado para poder germinar. Las entidades aquí estudiadas, poseen aristas geniculadas y con base retorcida en espiral, las cuales son higroscópicas y esta particularidad les permite enrollarse y desenrollarse según las condiciones de humedad del ambiente, actuando como un resorte asegurándose así, su anclaje y penetración del grano al sustrato, de esta manera, también estaría protegiendo al fruto del fuego, ya que, a poca profundidad de la superficie del suelo, la temperatura es menor (Clayton, 1969), esperando que se den las condiciones apropiadas para la germinación. La presencia de 2 aristas en *A. gayanus*, quizá se deba a una adaptación a las condiciones del medioambiente en el cual habita. Se la puede encontrar dominando grandes áreas de las praderas de savanna del



sur de Sahara, caracterizada por una lluvia anual promedio de 381 mm a 500 mm y una larga estación seca de invierno de 3 a 8 meses (Bowden, 1964), por lo cual debe contar con características que le aseguren éxito en un entorno subárido. Ambas aristas tendrían la función de dispersión, defensa y anclaje. Siendo la arista de la espiguilla sésil, que es la que contiene el cariopse, la que dirige el movimiento del par de espiguillas. Esta posee la arista de mayor longitud, de base retorcida en espiral, geniculada, la cual, puede activar el mecanismo de enrollamiento y desenrollamiento, capaz de hacer que el par de espiguillas se mueva según los cambios de humedad del ambiente, y entre ambas aseguran la fijación del conjunto al sustrato en el cual se depositan, ya sea la piel de los animales o la superficie del suelo.

#### - Espiguillas

En la mayoría de las Andropogoneae, sobre el eje principal y sobre cada vástago lateral, se presenta un racimo de espiguillas, las cuales presentan un tipo de arreglo característico de la tribu. De cada nudo del raquis del racimo de espiguillas, emergen espiguillas heterógamas, dispuestas de a pares (Clayton, 1972b; Barkworth, 2003) y casi siempre se encuentran sobre un raquis frágil (Clayton, 1972b), pudiendo existir algunas excepciones, por ejemplo, en *Dimeria ornithopoda* Trinius, fue observada una única espiguilla solitaria, en *Trachypogon montufari* (Kunth) Nees e *Ischaemum minus* Presl. una única espiguilla reducida o rudimento, en *Polytrias* la presencia de triadas, en *Imperata brasiliensis* Trinius, si bien las espiguillas se disponen de a pares y hacia el extremo distal del eje principal se observan espiguillas solitarias (Vegetti, 1994, 1999).

En el género *Andropogon*, el par de espiguilla es heterógamos, compuesto por una espiguilla sésil y una espiguilla pedicelada. Cada espiguilla está constituida por dos antecios, los cuales pueden diferenciarse en su desarrollo o expresión sexual. La espiguilla sésil, posee un antecio inferior neutro (lemma estéril) y un antecio superior fértil, el cual contiene lemma, palea y la flor bisexual, la cual normalmente es monoclina, aunque, en algunas especies, sus anteras están reducidas a estaminodios y no son funcionales (*A. laterail*, *A. hypogynus*) (Norrman, 1999, 2009), carácter que fue considerado por Clayton & Renvoize (1986), de valor taxonómico. Las espiguillas sésiles, a menudo, exhiben características como presencia de arista y callo, los cuales están relacionados con la dispersión y el establecimiento del fruto (Peart, 1984).

La espiguilla pedicelada, posee un antecio inferior neutro (lemma estéril) y un antecio superior fértil, el cual contiene lemma, palea y la flor que generalmente es estaminada o masculina, reducida o eventualmente está ausente (neutra) (Barkworth, 2003). La presencia de dos antecios por espiguilla como máximo, es una característica de la subfamilia Panicoideae.

Si bien, en Andropogoneae, la espiguilla sésil, la espiguilla pedicelada y el entrenudo del raquis, se desprenden juntos a la madurez, constituyendo la unidad de dispersión o diáspora, existen géneros dentro de la tribu: *Eriochrysis*, *Saccharum* o *Imperata*, donde la espiguilla pedicelada se desarticula y cae aisladamente. Zanin (2001), observó este comportamiento en *Andropogon bicornis*, especialmente en las espiguillas estaminadas del ápice del racimo de espiguillas.

Las especies aquí estudiadas, presentan pares de espiguillas heterógamas, donde en *A. barretoii*, la espiguilla sésil es bisexual o perfecta, aristada, con callo piloso con pelos que no superar la mitad de la longitud de la espiguilla y la espiguilla pedicelada, apenas más larga que la espiguilla sésil, usualmente unisexual (estaminada) y a veces bisexual (hermafrodita); en *A. exaratus*, el par de espiguillas tienen la misma longitud, la espiguilla sésil es hermafrodita, aristada, glabra y la espiguilla pedicelada unisexual (estaminada) o bisexual (hermafrodita); *A. glaucophyllus*, presenta espiguilla sésil aristada, hermafrodita, con callo piloso, cuyos pelos cortos apenas superan la base de la espiguilla y la espiguilla pédicelada puede ser bisexual (hermafrodita), unisexual (masculina) o neutra; en *A. gayanus*, la espiguilla sésil es aristada, hermafrodita, con callo piloso cuyos pelos apenas superan la base de la espiguilla y la espiguilla pedicelada es unisexual (estaminada), aristada, apenas menor en longitud que la sésil.

El mecanismo de formación de espiguillas unisexuales en las Andropogoneae, fue estudiado por Le Roux & Kellog (1999), basándose en las características de 4 especies: *Bothriochloa bladhii* (Retz.) S. T. Blake, *Coelorachis aurita* (Steud.) A. Camus, *Heteropogon contortus* (L.) P. Beauv. ex Roem. & Schult. e *Hyparrhenia hirta* (L.) Stapf, comparando los resultados, con el proceso de formación de las flores unisexuales en el género *Panicum* L. (Paniceae: Panicoideae) y en los géneros *Tripsacum* L. y *Zea* L. (Andropogoneae). Estos autores demostraron que el mecanismo de formación de las espiguillas unisexuales es uniforme desde los inicios, aunque haya una gran variabilidad como resultado. Generalmente, la unisexualidad en las plantas, es causada por la



reducción o aborto de los primordios de órganos sexuales (Dellaporta & Calderón-Urrea, 1993). En todos los antecios se inicia la formación de los primordios de pistilo y estambres. Mientras que en aquellos antecios que resultaran masculinos, ocurre aborto del gineceo a partir de una capa de células subepidérmicas muertas, las cuales, se encuentran rodeando al primordio del gineceo; en los antecios que se desarrollan femeninos (pistilados), aunque, pareciera no existir células muertas en los estambres, el crecimiento cesa después de la formación de una antera rudimentaria (Le Roux & Kellogg, 1999).

En las plantas monoicas, el proceso de determinación del sexo está regulado por genes de determinación del sexo (Dellaporta & Calderón-Urrea, 1993). Según Le Roux & Kellogg (1999), habría similitud en el proceso de desarrollo y la formación de espiguillas unisexuales y un mecanismo genético común para la determinación del sexo en la tribu *Andropogoneae* y posiblemente en toda la subfamilia *Panicoideae*. Según estos autores, la ocurrencia de células muertas que provocan el aborto del gineceo puede ser la base de otro carácter morfológico que definiría la subfamilia *Panicoideae*.

En las entidades aquí estudiadas, la espiguilla sésil terminal, de cada racimo de espiguillas está asociada a dos espiguillas pediceladas, tal como lo interpretaran Clayton (1969), Maze (1977); Maze & Scagel (1982), Rosengurtt et al., (1982), para algunos géneros de *Andropogoneae*. Estos autores, consideran que el último entrenudo del raquis es, en realidad, el pedicelo de la espiguilla distal y que la espiguilla fértil es terminal y está asociada a dos espiguillas pediceladas (Vegetti, 1992). Sin embargo, Vegetti & Anton (1991), realizaron estudios anatómicos en la especie *Schyzachyrium microstachyum*, y llegaron a la conclusión de que uno es el entrenudo de raquis, con 6 haces vasculares y el otro es parte de un paracladio, con solo 3 hacecillos (pedicelo de la espiguilla pedicelada), rematando cada racimo de espiguilla en una espiguilla reducida, la cual se interpretaría como homóloga de la espiguilla sésil del par. En el último nudo del racimo de espiguillas no se habría desarrollado la espiguilla pedicelada y la espiguilla sésil sería estéril (Cámara Hernández & Gambino, 1990). Este tipo de arreglo también fue observado en especies sudamericanas del género *Andropogon* (sección *Leptopogon*) y en sus híbridos naturales (Nagahama et al., 2013); en miembros del complejo *A. ternarius* (sección *Leptopogon*) de Norte América (Florida) (Bridges & Orzell, 2018); en miembros de la sección *Notosolen* y en sus híbridos interespecíficos

estudiados en esta tesis, el diásporo terminal de cada racimo de espiguillas está compuesto por una espiguilla sésil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas; en especies del género *Schyzachyrium*: *S. microstachyum*, *S. tenerum*, *S. salzmännii*, *S. condensatum* (Peichoto et al., 2007; Peichoto et al., 2008, Peichoto, 2010).

#### - Glumas

En Andropogoneae, las glumas, generalmente son iguales en longitud o levemente subiguales, superando y manteniendo oculto al antecio (Clayton, 1987). Esta característica separa a las Andropogoneae de la tribu Paniceae, en la cual, la gluma inferior es usualmente más corta que el antecio y la flor superior posee lemmas de consistencia más gruesas y duras que las glumas (Barkworth, 2003).

En algunos representantes de la tribu, las glumas pueden presentarse membranosas, pero en la mayoría de los géneros pueden ser coriáceas, papiráceas o endurecidas (induratas). Según las distintas especies, su forma y morfología puede variar, siendo lanceolada, linear, oval o navicular; de superficie lisa, escabrosa o pilosa; tener ápice agudo, truncado u obtuso; ser mútica o con aristas más o menos desarrolladas. Su dorso puede ser redondeado, aplanado, aquillado o biaquillado; ser nervadas o enervias. Todas estas características son de importancia taxonómica, siendo la forma de la gluma inferior de la espiguilla sésil, la principal fuente de variación y de fundamental importancia en la taxonomía del género *Andropogon* (Clayton, 1964; Clayton & Renvoize, 1986). Teniendo en cuenta la forma, variación de la superficie, presencia o ausencia de nervaduras y sulco entre las carenas de la gluma inferior de la espiguilla sésil, Stapf (1917-19) reconoció las cuatro secciones para el género *Andropogon*: (*Eu*) *Andropogon*, *Leptopogon*, *Piestium* y *Notosolen*.

En el género *Andropogon* la gluma inferior de la espiguilla sésil es membranosa a coriácea, plano-sulcada a cóncava, biaquillada, con quillas laterales, nervios ausentes ó 6 entre las quillas, mútica (Norrman & Caponio, 2012). Las especies americanas presentan gluma inferior sulcada, cóncava (Norrman, 1999) a diferencia de las especies africanas que presentan una ligera convexidad (Clayton, 1972a; Clayton & Renvoize, 1982; Norrmann, 1999).

En las entidades aquí estudiadas, la gluma inferior y superior de la espiguilla sésil y de la pedicelada, son simétricas, presentándose de igual longitud entre ellas o bien, la

gluma inferior es apenas más larga que la superior, conteniendo en sus márgenes inflexos a los bordes de la gluma superior. La gluma inferior de la espiguilla sésil, en general es de consistencia cartácea, a excepción de *A. exaratus* que es coriácea. La forma es lanceolada, de ápice agudo, a excepción de *A. gayanus* cuyo ápice es obtuso a subobtusos y bidenticulado y en todas las entidades analizadas, los márgenes tienen asperezas antrorsas en el tercio superior.

En todos los casos aquí analizados, la espiguilla sésil presenta 1 arista que sobresale varios milímetros de la espiguilla. La arista se forma como prolongación del nervio medio de la lemma superior, siendo de base retorcida en espiral, geniculada, con súbula hialina y rectilínea, columna de color castaño en *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. gayanus*, y de color púrpura o vinácea en *A. exaratus*.

Existen algunas particularidades respecto a la gluma inferior de la espiguilla pedicelada. Mientras que en *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*, es de tonalidad amarillento pálida, mútica o apenas mucronada; en *A. gayanus* se presenta notablemente verde y fuertemente aristada. La presencia de arista en la gluma inferior de la espiguilla pedicelada, son caracteres taxonómicos importantes, que permiten distinguir a *A. gayanus* de las otras entidades. Si bien, el carácter espiguilla pedicelada aristada, es un carácter poco común, Zanin (2001), también observó este carácter en algunas especies de *Andropogon* de Brasil (*A. gayanus*, *A. angustatus*, *A. fastigiatus* y a veces en *A. pohlianus*, *A. carinatus* y *A. crispifolius*).

El número de nervios de la gluma inferior de la espiguilla pedicelada, varía de 3-5, 3-7, 7-(-9) en *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*, y más de 15-20 en *A. gayanus*. Observándose que, en las entidades con glumas de pocos nervios, estos están más marcados en la porción distal de la gluma y son tenues a tenuísimos en la porción media. Mientras que en *A. gayanus* (plurinervia), los nervios son fuertemente marcados en toda su longitud, de color verde, paralelos, equidistantes y bien visibles en el dorso de la gluma.

La espiguilla sésil de *A. barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gayanus*, mantienen una porción del callo del entrenudo del raquis, luego de que éste se desarticulara para dejar en libertad al diseminulo o diáspora. Generalmente, el callo es piloso, pudiendo, en algunos casos, ser un carácter útil, por ejemplo, para distinguir *A. exaratus* (callo glabro) de las otras entidades de la sección *Notosolen* del cono sur

de Sudamérica, *A. barretoii* (callo piloso con pelos cortos), *A. glaucophyllus* (callo piloso con corona de pelos cortos) y *A. gayanus* (densamente piloso con corona de pelos de diferentes longitudes). En los casos en que el callo es piloso, los pelos son blanquecinos, rígidos y con longitudes que no superan el tercio inferior de la espiguilla sécil.

#### - Lemmas

En general, la forma y textura de las lemmas, responde a lo expresado para las glumas. Presentan caracteres valiosos para la identificación de géneros o especies, pudiendo, también, estar reducidas o ausentes.

En la espiguilla sécil, la lemma superior es hialina, a excepción de *A. glaucophyllus* que se destaca por su tonalidad hialino-vinácea. En general, las dimensiones varían de 3-5 mm de longitud. Su forma es navicular, bilobada desde la mitad hacia la zona distal, con ápice variable: en *A. barretoii* se observan dos apéndices libres, hialinos; en *A. exaratus* los márgenes son membranáceos, hialinos, ondulados; en *A. glaucophyllus* y *A. gayanus* se observan cilias hialinas. El nervio central está bien marcado, y se proyecta en una arista subapical, la cual se abre camino entre ambos lóbulos. La longitud de la arista puede variar según las especies, en *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* la arista puede medir de 3 a 6-6,5 mm de longitud y en *A. gayanus* llega hasta 23 mm de longitud. En general la arista posee una columna de base retorcida en espiral, es geniculada y se continua con una súbula a veces hialina. En *A. exaratus*, la columna es de color púrpura en toda su longitud, en *A. barretoii* y *A. glaucophyllus*, de color castaño y se observa sólo en la porción espiralada, en cambio, en *A. gayanus*, la columna es castaña en toda su longitud. En todos los casos aquí analizados, la arista sobresale varios milímetros de la espiguilla, haciéndose notablemente visible, esta característica lleva a describir a la espiguilla sécil con la expresión de “espiguilla aristada”. La lemma inferior de la espiguilla sécil, en todas las entidades aquí estudiadas es hialina y sus dimensiones varían de 4-4,5; 5-5,5 mm x 0,5-1 mm. Si bien son muy semejantes, se observan pequeñas diferencias. En *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. gayanus* tiene forma lanceolada, con ápice agudo, entera, bicarenada, en cambio en *A. exaratus* su forma es oblonga, con ápice redondeado u obtuso. En vista ventral, en general, los márgenes son inflexos, tocándose en los bordes, poseen cilias hialinas desde la mitad de los bordes

hacia el ápice. En *A. exaratus*, los márgenes son membranáceos y ciliados como en *A. gayanus*; destacándose *A. glaucophyllus*, por la coloración vinácea de ambos márgenes.

En la espiguilla pedicelada, tanto la lemma inferior como la lemma superior, son hialinas, de forma lanceolada, con ápice agudo, a excepción de la lemma inferior de *A. gayanus*, en la cual el ápice es oblongo. En todas las entidades aquí estudiadas, ambas lemmas tienen márgenes inflexos, con bordes membranosos y ciliados desde la mitad hacia el ápice, que a veces se tocan en el tercio superior (lemma inferior y superior de *A. barretoi*; lemma inferior de *A. exaratus* y ambas lemmas de *A. gayanus*) o son márgenes inflexos muy estrechos, alejados entre sí (lemma superior de *A. exaratus*; ambas lemmas en *A. glaucophyllus*). El color vináceo se hace notable en los márgenes de ambas lemmas de *A. glaucophyllus* y en la base de la lemma inferior, en vista dorsal, de *A. barretoi*. Algunas de las lemmas presentan un nervio central notable: esto se puede observar en ambas lemmas de *A. barretoi*; y en la lemma inferior de *A. exaratus* y *A. gayanus*; otras son enervias: ambas en *A. glaucophyllus*.

#### - Palea

La pálea junto con la lemma constituye el antecio (Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987). Generalmente presenta dos nervios y dos carinas, pueden ser membranácea, hialinas, y en muchas *Paniceae*, hasta coriácea o cartilaginosa (Clifford, 1987).

En todas las entidades analizadas, se observó la presencia de palea asociada a la lemma superior, tanto en la espiguilla sésil como en la pedicelada, de consistencia hialina, a veces enervia. La morfología de la palea, generalmente es similar en ambas espiguillas, pudiendo existir algunas variaciones en las dimensiones, la forma del ápice y del borde superior, la presencia o ausencia de cili. En *A. barretoi*, la palea de la espiguilla sésil igual en longitud con la lemma, con márgenes ciliados. En la espiguilla pedicelada se observaron dos tipos morfológicos diferentes de palea, ambas hialinas, enervias: una de ellas con forma lanceolada de base truncada, de 3 mm x 1 mm, con ápice agudo, de márgenes ciliados y la otra con de forma truncada, de borde superior irregular, ciliado, de 1,8 mm x 1 mm, márgenes inflexos hasta la mitad. En *A. exaratus*, de 2,5 mm x 0,5 mm, con ápice obtuso, densamente ciliado; en *A. glaucophyllus*, de 1,5-2 mm x 0,5 mm, con borde superior truncado y ciliado y en *A. gayanus*, la palea de ambas espiguillas, son enteras, lanceoladas con base truncada. La palea de la espiguilla sésil

mide 4 mm x 1 mm, tiene ápice obtuso, con márgenes inflexos gruesos, con borde ciliado desde la mitad hacia el ápice; en la espiguilla pedicelada mide 3 mm x 1 mm, es entera lanceolada, de ápice agudo, con márgenes estrechos ciliados

#### - Lodículas

Se consideran homologas a las piezas del perianto (Arber, 1934; Nicora & Rúgolo de Agrassar, 1987), estando generalmente presentes, considerándose poco común su ausencia. El principal rol de las lodículas, es dar inicio a la antesis. Es el momento en el cual las lodículas comienzan a aumentar la turgencia de sus células y aumentan su volumen (Aber, 1934), ejerciendo presión contra la lemma, desplazándola de su posición original, hacia afuera, apartándola de la palea y produciendo la apertura del antecio.

Aunque son muy pequeñas, comúnmente menores de 1 mm, exhiben una variada morfología y anatomía (Jirásek & Josífová, 1968). Su número puede variar de 1 a 3 por flores. La mayoría de las lodículas, se encuentran insertadas y ubicadas entre la lemma y el pistilo, adoptando esta posición cuando son un par de lodículas o solamente una. Cuando se presentan en número de 3, como fue mencionado para la mayoría de las Bambusoideae y Arundinoideae (Clifford, 1987) o para algunas Stipeae (Nicora & Rúgolo de Agrassar, 1987), la tercer lodícula es muy reducida y se ubica entre la palea y el pistilo.

En las Andropogoneae, las lodículas se presentan de a pares (Pohl, 1980; Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987). En las entidades estudiadas, sus dimensiones varían de 0,8 mm x 0,3 mm en *A. gayanus*; 1,8 mm x 0,2-0,3 mm (*A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*).

#### - Androceo

Su número puede variar desde 1 estambre en *Bothriochloa decipiens* (Hack.) C.E. Hubb.; 15-21 estambres en flores masculinas de *Pariana*, un género centroamericano; hasta se registraron, aproximadamente 120 estambres en una flor de *Ochlandra travancoria* (Bambusoideae) (Arber, 1934; McClure, 1966).

Según Campbell (1982) la mayoría de las especies de *Andropogon*, presentan tres estambres tanto en la espiguilla sésil como en la pedicelada, pudiendo a veces, estar los 3 estambres reducidos a estaminodios (*A. lateralis*, *A. hypogynus*), (Norrman & Quarin, 1991; Norrmann, 1999; Norrmann & Caponio, 2012) entonces, constituyendo una flor funcionalmente femenina (Norrman, 1999).

En todas las entidades aquí analizadas, se observó la presencia de 3 estambres funcionales, tanto es espiguillas con flores monoclinas, como en las espiguillas con flores masculinas. Sus anteras son amarillas, con dehiscencia poricida apical, de 2,5-3 mm de longitud en las espiguillas sésiles y apenas más cortas en las pediceladas (2 mm).

#### - Gineceo

La mayoría de las especies de *Andropogon*, presentan ovario con 2 estilos con 2 estigmas, blancos o coloreados. El fruto es típico de las Poaceae, el cariopsis. Según Norrmann (1999), el carácter presencia de color en los estigmas aparenta ser dominante sobre estigmas no coloreados o estigmas blancos, sugiriendo también que este carácter estaría relacionado al horario de antesis de la especie. Los 4 taxones aquí estudiados tienen antesis matutina, floreciendo a la madrugada entre las 4:00 y 8:00 hs. La espiguilla hermafrodita o femenina, de *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* poseen ovario con estigmas plumosos blanquecinos, de 2-2,5 mm x 0.8-1 mm, pudiendo formar cariopsis, de forma ovada, color castaño, de 2 mm de longitud. En *A. gayanus*, se observó la presencia de ovario con 2 estigmas plumosos, de 2-2,5 mm de longitud, pudiendo haber plantas con estigmas blanquecinos, plantas con estigmas rosados y plantas con estigmas púrpura, formando cariopsis de 2-5-3 mm x 0,8-1 mm.

#### - Aspectos de la biología reproductiva

La biología reproductiva de un organismo es un factor que regula la recombinación por generación, a través de un control operativo de la fertilización (Grant, 1978). Las Poaceae, pueden propagarse normalmente por vía sexual y asexual en forma independiente o bien, pudiendo estar presente en una especie, ambos tipos de propagación. La propagación vegetativa en *Andropogon*, se lleva a cabo por división de matas o fragmentos de rizomas, en aquellas especies con rizomas, como *A. gerardii* Vitman, algunas con rizomas cortos (*A. durifolius* Renvoize, *A. hypogynus* Hack.) (Zanin, 2001) y otras con fuertes rizomas *A. crispifolius* Guala & Filg. (Zanin, 2001).

La reproducción sexual, trae consigo el intercambio genético, la fecundación, la formación de frutos y semillas. En América, las características reproductivas del género se basan en una estricta sexualidad, existiendo variaciones en los arreglos florales y en los sistemas de polinización, los cuales, incluyen cleistogamia en los taxones del complejo norteamericano *A. virginicus* (Campbell, 1982), autogamia (Campbell, 1982,

1983; Norrmann & Quarin, 1991), diferentes grados de alogamia (Norrmann & Quarin, 1991; Norrmann & Scarel, 2000), poliploidia impar permanente en *A. ternatus* de Sudamérica (Norrmann, 1985; Norrmann & Quarin, 1987; John, 1990).

#### **- Modo de reproducción**

Cada ovario es uniovulado, siendo a la madurez hemicampilótropo, rodeado por 2 tegumentos, donde el tegumento interno forma la micrópila, mientras que el tegumento externo no se desarrolla completamente. La Megasporogénesis comienza cuando, en el tejido nucelar, una célula subepidérmica, la arqueospora o célula madre de la megaspora (CMM), se diferencia por su forma y tamaño, además de poseer nucléolo muy teñido y rodeada de una gruesa capa de calosa y se vuelve funcional. Cuando se inicia la división meiótica, el óvulo comienza a crecer y se curva gradualmente hacia delante, adquiriendo la forma característica de un óvulo hemicampilótropo (Bocquet & Bersier, 1960).

La CMM, sufre tres divisiones meióticas, formando, sucesivamente, una díada de megásporas de volumen y características semejantes; una tétrade lineal de megásporas, donde tres de ellas se deterioran quedando sólo una megáspora funcional en posición calazal, la que dará origen al megagametofito femenino.

Finalizado el proceso meiótico, la megáspora funcional comienza su proceso de diferenciación y desarrollo aumentando su volumen, el citoplasma se vuelve denso con pequeñas vacuolas dispersas, el núcleo presenta un nucleolo notable diferenciándose fácilmente del resto de las células nucleares vecinas.

La megaspora funcional comienza a dividirse mitóticamente y comienza la primer vacualización, esto contribuye al alargamiento de la célula. Las vacuolas primarias se fusionan formando una gran vacuola central que se localiza entre los núcleos polares, separándolos. Este proceso, da lugar, a un saco embrionario binucleado, polarizado.

A partir de esta etapa, ya no hay pared de calosa en el saco embrionario (Anton, 1987).

Los núcleos formados vuelven a dividirse y después de este segundo ciclo cariocinético resulta un saco embrionario tetra-nucleado permaneciendo la vacuola central. En este estado, el saco embrionario muestra el comienzo de su forma final (Anton, 1987).

Un tercer ciclo cariocinético, nos deja ver, un saco embrionario donde 4 núcleos se ubican en el polo micropilar y otros 4 núcleos se ubican en el polo calazal, ambos grupos



separados por la gran vacuola central, la cual ocupa el mayor volumen de la estructura, extendiéndose desde la región micropilas hasta alcanzar las células antípodas en la región chalazal. En este estado, la citocinesis dió origen a 7 células, ya que la célula central aloja a los núcleos polares, voluminosos, bien diferenciados y muy notables.

El saco embrionario 8-nucleado queda constituido de la siguiente manera: en la región micropilar, el aparato oosférico está formado por la célula oósfera, de gran tamaño, con núcleo voluminoso y nucléolo alojado en un citoplasma denso y 2 sinérgidas flanqueando a la oósfera y apenas por encima de ella. En contacto con la pared celular del saco embrionario, se observa un engrosamiento de dicha pared que se extiende en una estructura en bandas que corresponde al aparato filar o filiforme, constituido por una masa de proyecciones de pared hacia el citoplasma (Cass et al., 1984).

De acuerdo con Cass & Jensen (1970), las sinérgidas suelen ser muy efímeras, pudiendo desorganizarse poco después de la fecundación o inmediatamente después de ella. Estas carecen de almidón antes de la fertilización, pero las que son receptivas, pueden contenerlo hasta después el ingreso del tubo polínico.

En el polo calazal del saco embrionario, se observan las antípodas, formando una masa de células uninucleadas semejantes entre sí, con núcleos pequeños.

En un estado más avanzado del desarrollo del saco embrionario, los dos núcleos polares migran hacia el centro de la célula media, donde permanecen juntos dentro de un citoplasma vacuolizado. De esta manera queda conformado un saco embrionario del tipo Normal o *Polygonum* (Anton & Cocucci, 1984; Anton, 1987; Hidalgo et al., 2007). Este modelo de megasporogénesis y el posterior desarrollo del saco embrionario indican que estas entidades poseen un sistema de reproducción sexual.

De acuerdo con Connor (1979), las *Andropogoneae*, presentan una gran variación en su estructura floral, pudiendo existir hermafroditismo, monoicismo, andromonoicismo, ginomonoicismo.

Las inflorescencias del género *Andropogon*, están constituidas por racimos espiciformes apareados o en grupos subdigitados en el extremo de un pedúnculo. El raquis es frágil y articulado, llevando en cada artejo una espiguilla sésil y una espiguilla pedicelada (Norrman & Quarin, 1991). Si bien en los taxones americanos, cada espiguilla es originalmente biflora (Norrman & Scarell, 2000), como máximo de

desarrolla solo una flor por espiguilla. El antecio superior de la espiguilla sésil, lleva una flor monoclina y es fructífera, siendo el antecio inferior neutro; por otro lado, en las espiguillas pediceladas, es usual que el antecio superior se presente estaminado, masculino o hermafrodita y el inferior neutro (Norrman & Quarin, 1991; Norrmann & Scarell, 2000). En estas combinaciones, puede ocurrir que ambas tengan diferente expresión sexual, en ese caso el par es heterógamos; mientras que, si el par de espiguillas posee la misma expresión sexual, es homógamos (Rosengurtt et al., 1970, Hervé & Valls, 1980, Norrmann, 1999). Esta última forma de expresión de la sexualidad, es más frecuentes en los géneros *Saccharum*, *Imperata* y *Hemarthria* (Rosengurtt et al. 1970), mientras que en *Bothriochloa*, *Sorghum*, algunas especies de *Schizachyrium* y *Andropogon*, entre otras, las espiguillas son heterógamas.

De acuerdo con esta disposición floral, en los taxones aquí estudiados, hemos observado que los pares de espiguillas pueden presentarse heterógamos o eventualmente homógamos.

En *A. exaratus*, cuando el par de espiguillas es heterógamo, la espiguilla sésil desarrolla una flor monoclina y la pedicelada una flor estaminada. En ambas espiguillas, las anteras son funcionales e iguales o subiguales en longitud. Excepcionalmente la espiguilla pedicelada de *A. exaratus* desarrolla flor monoclina, cuando esta forma se presenta, el par de espiguilla es homógamo.

Norrman & Quarin (1991), estudiando la biología reproductiva de *A. exaratus*, observaron que ésta se comporta como andromonoica. De acuerdo con Connor (1979, 1981), existe andromonoicismo, cuando las flores hermafroditas y las flores masculinas se encuentran en una misma planta, ya sea en la misma o en diferentes espiguillas. Comúnmente, en Andropogoneae, los dos sexos se presentan en diferentes espiguillas de pares heterógamos (Clayton, 1969). En este caso la espiguilla sésil con una flor hermafrodita y una flor neutra, y la espiguilla pedicelada con una flor estaminada y una flor neutra (Connor, 1979).

Cuando *A. barretoi* y *A. glaucophyllus*, presentan pares de espiguillas heterógamos, la espiguilla sésil desarrolla una flor monoclina y la espiguilla pedicelada una flor estaminada. En ambas espiguillas, las anteras son funcionales e iguales o subiguales en longitud. Eventualmente, la espiguilla sésil y la pedicelada podrían desarrollar flores monoclinas, manteniendo así, la espiguilla pedicelada, la función femenina, lo que hace

que el par sea homógamo  $s(h) + p(h)$ , pero a menudo hay una pérdida de la función femenina en la espiguilla pediceleada que produce el arreglo andromonoico  $s(h) + p(m)$ . De acuerdo con esta disposición floral, estas entidades, también se comportan como andromonoicas o como hermafroditas, pudiendo presentarse en un mismo racimo espiguillas pediceladas monoclinas o estrictamente masculinas (Norrman & Scarell, 2000).

Norrman & Quarin (1991), basados en el modelo de disposición de las flores en las espiguillas sugerido por Connor (1981), propusieron para *A. exaratus* la fórmula floral:  $[s(h) + p(m)]^*$ ; y para *A. glaucophyllus* y *A. barretoii*:  $s(h) + p(h)$  ó  $s(h) + p(m)$  (Norrman & Scarell, 2000).

En *A. gayanus*, se presentan pares de espiguillas donde la espiguilla sésil desarrolla una flor monoclina y la espiguilla pedicelada una flor estaminada. En ambas espiguillas, las anteras son funcionales e iguales o subiguales en longitud.

**Referencia:** \*S=esp. sésil, P=esp. pedicelada, h=hermafrodita, m=masculina, +=símbolo que agrupa ambos arreglos en una misma planta.

#### - Polinización

En *A. exaratus*, *A. barretoii*, *A. glaucophyllus*, la floración es estival, la antesis es matutina, ocurre entre las 4:00 y las 8:00 hs de la mañana. En general, las espiguillas sésiles florecen 24-48 hs antes que sus correspondientes espiguillas pediceladas del par, existiendo una separación temporal en la antesis dentro de cada par (Norrman & Quarin, 1991).

La antesis de las espiguillas pistiladas, se inicia cuando las células de las lodículas comienzan a ganar turgencia aumentando su volumen. Esto genera una presión contra la lemma, la cual se aparta de la palea, desplazándose de su posición original e inmediatamente los estigmas protruyen, expandiéndose hacia arriba. Minutos después, se produce la excreción de los estambres que ocurre por elongación de los filamentos. La deshidratación provoca la dehiscencia de las anteras, y el polen es liberado.

Norrman et al. (1991, 2000), mediante experiencias de autopolinización y posterior análisis de fluorescencia en estos taxones, observaron que, si bien los granos de polen germinaron y penetraron al estigma, sin embargo, antes de llegar al canal estilar, la

elongación de los tubos polínicos se detiene, mostrando una típica reacción de incompatibilidad en sus ápices.

Sin embargo, cuando se polinizaron manualmente los estigmas de las flores con granos de polen de otros genotipos, se observó que los tubos polínicos penetraron a la micrópila en menos de dos horas y no mostraron reacción de incompatibilidad. Como consecuencia la producción de frutos fue de 65,9 %, en cambio después de la autopolinización la producción de frutos fue menor al 1 %.

*Andropogon gayanus*, florece en los meses de abril a junio, pudiendo prolongarse la floración y pudiendo, también, florecer todo el año (Zanin, 2001). La reproducción es sexual, la antesis es matutina y ocurre entre las 06: 00 y las 14:00 hs. (Foster, 1962).

Cada par de racimo tarda aproximadamente 5 días en completar la floración. El primer día de floración comienza con la apertura de las espiguillas sésiles en el ápice de los racimos. La apertura de las espiguillas sésiles es basípeta, es decir, comienza en la porción distal del racimo y avanza hacia la base, cada día durante el periodo de floración. Las espiguillas sésiles que se encuentran en la base del racimo se abren al tercer día. Ese día, se abren también las espiguillas pediceladas en la porción distal de los racimos, las cuales continúan con la misma secuencia, abriéndose a lo largo del racimo, hasta que la floración se completa con la apertura de las espiguillas pediceladas de la base, lo que ocurre al quinto día.

Foster (1962), demostró la presencia de un sistema de alogamia en un citotipo tetraploide de *A. gayanus*. Dado el tipo de arreglo floral que poseen las espiguillas, donde la espiguilla sésil desarrolla una flor monoclina y la espiguilla pedicelada una flor estaminada, es de suponer una autofecundación exitosa. Si bien logró producir semillas provenientes de autopolinización, embolsando las inflorescencias para evitar la entrada de polen foráneo, al sembrarlas, observó que la progenie presentaba una fuerte disminución de vigor, comparada con la progenie proveniente de semillas obtenidas vía polinización abierta, sugiriendo la existencia de algún sistema de autoincompatibilidad.

Estos resultados sugieren que, aunque estas entidades, poseen arreglos florales que denotan un “exceso de masculinidad”, manifestándose a través de la presencia de flores monoclinas y estaminadas, comparten un sistema de autoincompatibilidad con determinación génica, el cual reduce drásticamente la tasa de autofecundación

definiendo así, un sistema de reproducción alógamo por autoincompatibilidad, lo que garantiza la polinización cruzada obligatoria.

De acuerdo con Connor (1981), la alogamia por autoincompatibilidad relacionada a la presencia de espiguillas hermafroditas, es una combinación considerada primitiva. Esta condición, está presente en los taxones hexaploides del cono sur de Sudamérica pertenecientes a la sección *Notosolen*.

## Tratamiento taxonómico

*Andropogon barretoii* Norrmann & Quarin

*Andropogon glaucophyllus* Roseng., B.R. Arrill. et Izag. simile sed spiculis sessilibus minoribus (3,5-) 4,5 (-6) mm longis, foliorum laminis viridibus, racemis numerosis (6-15), articulis filiformibus et gluma subconcaua differt. Tipo: BRASIL. Río Grande Do Sul: RS 509, 60 km E de Santa María, Norrman, Keeler & Barreto 146, III-1994. Holotipo (ICN), Isotipos (BAA, CORD, CTES, K, MBM, SI, SP, US).

Hierba perenne, cespitosa, de matas densas, cañas erectas, robustas, de hasta 150 cm de longitud. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde. Varas florales erectas, de 150-300 cm de altura, con nudos glabros. En cada nudo con 2-3 ramificaciones simples que terminan en un grupo de racimos, 1-3 subramosos. Vaina de superficie glabra, abierta, con nervio medio engrosado. Lígula, membranácea-papirácea, de 2-3 mm de longitud, truncada, aurícula como proyección de la vaina, de 2-3-3,5 mm x 2 mm sobrepasando la membrana de la lígula, ápice agudo, en dirección más o menos paralela al eje foliar, pelos hialinos de 2 mm de longitud. Lámina plana, glabra, estriada, márgenes escabros, nervadura central engrosada, blanquecina; base de la lámina reducida en la base casi a la nervadura central (aspecto pseudopecioloado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con 5-7 racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola de 10-18 cm de longitud, lanceolada, de ápice agudo, estrecha. Pedúnculo delgado, exerto. **Racimos** erguidos gráciles, de 5-13 cm de longitud, con 12-28 pares de espiguillas, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sécil. El diásporo terminal del racimo de espiguillas está compuesto por una espiguilla sécil hermafrodita y dos espiguillas pedicelada masculinas, el diásporo medio compuesto por 1 espiguilla sécil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos filiformes a subclavados, de 3,5-4 mm de longitud, levemente dilatados en el ápice (0,5 mm) menos dilatado en la base (0,3 mm), ápice cóncavo oblicuo, coriáceos, con una hilera de escasas ciliás hialinas cortas de 0,5-1 mm de longitud en ambas márgenes, más cortas que la espiguilla sécil. Callo oblicuo de 0,3-0,5 mm de longitud, con pelos rígidos hialinos de 0,5-1 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis. Espiguilla sécil hermafrodita de 4-5,5-6 mm de longitud, incluido el callo, linear, lanceolada; gluma inferior de 4-5,5-6 mm x 0,5-0,6 mm, cartácea, lanceolada, de ápice

agudo con asperezas antrorsas en el tercio superior, glabra, callo con pelos hialinos rígidos, cortos (0,5 mm), dorso plano levemente deprimido a lo largo del nervio central, márgenes inflexos, bicarenada, apenas sulcada y 2 nervios conspicuos entre las carenas; gluma superior aquillada, de 4-4,5 mm de longitud, lanceolada, navicular, aguda en el ápice, con nervio central marcado dándole convexidad, asperezas antrorsas en el tercio superior. Lemma inferior 4-4,5 mm x 0,5 mm, hialina, lanceolada, aguda en el ápice, entera, con ciliias hialinas desde la mitad hacia el ápice en los márgenes, bicarenada; lemma superior hialina, de 3-4 mm de longitud, lanceolada, navicular, ápice agudo, bidentado con ciliias hialinas en el tercio superior de los márgenes, bilobada, nervio central que se continúa en una arista de 3-4-5-6 mm de longitud, columna castaña linear y retorcida los primeros 3 mm, luego geniculada y prolongación hialina; palea hialina de 4 mm de longitud, ciliada en las márgenes. Estambres 3 con anteras de 2-2,5-3 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida. Dos estigmas plumosos de 2-2,5 mm de longitud, blanquecinos. Cariopse, castaño, oblongo, de 1,5 mm de longitud. Espiguilla pedicelada masculina, pedicelo de 2,8-3 mm de longitud, filiforme, coriáceo, con el ápice apenas dilatado (0,5 mm de ancho), más angosto en la base (0,3 mm), ligeramente curvado en la base, ápice cóncavo, con una hilera de pelos hialinos en ambas márgenes de 0,5 mm de longitud en la base, de 1-1,5 mm de longitud en la región media y 1,5-2 mm de longitud hacia el ápice. Callo oblicuo piloso con corona de 0,3-0,5 mm de diámetro con pelos hialinos de 0,5 mm de longitud; gluma inferior lanceolada, aguda en el ápice con asperezas antrorsas en ambas márgenes, mítica, de 5,5-6 mm x 0,5 mm, cara dorsal plana, unicarenada, tenuemente 2-nervada; gluma superior membranacea, lanceolada, aguda en el ápice, convexa, con un nervio central, bicarenada; lemma inferior y superior hialinas, lanceoladas, con ápice agudo y márgenes membranaceos ciliados desde la mitad hacia el ápice. Lemma inferior de 4 mm x 0,5 mm, lemma superior ligeramente de menor tamaño. Palea hialina, de 4 mm de longitud ciliada en las márgenes. Estambres 3 con anteras de 2-2,5 mm de longitud. Lodículas membranaceas, amarillentas de 1,8 mm x 0,2-0,3 mm.

***Exsiccata.* BRASIL. Estado de Río Grande do Sul:** 55 km E de Santa María, RS 509, abundante en los bordes del camino, *Norrmann & Barreto* 145, I-1994 (CTES); Candelaria, Boticaí, RS 240, *Norrmann & Barreto* 310, III-1994, cultivada en FCA-UNNE, Corrientes a partir de semillas (CTES); Depresión Central, cultivado en la Facultad de

Santa María, *Norrmann, Quarin & Barreto* 39, IV-1982 (CTES); Taquarí, RS 509 y desvío a la ciudad, al costado del camino, *Norrmann, Keeler, Bock & Barreto* 312, IV-1997 (CTES).

**Distribución geográfica y ecología:** *Andropogon barretoi* habita determinados tipos de suelos de la Depresión Central de Río Grande Do Sul, desde el E de Santa María hasta Taquarí. Ha sido coleccionada cerca de los ríos Yacuí, Pardo y Taquarí, donde si bien los lugares de ocurrencia son escasos forma densas poblaciones (Figura 5).

**Citología y biología reproductiva:** hexaploide ( $2n=6x=60$ ), observándose hasta 2 cromosomas accesorios (Norrmann & Quarin, 2001); en meiosis forma 30 II a menudo con 4-6 I. De reproducción sexual, alógama por autoincompatibilidad polen-pistilo (Norrmann, 1999). De floración matutina, la antesis se produce al amanecer (Norrmann, 1999).



*Andropogon exaratus* E. Hackel

*Andropogon exaratus* Hack., Flora 68: 135. 1885. TIPO. Paraguay: «*in planitie pr. Pirayubi*», B. Balansa 224.

*Andropogon exaratus* Hack. var. *major* Ekman, Ark. Bot. 11(4): 7. 1911. Argentina. Misiones. Loreto, loco graminoso, subhumido, prope stationem pontonis flum. Yabebiri, E. L. Ekman 555. Paraguay. Prope Villa Rica, E. Hassler 8694a.

*Andropogon exaratus* Hack. var. *minor* Ekman, Ark. Bot. 11(4): 7. 1911. Argentina. Misiones. Posadas, Loreto, in ripa subhumida flum. Yabebiri, 31 Ene 1908, E. L. Ekman 556. Brasil. Rio Grande do Sul. Pôrto Alegre, Morro da Policia, loco sicco, saxoso, G. Malme 1523. Paraguay. Prope Villa Rica, E. Hassler 8694β. Paraguay. Prope Tacangua, E. Hassler 1827.

Perenne, cespitosa, forma matas robustas, cañas de 150-300 cm de altura. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde. Vaina glabérrima. Lígula breve, membranácea-papirácea, truncada, de 2-2,5 mm de longitud, bordes sinuosos, 2 aurículas breves como continuación de la vaina, de 2 mm x 9 mm, ápice agudo, en dirección más o menos paralela al eje foliar, con escasos pelos hialinos de 1,5-2 mm de longitud a ambos lados de la base. Lámina sublanceolada, linear, estriada, de 30 cm x 0,8 cm, con base reducida casi a la nervadura central (aspecto pseudopetiolada) luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada, nervio medio prominente blanquecino, márgenes escabros con escasos pelos caducos en los laterales de la lígula. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con 2-4 racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, estrecha, de 8-12 cm de longitud, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado. **Racimos** de espiguillas erguidos, gráciles, agrupados de 2-4, de 4-10 cm de longitud, desiguales, con hasta 18-20 pares de espiguillas, notablemente excertos, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sécil. El diásporo terminal de cada racimo de espiguillas compuesto por una espiguilla sécilhermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas, el diásporo medio compuesto por 1 espiguilla sécil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos del raquis cuneiforme, de 3 mm x 1 mm, más angosto en la base (0,50 mm), coriáceo, dorsalmente plano, ápice cóncavo marcadamente oblicuo, bidentado, con una hilera de cillas hialinas de 0,5-1,5 mm de longitud en ambas márgenes acrecentado la longitud hacia el ápice. Callo de 0,3 mm, glabro. **Espiguillas** subadpresas al raquis. Espiguilla sécil

hermafrodita, aristada, de 4,5-5,5-6 mm de longitud incluido el callo, lanceolada, linear; gluma inferior de 5,5-6 mm x 1 mm, coriácea, lanceolada, aguda en el ápice, márgenes inflexos, dorso plano soldado, bicarenado, 2 nervios intracarinales manifiestos y 2 tenuísimos, callo glabro; gluma superior, ovado-lanceolada, navicular, aguda, lateralmente comprimida, aquillada, de 4 mm de longitud, con nervio central marcado dándole convexidad, cartácea, con asperezas antrorsas sobre la carina desde la mitad hacia el ápice. Lemma inferior de 5,5 mm x 1 mm, hialina, oblonga, obtusa, con márgenes membranáceos ciliados, lemma superior hialina, de 4-5 mm de longitud, ovada lanceolada, bilobada, con márgenes ciliados hialinos en el tercio superior del ápice, arista linear de 5,5 mm x 0,5 mm, columna de color púrpura en toda su longitud; palea hialina, obtusa, de 2,5 mm x 0,5 mm, con ciliadas en el margen superior. Estambres 3 con anteras de 2-2,5-3 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida. Ovario con 2 estigmas plumosos de 2-2,5 mm de longitud, blanquecinos-amarillentos. Cariopse, castaño, oblongo, de 1,5 mm de longitud. Espiguilla pedicelada, masculina o hermafrodita, pedicelos cuneiformes, de 3 mm x 0,5 mm, más angosto en la base (0,2 mm), coriáceo, dorsalmente plano, ápice cóncavo marcadamente oblicuo, bidentado, con una hilera de ciliadas hialinas de 0,5-1,5 mm de longitud en ambos márgenes acrecentado la longitud hacia el ápice; callo de 0,3 mm, glabro; gluma inferior cartácea, de 5 mm x 0,5 mm lanceolada, linear, aguda en el ápice, glabra, dorsalmente plana, nervio central manifiesto, bicarenada, con asperezas antrorsas en los márgenes, 3-7 nervada; gluma superior cartácea, de 4,5 mm x 1 mm, oblonga, lanceolada, linear, aguda en el ápice, 1-3 nervia, aquillada, convexa, glabra; lemma inferior y superior hialinas, lanceoladas, agudas en el ápice, de 4 mm x 0,5 mm. Lemma inferior con márgenes inflexos, ciliados en los márgenes desde la mitad hacia el ápice, subnervia; palea hialina, obtusa, de 2,5 mm x 0,5 mm, con ciliadas en el margen superior. Estambres 3, anteras 3 de 2 mm de longitud, funcionales. Lodículas membranáceas, de 1,7-1,8 mm x 0,2-0,3 mm.

***Exsiccata.* ARGENTINA. Corrientes. Dep. Ituzaingó:** 11 km N de San Carlos, *Norrmann 305*, cultivado en la FCA-UNNE, Corrientes (CTES, SI); ídem, *Krapovickas et al. 24963*, 11-IV-1994 (CTES); Rincón del Ombú, Ea. Los Pinares, *Carnevalli 5686*, 22-I-1982 (CTES); Villa Olivari, 24 km E de Ituzaingó, cultivado en la FCA-UNNE, Corrientes, *Norrmann 101*,

2n=60, II-1984 (CTES); ídem 2n=60+2B, *Norrman 102*, cultivado en la FCA-UNNE, Corrientes (CTES); Ea. Rincón chico, 17 km NW de San Carlos, *Tressens et al. 3139*, 15-III-1985 (CTES); Desembocadura Arroyo Garapé en el Río Paraná, 45 km E de Ituzaingó, *Norrman 38*, 29-III-1982, cultivada en al FCA-UNNE, Corrientes (CTES, BAA); Ea. Santa Rita, en arroyo, *Krapovickas et al. 41144*, 4-III- 1987 (CTES). **Misiones.** *Dep. Candelaria:* Loreto, *Montes 11230*, 17-II-1951 (CTES). *Dep. Capital:* Posadas, *Spegazzini 18762*, 15-I-1907 (SI); ruta 12, 12 km W de Posadas, cultivado en al FCA-UNNE, Corrientes, *Norrman 107*, 17-II-1991 (CTES). *Dep. General San Martín:* Jardín de América, *Martinez Crovetto G 108*, 1965 (CTES). *Dep. San Ignacio:* Puente Nación, arroyo Yabebirí, *Meyer, T 11449*, 25-I-1947 (LIL); Santa Inés, *Meyer, T 11354*, 22-II-1947; Bañados del Yabebirí, ruta 12, 5 km SW de San Ignacio, *Norrman 106*, cultivado en la FCA-UNNE, Corrientes, 19-II-1991 (CTES).

**PARAGUAY.** *Dep. Alto Paraná:* Itaquyry, in regione fluminis alto Parana, *Fiebrig 6115*, III-1910 (BAA, LIL); in regione fluminis alto Parana, *Fiebrig 6495*, 1999-10 (SI); Airá (estero campestre), *Rojas 5255*, I-28 (BAA). *Dep. Caaguazú:* Ea. Plate, San José, *Rosengurtt 5878*, 2-III-1950 (BAA). *Dep. Cordillera:* Cordillera de Altos, Co. Tobatí, en pantanos, *Schinini 23975*, 6-III-1984 (CTES). *Dep. Guairá:* Azucarera Tebicuary, *Pavetti & Rojas 11078*, II-1944 (BAA). *Dep. Misiones:* Ea. La Soledad, Santiago, *Pedersen 3207*, 31-I-1955 (SI). *Dep. San Pedro:* Alto Paraguay, *Woolston 592*, 6-II-1955 (SI).

**Distribución geográfica y ecología:** *Andropogon exaratus* habita zonas bajas y anegadizas de Paraguay y nordeste de la Argentina (Figura 5).

**Citología y biología reproductiva:** hexaploide (2n=6x=60), observándose hasta 2 cromosomas accesorios (Norrman, 1985); en meiosis forma 30 II observándose, además, células con 1-2 I. Reproducción sexual, posee saco embrionario tipo *Polygonum* var. *Poaceae* (Anton, 1986). Arreglo floral de Andromonoisismo, comportándose como alógama por autoesterilidad, debido a la presencia de un sistema de autoincompatibilidad polen-pistilo controlado enéticamente, el cual obliga a la polinización cruzada con otros genotipos (Norrman & Quarin, 1991). De floración estival, anthesis matutina ocurre entre las 4:00 y las 8:00 hs.

*Andropogon glaucophyllus* Roseng., B. R. Arrill. e Izag.

*Andropogon glaucophyllus* Rosengurttt, Arrillaga e Izaguirre, Gram. Uruguayas 165. 1970. Tipo: "Uruguay. Montevideo, Cult. in Hort. Bot. Facultad de Agronomía, orig. "R.O.U., Dpto. Rocha, Arroyo de los Indios, Rosengurttt, 10 de Abril 1966." Isotipos en SI, BAA y US (2887391).

Hierba perenne, cespitosa, cañas erectas de 1,20-2,10 m de altura, follaje pruinoso cerúleo, rojizo a la senectud. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Cañas floríferas cilíndricas, de 1-2 m de altura, 6-12 nudos glabros. Cada nudo con 2-3 inflorescencias simples y 1-3 subramosos. Láminas glabras, con escasos pelos caducos en los márgenes de la lígula. Vaina glabra con el nervio medio engrosado. Lígula de 1,5-3 mm de longitud, glabra, truncada. Lámina plana, de 17-40 cm x 0,3 x 0,7 cm, de superficie glabra, estriada, glauca en ambas caras, con márgenes escabrosos en dirección al ápice, ápice acuminado; base de la lámina reducida en la base casi a la nervadura central (aspecto pseudopetiolada), luego ensanchándose hacia el ápice acuminado. **Inflorescencia** laxa, alargada, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con 2-3 (-5) racimos espiciformes, digitados o subdigitados, glabrescentes. Espateola de 10-18 cm de longitud, lanceolada, de ápice agudo, estrecha, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado.

**Racimos** de espiguillas erguidos, gráciles, de 7-12 cm de longitud, con 12-25 pares de espiguillas, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sésil. El diásporo terminal del racimo de espiguillas compuesto por una espiguilla sésil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas, el diásporo medio compuesto por 1 espiguilla sésil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos filiformes a subclavados, coriáceos, de 4.5-4 (-5) mm de longitud, levemente dilatados en el ápice (0,5 mm de ancho), ápice cóncavo oblicuo, de borde simple, con una hilera de abundantes cilias hialinas en ambas márgenes, de 1 mm de longitud en la región inferior y de 3-4 mm de longitud desde la mitad hacia el ápice. Callo oblicuo, de 0,3-0,5 mm de ancho, con cilias rígidas, hialinas de 0,5-1 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis, espiguilla sésil hermafrodita, aristada, de 5-5,5 mm de longitud incluido el callo, lanceolada, lateralmente comprimida; gluma inferior de 5,5-5 mm x 1 mm, cartácea, lanceolada, ápice acuminado con asperezas antrorsas en el tercio superior, glabra, entera, bicarenada, márgenes inflexos, dorso plano sulcado, 2-4 nervada entre carenas, callo

piloso, oblicuo, con ciliás rígidas, hialinas de 0,5-1 mm de longitud; gluma superior aquillada, de 5 x 0,8 mm, aguda en el ápice, lanceolada, navicular, con nervio central marcado con asperezas antrorsas en el tercio superior, lateralmente comprimida. Lemma inferior 5 mm x 0,8 mm, lanceolada, aguda en el ápice, entera, hialina con márgenes inflexos hialino-vináceos, con ciliás hialinas en el tercio superior, bicarenada; lemma superior aristada, navicular, hialino-vinácea de 5 x 0,5 mm, ciliada en la mitad superior de los márgenes, entera, mútica o bidentada, 3-nervada, bilobada, aristulada, nervio central que se continúa en una arista de 4-5,5-6 mm de longitud, columna castaña linear y retorcida los primeros 3 mm, luego geniculada y prolongación hialina; palea hialina, enervea de 2 mm de longitud, ciliada en el margen superior. Estigmas plumosos (2) 2-2,5 mm de longitud, blanquecinos. Cariopse, castaño, oblongo de 1,5 mm de longitud. Espiguilla pedicelada neutra o masculina, de 6-6,5 mm de longitud, lanceolada, acuminada, mucronada, cartácea; pedicelo de 3,5-4 mm x 0,8-0,9-1 mm, filiforme, coriáceo, con el ápice apenas dilatado (0,5 mm de ancho), más angosto en la base (0,3 mm), linear, con una hilera de pelos hialinos en ambas márgenes de 0,5 mm de longitud en la base, de 1,5-2-3 mm de longitud hacia el ápice. Callo oblicuo piloso con corona de 0,3 mm de diámetro con pelos hialinos rígidos de 0,5 mm de longitud, ápice cóncavo, oblicuo, ligeramente dentado; gluma inferior lanceolada, mucronada, de 6-6,5 x 1 mm, aguda en el ápice con asperezas antrorsas en el tercio superior de ambas márgenes inflexas; gluma superior membranácea, lanceolada, aguda, de 5 x 1 mm, cartácea, aquillada, ciliada en los márgenes. Lemma inferior y superior hialinas con márgenes inflexos hialino-vináceos, lanceoladas, enteras, agudas con márgenes ciliados en el tercio superior; lemma inferior de 4,5 mm de longitud y lemma superior mútica, de 5 mm de longitud. Palea hialina, enervea, de 1,5 mm de longitud ciliada en el margen superior. Lodículas membranáceas, de 1,5-1,8 mm x 0,2-0,3 mm.

**Exsiccata. BRASIL. Estado de Río Grande do Sul:** Río Grande, 6 km ao norte de Bovo Novo na rodovia Pelotas-Río Grande, *Valls et al.* 9976, 10-V-86 (CTES); Pelotas, Laranjal, *Sacco* 528, 7-III- 1956 (BAA); Porto Alegre, Morro da Policia, local seco y pedregoso, muito frecuente, *Valls & Arzivenco* 1503, 23-IV-1971 (CTES, SI); Morro da Policia, cultivado en Est. Exp. Guaiba (*Valls* 4810), obtenido por multiplicación vegetativa y cultivado en FCA-UNNE, Corrientes, *Norrmann* 103 (CTES, SI). **Estado de Santa Catarina:**

Laguna, Valls et al. 7374, 22-V-83 (CTES); Laguna, Farol de Santa Marta, Norrmann 315, I-1997 (CTES).

**URUGUAY. Dep. Rocha: sin datos, León 277; Fortaleza de Sta. Teresa, Lombardo 2652, III-1938.**

**Distribución geográfica y ecología:** *Andropogon glaucophyllus* habita cerros graníticos cercanos al mar y planicies cuaternarias atlánticas del sur de Brasil y Uruguay, prefiriendo suelos de buen drenaje. En Brasil se distribuye en el litoral de los estados de Río Grande do Sul y Santa Catarina, en suelos arenosos de las planicies próximas al mar. Norrmann (1999) la describe habitando un cerro granítico, Morro da Policia, cercano a la ciudad de Porto Alegre y formando pequeñas y densas poblaciones en áreas arenosas y pedregosas relativamente húmedas en la ciudad Laguna, Farol de Santa Marta. Para Uruguay, Rosengurtt et al. (1970), la describe formando escasas poblaciones en arenas marítimas húmedas (Figura 5).

**Citología y biología reproductiva:** hexaploide ( $2n=6x=60$ ), formando 3 II en meiosis (Norrmann & Scarel, 2000). Reproducción sexual, posee saco embrionario tipo *Polygonum* var. *Poaceae* (sensu Anton, 1986). Arreglo floral de Andromonoisismo, comportándose como alógama por autoesterilidad, debido a la presencia de un sistema de autoincompatibilidad polen-pistilo, que obliga a la polinización cruzada con otros genotipos (Norrmann & Scarel, 2000). De floración estival, antesis matutina ocurre entre las 4:00 y las 8:00 hs.

**Observaciones:** *A. glaucophyllus* presenta la base de la lámina foliar reducida casi a la nervadura central, lo que le da el aspecto de pseudopeciada, la que luego se ensancha hacia el ápice acuminado. Las hojas son típicamente glaucas. Esa coloración es debido a la presencia de una capa cerosa blanquecina impartiendo al follaje un tono azulino muy particular. De aquí que el término *glaucophyllus* sea utilizado para identificar a la especie.

*Andropogon gayanus* Kunth

Enum. pl. 1: 491. 1833. Tipo: Senegalia, Gay s.n. Tipo: Senegalia, Gay s.n. (isótipo K!)

Planta perenne, cespitosa, sin rizomas, erecta, en estado vegetativo de 130-140 cm de altura y en plena floración 200-300-400 cm de altura, entrenudos cortos, innovaciones intravaginales, macollos hemisféricos de 0.40-0.50 cm hasta 100 cm de diámetro, prefoliación convoluta. Vaina con superficie adaxial pubescente; lígula, de 1-1,5 (-2) mm de longitud, fuertemente púrpura, membranácea y ciliada en el borde superior, ciliadas hialinas de 3-4 mm de longitud, márgenes superpuestos, sin aurículas, con un involucro de abundantes ciliadas; collar pubescente, dividido detrás de la lígula, de color vináceo. Presencia de nectarios extraflorales a ambos lados de la región de la lígula, fuertemente púrpura y densamente pubescente, de 2-3-3,5 mm de longitud. Láminas foliares lanceoladas, lineares, enteras, de hasta 100 cm de longitud y 10-11 mm de ancho, base de la lámina foliar reducida casi a la nervadura central, lo que le da el aspecto de pseudopetiolada, la que luego se ensancha hacia el ápice acuminado, nervadura central de 1 mm de ancho y blanquecina en la superficie adaxial, verde y prominente en la superficie abaxial. Follaje glauco-verdoso, ambas superficies foliares pubescentes, pilosidad más abundante en la cara abaxial, con márgenes glaucos y escabrosos en su longitud, con manchas vináceas cuando adulta. **Inflorescencia** laxa, erguida, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares de 4-6,5 cm de longitud, con 2 racimos de espiguillas simples, iguales o diferentes en longitud, espiciformes, conjugados o subdigitados, exsertos o parcialmente incluidos en la espateola; con 9-12 pares de espiguillas. Espateola de 5-6-6,5-7 cm de longitud, lanceolada, de ápice mucronado, mucrón de 2 mm de longitud; raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sétil. El diásporo terminal de cada racimo de espiguillas compuesto por una espiguilla sétil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas, el diásporo medio compuesto por 1 espiguilla sétil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejo rectilíneo, subclavado, coriáceo, de 5 mm x 1 mm, lado dorsal convexo, lado ventral plano y levemente hendido, ápice levemente dilatado, fuertemente cóncavo, notablemente oblicuo, dentado, con una hilera de ciliadas hialinas en ambos márgenes, ciliadas de 4-4,5 mm de longitud desde la mitad del artejo hacia el ápice, hacia la base ciliadas de 1,5-2 mm de longitud. Callo oblicuo de 0,5 mm,

piloso, con ciliás rígidas, hialinas, de 0,5-1 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis. Espiguilla sésil hermafrodita, de 6,5-7 mm de longitud incluido el callo, linear, lanceolada, aristada; gluma inferior de 6,5-7 mm x 1,2 mm, lanceolada, cartácea, de ápice obtuso a subobtusos con asperezas antrorsas en el tercio superior, glabra, callo con pelos hialinos rígidos, cortos (0,5 mm), bicarenada, con 6-nervada entre las carenas, márgenes inflexos, dorso plano, sulcada; gluma superior lanceolada, navicular, de 6 mm x 2 mm, subcartácea, 3-nervada, con nervaduras submarginales tenues, ápice agudo con nervio central que se continúa en un mucrón de 1 mm de longitud, ciliás hialinas de 0,5 mm de longitud en los dos tercios superiores de los márgenes. Lemma inferior lanceolada, hialina, de 5 mm x 1 mm, aguda en el ápice, entera, con márgenes inflexos, con ciliás hialinas en los dos tercios superiores, de los márgenes, lemma superior hialina, de 4 mm x 1 mm, lanceolada, navicular, bilobada con ciliás hialinas en los márgenes del tercio superior nervio central que se continúa en una arista de 10-11,5 mm de longitud columna castaña linear y retorcida luego geniculada y prolongación hialina; pálea hialina, oblonga, entera, ápice redondeado, de 3,5 mm de longitud, con márgenes inflexos con ciliás en el tercio superior. Lódículas 1 mm x 0,5 mm. Ovario, 2 estigmas plumosos púrpura, amarillos o rosados de 2 mm de longitud. Estambres 3, con anteras de 2,5-3 mm de longitud funcionales con dehiscencia poricida. Espiguilla pedicelada estaminada, verdosa o parcialmente verdosa, aristulada, de 5,5-6 mm de longitud, pedicelo filiforme, coriáceo, de 4 mm de longitud, lado dorsal convexo, lado ventral plano, ápice levemente dilatado 1 mm de ancho estrechándose hacia la región central y ensanchándose en la base, una hilera de pelos hialinos en ambas márgenes de 2-2,3-3 mm de longitud, ápice cóncavo, oblicuo, bidentado; gluma inferior verdosa, notablemente aristada, plana, glabra, ápice redondeado, plurinervada, márgenes inflexos, de 5,5-6 mm x 1 mm, arista de 5-6 mm de longitud, linear; gluma superior lanceolada, hialina, acuminada, levemente convexa, cara dorsal plana, márgenes inflexos con ciliás hialinas de 0,5-1 mm en los dos tercios superiores; lemma inferior y lemma superior lanceoladas, hialinas, de 5,5 mm x 0,8-1 mm, ápice agudo, márgenes inflexos. Lemma inferior con membrana hialina en el borde de los márgenes. Palea hialina, entera, ápice obtuso, de 3 mm de longitud. Estambres 3 con anteras de 2,5-3 mm de longitud. Lódículas membranáceas, de 0,8 mm x 0,2-0,3 mm.



**Distribución geográfica y ecología:** *Andropogon gayanus* es una especie nativa, componente principal de la mayor parte de las sabanas de África Tropical del sur de Sahara (Figura 6), habitando regiones entre las isohietas anuales de 400 y 1500 mm (Bowden, 1964b), desarrollándose también, en áreas con precipitaciones anuales inferiores a 400 mm, en suelos con inundaciones periódicas o en los valles estacionales inundados de algunos ríos, en suelos que permanecen húmedos por más tiempo que el terreno circundante (Bowden, 1964b). Los datos de su introducción en América del Sur datan de 1942, cuando *A. gayanus* var. *polycladus* (= *squamulatus*) fue introducida en Brasil desde Transvaal (Otero, 1961). Luego, en 1973, una muestra de semillas de *A. gayanus* var. *bisquamulatus* colectada en Shika Research Station, Nigeria, fue recibida por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia, accesión CIAT 621, la cual fue evaluada en Carimagua, Colombia y en Planaltina, Brasil. En 1980, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), previos ensayos de pastoreo y evaluaciones a campo, liberan CIAT 621 simultáneamente como cv. Carimagua 1 (Colombia) y cv. Planaltina (Brasil) (Ferguson & Andrade, 1997). Desde entonces, muchos países latinoamericanos han lanzado un cultivar genéticamente equivalente de *Andropogon*, pero con diferentes nombres: en Perú cv. San Martín (1982); en Venezuela cv. Sabanero (1983); en Panamá (1983) y Costa Rica (1989) cv. Veranero; en México cv. Llanero (1987); en Cuba cv. *Andropogon* (1988); en Honduras cv. Otoreño (1989); en Nicaragua cv. Gamba (1989) y en Guatemala cv. ICTA-Real (1992). Además de América tropical, su distribución actual se extiende a Asia-tropical: Indochina, India y Australia (Clayton et al., 2002).

**Citología y biología reproductiva:** Moffett & Hurcombe (1949) y Olorode (1972) reportaron citotipos tetraploides ( $2n=4x=40$ ) para todos los individuos provenientes de Nigeria, sin embargo, otros recuentos cromosómicos para el material nigeriano reportaron citotipos diploides ( $2n=2x=20$ ), y plantas aneuploides con  $2n = 35$ ,  $2n = 40$ ,  $2n = 42$  y  $2n = 43$  cromosomas (Singh y Godwar, 1960). Foster (1962) encontró indicios de cruzamientos naturales entre *A. gayanus* var. *tridentatus* ( $2n=2x=20$ ) con *A. tectorum* Schum. y Thonn. ( $2n=2x=20$ ) una especie estrechamente relacionada con *A. gayanus* (Keeler-Grein y Rainer Schultze-Kraft, 1989).

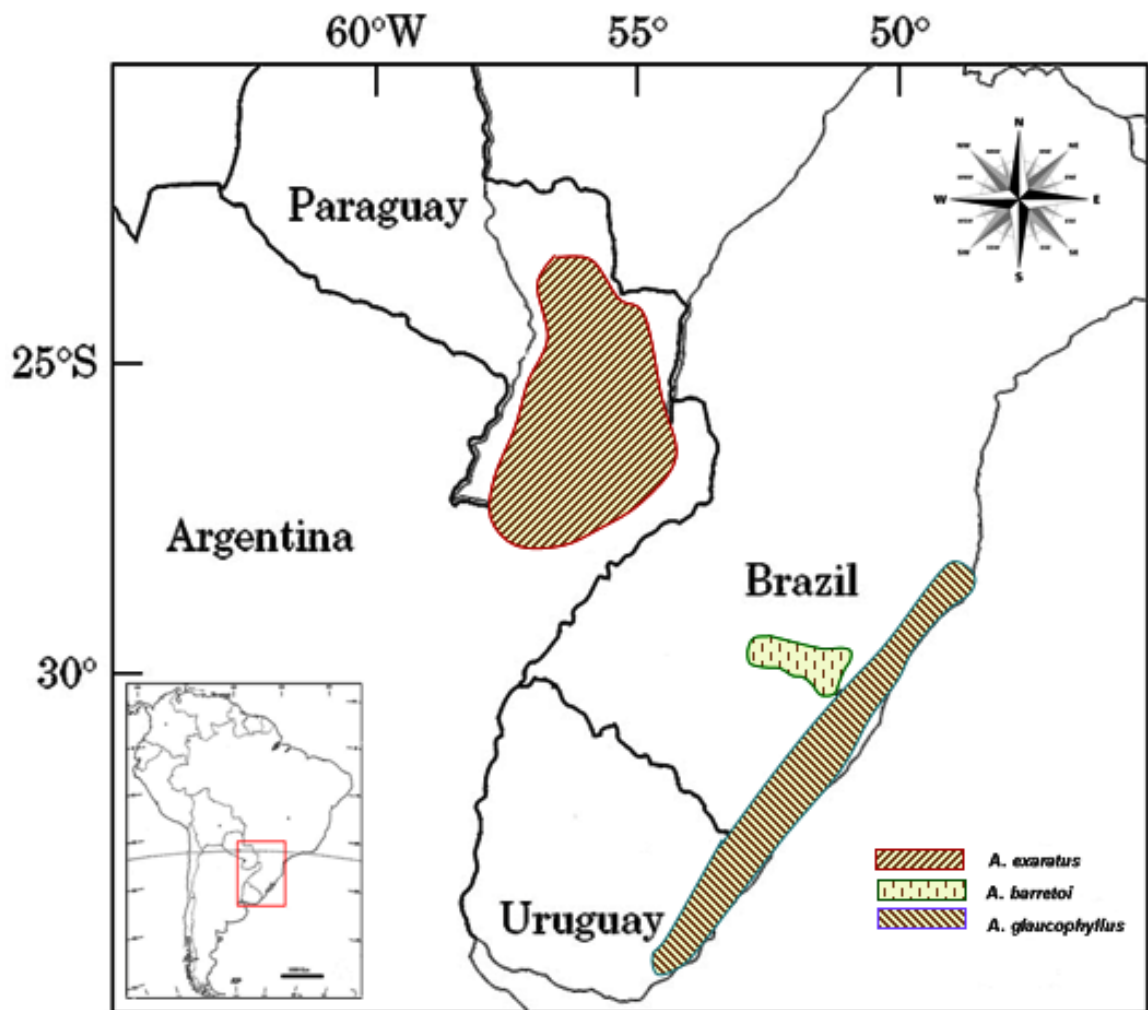
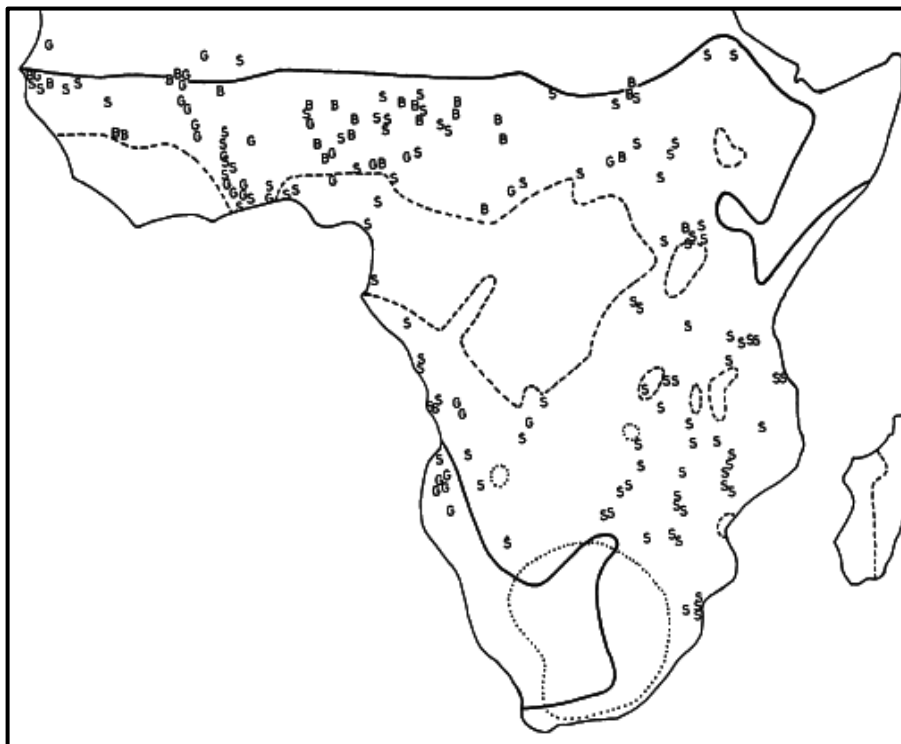


Figura 5: Distribución geográfica de las especies hexaploides del género *Andropogon* del cono sur de Sudamérica.



**Figura 6: Distribución geográfica de *Andropogon gayanus* Kunth. Referencias: B. var. *bisquamulatus* (Hochst.) Hack.; G. var. *gayanus*; S. var. *squamulatus* (Hochst.) Stapf. Imagen de Bowden, B. N. (1964).**

## Capítulo 2

### Estudios Citogenéticos Clásicos y Moleculares

Para poder inferir en las relaciones genómicas entre las especies del género *Andropogon*, se han empleado técnicas de citogenética clásica (análisis del cariotipo, bandeos cromosómicos fluorescente, estudios meióticos en especies e híbridos interespecíficos controlados) y técnicas moleculares (hibridación *in situ* fluorescente). La citogenética clásica ha demostrado ser de gran utilidad para resolver problemas taxonómicos, evolutivos; las técnicas moleculares son herramientas poderosas que posibilitan caracterizar genomas y cromosomas en especies aloploides.

### Materiales y Métodos

#### Material vegetal:

Las plantas empleadas durante el desarrollo de esta tesis provienen de poblaciones naturales. Las mismas fueron obtenidas durante los diferentes viajes de colección realizados por el Dr. Guillermo Norrmann, en el cono sur de Sudamérica (Argentina, Sur de Brasil, Uruguay y Paraguay) y por la Ing. María Irma Hidalgo en el Nordeste Argentino. En cada sitio se colectaron semillas, inflorescencias, plantas vivas para material de herbario y trozos de matas las cuales fueron trasplantadas a macetas y cultivadas bajo condiciones naturales en el Jardín experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina) y bajo condiciones controladas en el invernáculo del Laboratorio Genética y Mejoramiento de especies forrajeras (FCA-IBONE-CONICET-UNNE). Los vouchers correspondientes a cada ejemplar se encuentran depositados en las siguientes Instituciones: CTES, BAA, CORD, SI, LIL, US, G, F, MB, MBM, NSW, NY, IAC, WIS.

A continuación, los nombres de las especies utilizadas:

#### Diploides:

*Andropogon selloanus* (Hack) Hack. \*

*Andropogon macrothrix* Trin. \*

*Andropogon gyrans* Ashe \*\*

#### Triploide:

*Andropogon ternatus* (Spreng.) Nees \*

**Tetraploide:**

*Andropogon ternarius* Michx. \*\*

*Andropogon gayanus* Kunth \*\*\*

**Hexaploide:**

*Andropogon barretoii* Norrmann & Quarín\*

*Andropogon exaratus* Hack. \*

*Andropogon glaucophyllus* Roseng., B.R. Arrill. & Izag. \*

*Andropogon gerardii* Vitman \*\*\*\*\*

\* Plantas obtenidas de semillas y trozos de matas.

\*\* Plantas obtenidas de semillas.

\*\*\* Semillas y plantas provistas por el Dr. José Francisco Montenegro Valls.

\*\*\*\* Semillas colectadas por el Dr. Guillermo Norrmann en USA: Apalachicola National Park, Florida st., near Tallahassee (N-120, N-121); Nebraska, Pawnee Co., NE Pawnee Prairie (N-122, N-123 CTES, USA).

**Métodos**

**Medición del contenido de ADN.**

Las mediciones de contenido de ADN fueron realizadas mediante la técnica de Citometría de flujo siguiendo la metodología descrita por Vaio et al. (2007), empleándose como colorante Ioduro de Propidio (IP).

Se utilizó el equipo de Citometría de Flujo perteneciente al servicio de citometría del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), *Citómetro Partec PAII (Ploidy Analyser II, Partec GmG, Münster, Alemania)* con lámpara láser azul, con longitud de onda de 480 nm. Se contó con la colaboración de la Ing. Agr. Florencia Galdeano a cargo de dicho servicio.

Como valores de referencia del contenido de ADN total ("testigo"), se utilizaron tres especies estándares: *Paspalum intermedium* Munro ex Morong. Accession Sch 28857 (diploide,  $2C = 1.417$  pg, Angulo y Dematteis 2013), *Paspalum dilatatum* spp *flavescens* Q39552 Roseng., B.R.Arrill. & Izag. (tetraploide,  $2C = 2,43$  pg, Vaio et al. 2007) y *P. dilatatum* Chiru biotipo (hexaploide,  $2C = 3.57$  pg, Vaio et al. 2007).

Los datos obtenidos en unidades arbitrarias se convirtieron a picogramos (pg). Cada una de estas especies fue seleccionada como patrón de referencia, debido a que sus contenidos de ADN eran cercanos a los de las muestras a analizar.

Se efectuaron tres repeticiones del contenido de ADN por material vegetal, y por cada análisis se midió aproximadamente 5000 a 10000 núcleos. El contenido de ADN fue estimado comparando el pico producido por la muestra analizada con el pico producido por la muestra testigo.

El contenido de ADN nuclear (2C) en pg de cada muestra, se calculó aplicando la fórmula propuesta por Doležal y Bartos (2005):

$$\text{Contenido de ADN de la muestra} = \frac{\text{media del pico G1 de la muestra}}{\text{media del pico G1 del patrón}} \times \text{Cont. de ADN (2C) del patrón (pg de ADN)}$$

El tamaño del genoma monoploide (1Cx) se calculó dividiendo el valor de 2C por el nivel de ploidía mediante la fórmula propuesta por Greilhuber et al. (2005). La conversión de picogramos (pg) a de megabases pares (Mbp) se realizó utilizando el factor de conversión 978 de acuerdo con Doležal et al., 2003).

### **Evaluación del contenido de ADN por citometría de flujo empleando IP**

Para la extracción de los núcleos se procedió de la siguiente manera:

#### Procedimiento:

- Se utilizó el kit comercial *CyStain® PI Absolute P, Partec*. Este kit cuenta con Buffer de extracción, Buffer de tinción (solución de ioduro de propidio) y Rnase A.
- Se cortaron 3-4 trozos de hojas frescas del material vegetal a analizar, de 20 mm de longitud cada uno y una cantidad similar del material vegetal utilizado como patrón.
- En una caja de Petri, conteniendo 0,5 ml de buffer de extracción, se molió con una hoja de afeitar el material vegetal y el patrón en forma conjunta.
- Cada muestra fue incubada en frío, durante 5 minutos y en oscuridad.
- Se filtró cada muestra a través de una malla de nylon de 50 µm (*CellTrics, Partec*), traspasándola a tubos de 2 ml.
- Se agregó 1,5 ml de buffer de tinción, se incubaron en frío, durante 15 minutos en oscuridad y luego se analizaron.

El análisis de datos fue realizado con el Software de computación *Partec PA II FloMax* (PartecGmbH, Münster, Germany).

La estimación de la variabilidad del genoma de cada muestra se realizó utilizando el software *InfoStat*, versión 2009 (Di Rienzo et al. 2009).

Las diferencias en el contenido de ADN se probaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las comparaciones entre medias se realizaron utilizando el Test de Tukey. La Significancia se evaluó a  $p > 0.05$ .

### **Viabilidad de granos de polen**

Para asegurar que la microsporogénesis produce granos de polen viables, se analizó la viabilidad de los mismos sobre la base del porcentaje de granos de polen teñidos con Colorante de Alexander (Anexo I).

Aquellos granos de polen que se observaron coloreados fueron clasificados como viables, y aquellos que se observaron no coloreados o con una distribución defectuosa del colorante fueron clasificados como no viables. En base a esta clasificación, se infirió en forma indirecta sobre la fertilidad de los granos de polen.

Se observaron de 300-1000 granos de polen maduros tomados al azar de cada individuo, cosechados al momento de la antesis.

## **Estudios de Citogenética Clásica**

### **Mitosis**

Todas las observaciones fueron realizadas en células meristemáticas de ápice de raíces provenientes de plantas cultivadas en macetas, bajo condiciones de invernáculo. Las raíces de aproximadamente 0.5-1 cm de longitud, fueron seleccionadas y pretratadas en 8-Hidroxiquinoleína 0,002 M durante 5-6 hrs a temperatura ambiente y en oscuridad. Se probaron pretratamientos con  $\alpha$ -bromonaftaleno y con menor tiempo de exposición (2.5-3-4 hrs) pero no se obtuvieron adecuadas condensaciones de los cromosomas, lo cual se logró con el pretratamiento con 8-hidroxiquinoleína y a mayor tiempo de exposición.

Las raicillas, se fijaron en Solución de Farmer (Anexo I).

La tinción se llevó a cabo mediante la coloración de Feulgen (Anexo I), para lo cual las raicillas fijadas en Solución de Farmer, se lavaron en agua destilada 3 veces (durante 10

minutos cada vez) para retirar el exceso de fijador. Luego, se hidrolizaron en HCl 1N durante 8 minutos a 60 °C, y nuevamente se lavaron en agua destilada 3 veces (durante 10 minutos cada vez). Las raicillas se transfirieron al Reactivo de Schiff a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que los ápices de las raicillas colorearon. Una vez coloreados los ápices, se lavaron nuevamente 3 veces (durante 10 minutos cada vez) en agua destilada a temperatura ambiente y se realizó el squash sobre una gota de orceína acética al 2% (Anexo I).

Los preparados fueron observados con un microscopio óptico de luz transmitida y eventualmente con contraste de fase.

### **Análisis del cariotipo**

La medición de los cromosomas se realizó con el programa del Departamento de Biología de la Universidad de Colorado (USA): MicroMeasure Versión 3.3 disponible [www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure](http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure) <https://sites.biology.colostate.edu/MicroMeasure/> (Reeves, 2001).

La nomenclatura utilizada para la descripción de los cariotipos es la propuesta por Levan et al. (1964). La morfología de los cromosomas fue determinada utilizando el índice centromérico ( $IC = \text{brazo corto} \times 100 / \text{longitud total del cromosoma}$ ). Según lo cual, los cromosomas fueron clasificados en: cromosomas metacéntricos *m* ( $IC = 50-37.5$ ); cromosomas submetacéntricos *sm* ( $IC = 37.5-25$ ); cromosomas subtelocéntricos *st* ( $IC = 25-12.5$ ); y cromosomas telocéntricos *t* ( $IC = 12.5-0$ ).

En los Cariogramas, los miembros del complemento cromosómico han sido agrupados de acuerdo con su morfología, el primer lugar corresponde a los cromosomas *m*, luego los *sm*, los *st* y finalmente los *t*. Dentro de cada categoría, los cromosomas fueron ubicados en orden descendente de acuerdo con su longitud total.

Para caracterizar numéricamente los cariotipos se estimaron los siguientes parámetros: longitud total del cariotipo (LT), índice centromérico (IC), longitud de brazo corto (*b*), longitud de brazo largo (*B*), razón de brazo ( $AR = R(b/B)/n$ ) donde *b* y *B* son la longitud media de los brazos cortos y largos de cada par de homólogos, respectivamente, *n* es el número de pares de cromosomas homólogos.

La estimación de la asimetría cariotípica, se realizó, según dos parámetros numéricos,  $A_1$  y  $A_2$  propuestos por Romero Zarco (1986). El primer parámetro, mide la Asimetría Intracromosómica, cuyo rango varía de 0 a 1, infiriendo que la simetría es mayor cuando



el valor tiende a 0, con los cromosomas tendiendo a una morfología metacéntricos, siendo independiente del número de cromosomas y del tamaño de los mismos. Se estima por medio de la siguiente ecuación:

$$A_1 = 1 - \sum_{i=1}^n \left( \frac{b_i}{B_i} \right) / n$$

donde  $b_i$  y  $B_i$  son las longitudes de los brazos cortos y largos, respectivamente, de todos los pares de cromosomas homólogos;  $n$  es el número de pares de cromosomas homólogos.

El parámetro  $A_2$ , se estimó por medio del coeficiente de dispersión de Pearson:

$$A_2 = S / \bar{x}$$

donde  $S$  es la desviación standard de la longitud cromosómica total y  $\bar{x}$  es la longitud cromosómica promedio. Dicho índice, mide la Asimetría Intercromosómica, debida a la relación entre el largo de los cromosomas. Debido al uso de  $S$  en lugar de la varianza, este índice es independiente del tamaño de los cromosomas y no tiene unidad de medida.

Por medio del uso de estos dos índices y su representación gráfica simultánea en dos coordenadas (Romero Zarco, 1986), se puede realizar una comparación de variaciones numéricas continuas de los diferentes cariotipos.

### Meiosis

El análisis de la meiosis se realizó en híbridos interespecíficos obtenidos por cruzamientos controlados y en sus parentales. Se colectaron inflorescencias jóvenes e inmaduras las cuales se encontraban aún dentro de la hoja bandera (primeros estadios de desarrollo) fueron fijadas en una mezcla de alcohol etílico-ácido láctico (5:1) (Anexo I) por 24 hrs. Luego se conservaron en etanol al 70 % a 4°C.

Los preparados se realizaron a partir de células madres del polen (CMP). Se extrajeron 3 anteras por espiguillas colocando 1 por preparado, las cuales se colorearon en una gota de carmín acético al 2% (Anexo I) y se procedió a su maceración. Aquellos preparados que contenían células con divisiones se hicieron permanentes con una solución de Terpentina de Venecia, y se dejaron secar al aire durante una semana hasta su observación. Se analizaron no menos de 30 CMP por especies y por híbridos.

Los preparados fueron observados con un microscopio óptico de luz transmitida *Leica ICC50* con cámara digital. Procesador de imagen software *Leica IM50* (versión 4.0) (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK).

### **Bandeo C / DAPI fluorescente**

La técnica de Bandeo C con tinción DAPI, se llevó a cabo según lo propuesto por Schwarzbacher (1980) con las modificaciones debidas a las particularidades del material analizado. Para esta técnica se utilizan las preparaciones que se conservaron a 4°C.

#### ***Obtención de preparados cromosómicos:***

- Se lavaron las raíces en agua destilada 3 veces por 10 minutos cada vez para remover el fijador (3.1).
- Las raíces fueron colocadas en buffer tampón de ácido cítrico-citrato de sodio 0,01 M, pH 4.8 (Anexo I), y se les realizaron 3 lavados de 10-15 minutos cada uno.
- Se transfirieron a una solución conteniendo un mix de enzimas (celulasa Onozuka RS al 2% (p/v) y pectinasa al 20 % (p/v) (Anexo I), para realizar la digestión durante 3-4 horas en estufa a 37 °C.
- Las raíces fueron transferidas al buffer tampón para ser lavadas 3 veces durante 10-15 minutos cada vez y retirar el exceso de enzimas.
- Con los ápices seleccionados, se realizaron los preparados, colocándolos sobre un portaobjeto bien desengrasado, procediéndose al aplastado o squash en una gota de ácido acético 45%.
- Aquellos preparados con metafases adecuadas, cromosomas bien dispersos y limpios de citoplasma fueron seleccionados por observación con un microscopio de contraste de fases *Leica ICC50* con cámara digital.
- Los preparados se congelaron con gas carbónico para poder retirar el cubreobjeto.
- Dejándolos que se sequen durante al menos 2 horas a temperatura ambiente.

#### ***Procedimiento:***

- Al momento de utilizarlos, los preparados fueron deshidratados en alcohol absoluto y mantenidos en alcohol etílico durante 24-48 horas.

- Se realizó hidrólisis en HCl 0,2 N a 60 °C durante 3 minutos y luego los preparados se lavaron en abundante agua corriente y luego en agua destilada.
- Los portaobjetos se colocaron en un vaso coplin conteniendo una solución saturada de Ba (OH)<sub>2</sub> (6 gr/100 ml) (Anexo I) a temperatura ambiente (20 - 22°C) durante 8 minutos.
- Posteriormente los preparados se lavaron enérgicamente con abundante agua corriente y se transfirieron para su incubación a 2 x SSC (Anexo I) a 60 °C durante 60 minutos.
- Escurrir los preparados y lavarlos rápidamente con agua destilada.
- Los preparados se tiñeron en una solución de trabajo de DAPI (Anexo I).
- Se cubrieron con un cubreobjeto de plástico (Anexo I) y se los incubó en la oscuridad durante 20 minutos.
- Se lavaron brevemente en 2 x SSC para eliminar los cubreobjetos y drenar.
- Se agregó una gota de medio de montaje para DAPI a cada preparado y se les colocó un cubreobjeto de vidrio de 24 x 60 mm a cada uno. Se los guardó durante 3-4 días en oscuridad.
- Se analizaron al menos tres plantas por especie y entre cinco y diez metafases mitóticas por cada individuo. La observación se realizó con un microscopio epifluorescente *Leica DMLB*, con cámara fotográfica digital *DFC350 FX CCD*, con juego de filtros apropiados para DAPI.
- El procesamiento final de las imágenes se realizó con el software Adobe® Photoshop CC.

### **Bandeo CMA<sub>3</sub> / DAPI fluorescente**

La técnica de Bandeo CMA<sub>3</sub>/DAPI, se llevó a cabo según la técnica propuesta por Schweizer (1976) con las modificaciones debidas a las particularidades del material analizado. Para esta técnica se utilizaron preparados obtenidos siguiendo los pasos descriptos para la Técnica de Bandeo C/DAPI y fueron conservados a 4°C.

#### **Procedimiento:**

- Los preparados fueron colocados en metanol 2 horas.
- Se secaron al aire a temperatura ambiente.
- Los preparados se lavaron con Buffer Mc Ilvaine (Anexo I).

- A cada preparado se les colocó DAPI (75 µl) (Anexo I).
- Se los cubrió con cubreobjeto de papel de acetato y se los incubó en una cámara húmeda en oscuridad, durante 20 minutos.
- Se lavaron alternando agua destilada, buffer Mc Ilvaine, agua destilada.
- Se dejaron secar al aire y en oscuridad.
- Una vez secos, se colocó a cada preparado una gota de CMA (Anexo I), se cubrieron con cubreobjetos de papel de acetato y se los mantuvo en una cámara húmeda en oscuridad durante 1 hora.
- Se lavaron alternando agua destilada, buffer Mc Ilvaine, agua destilada.
- Los preparados secaron al aire, sobre papel absorbente a temperatura ambiente.
- Sobre cada preparado, se colocó una gota del medio de montaje (Anexo I) y se cubrió con un cubreobjeto de vidrio de 24 x 60 mm cuidando que no queden burbujas. El exceso de medio de montaje se eliminó presionando suavemente el preparado en un papel absorbente y se sellaron los bordes con pegamento para evitar la entrada de aire.
- Los preparados se conservaron en la heladera durante 3-4 días, en oscuridad antes de su observación y fotografía.
- Se analizaron al menos tres plantas por especie y entre cinco y diez metafases mitóticas por cada individuo.
- Se los observó con un microscopio epifluorescente *Leica DMLB*, con cámara fotográfica digital *DFC350 FX CCD*, con juego de filtros apropiados para DAPI y CMA. El procesamiento final de las imágenes se realizó con el software Adobe® Photoshop CC.

Fluorocromo	Excitación	Juego de filtros	Filtro excitador	Divisor cromático	Filtro supresor
DAPI	UV-H365	48 19 <u>01</u>	BP 365/12	FT 395	LP 397
CMA	H436	48 79 <u>06</u>	BP 436/10	FT 460	LP 470

### Estudios de Citogenética Molecular

#### Experiencias de hibridación *in situ*

##### Sonda:

La sonda es un fragmento de ADN o ARN que se marca para su detección durante el experimento de hibridación *in situ*.

### **Tipos de sondas:**

Las sondas que se utilizan en hibridación *in situ*, pueden ser de ARN o de ADN, siendo en este caso ADN genómico total extraído y purificado a partir de tejidos vegetales.

También se utilizan sondas cortas de secuencias específicas, las cuales pueden obtenerse y amplificarse por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o por clonación de plásmidos y amplificación en bacterias.

### **Obtención de las sondas:**

#### **Para estudios de GISH:**

##### ***Extracción de ADN genómico total:***

Para las experiencias de GISH se utilizó ADN genómico total como sonda.

Se utilizaron dos protocolos de extracción de ADN.

- Para ambos protocolos se extrajo ADN de material fresco, se eligieron brotes y láminas de hojas jóvenes, en buen estado.
- Se pesaron 100 mg de material fresco.
- Se cosecharon entre 0,2 y 0,4 gramos de hojas frescas y sanas, las que fueron mantenidas inmediatamente en nitrógeno líquido, evitando así su oxidación.
- El material vegetal, se molió con N<sub>2</sub> líquido, en un mortero con pilón de porcelana, previamente enfriados.
- La molienda obtenida se colocó en tubos tipo “eppendorff” de 2 ml resistentes a fenol. Estos tubos con la molienda se mantuvieron congelados en N<sub>2</sub> líquido hasta que fueron utilizados.

##### **Protocolo de extracción según Dellaporta et al. (1983):**

- Se calentó el baño María a 68 °C, para precalentar el Buffer de extracción [Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), EDTA 50 mM (pH 8), NaCl 500 mM, SDS 2% y Polivinilpirrolidona (PVP)1% PM 360.000] (Anexo I) con el agregado de β- mercaptoetanol (100 µl de β- mercaptoetanol por cada 10 ml de “buffer”).
- En una probeta de 100 ml, se colocaron 70 ml de Buffer de extracción y 700 µl de β- mercaptoetanol, y se mantiene en el baño María a 68 °C.

- Trabajando sobre hielo, a cada tubo tipo “eppendorf”, conteniendo la molienda e identificado, se agregó 1 ml de “buffer” de extracción. Cada tubo se mezcló por inversión para que el buffer impregne todo el polvo de la molienda.
- Las muestras se incubaron durante 10 a 20 minutos a 68 °C. Luego se añadieron 250 µl de acetato de potasio 5M (Anexo I) y se incubaron en hielo durante 1 a 2 horas.
- Los tubos con las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm en una centrifuga *Eppendorf 5407* refrigerada a 4°C, durante 10 minutos.
- Del sobrenadante obtenido en cada muestra, se pipetearon 900 µl y se transfirieron a otro tubo tipo “eppendorf” de 2 ml, y se agregaron 1100 µl de isopropanol frío conservándolos toda la noche a -20°C.
- Al otro día, se centrifugados las muestras a 13.000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se dejó secar cada muestra conteniendo el “pellets” a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Las muestras de ADN se resuspendieron en 250 µl de TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8) y EDTA 1 mM (pH 8)] (Anexo I) y se agitaron durante 1 hora para una buena disolución.
- A cada tubo se agregó 1 µl de ARNasa A (10 mg/ml) (Anexo I).
- Se mantuvieron en agitación, en un shaker orbital, a 100 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Cada una de las muestras fueron transferidas a tubos “eppendorf” de 1,5 ml, conteniendo el mismo volumen de una mezcla de 1 parte de fenol: 1 parte de cloroformo (1:1).
- Los tubos fueron agitados por inversión durante algunos segundos y luego se centrifugaron a 13.000 rpm, a 4°C durante 15 minutos.
- Se transfirieron 150 µl de la fase superior a tubos “eppendorf” limpios y se agregaron 0,5% v/v de NaCl 5M (Anexo I) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (mezcla incubada toda la noche a -20°C).
- Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C, durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.
- El ADN obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 70%.
- Las muestras nuevamente se centrifugaron 13.000 rpm, durante 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y las muestras con ADN se secaron en estufa a 37°C.

- Las muestras de ADN se resuspendieron en 50 µl de agua ultrapura (Anexo I) o en a temperatura ambiente, durante 1 hora con agitación.
- Las muestras se conservaron en el freezer hasta su cuantificación.

**Protocolo de extracción con Kit de extracción Genomic DNA from plant, NucleoSpin®**

**Plant II (Macherey-Nagel)**: siguiendo las indicaciones del Manual suministrado por los fabricantes:

[https://www.mnnet.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM\\_gDNAPlant\\_NSPlantII.pdf](https://www.mnnet.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNAPlant_NSPlantII.pdf)

**Cuantificación de ADN con Espectrofotómetro:**

Consiste en la medición de la absorbancia de la muestra en un espectro de luz ultravioleta. Para los cual se toma la lectura de absorbancia a 260 nm (OD<sub>260</sub>) y 280 nm (OD<sub>280</sub>) (Sambrook et al., 1989). El cociente entre ambos valores (260/280), permite obtener un índice, que es utilizado para determinar la pureza de la muestra de ADN.

La concentración del ADN de cada una de las muestras fue estimada mediante el uso de un espectrofotómetro *SmartSpec 3000 de BioRad*, mediante mediciones de absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una vez determinada la concentración, se realizaron las diluciones correspondientes para estandarizar la concentración.

**Estimación de la calidad del ADN extraído por electroforesis en gel de agarosa:**

Para determinar la calidad del ADN genómico obtenido, es decir, su integridad y si existe ARN, conviene realizar un chequeo por medio de un gel de agarosa, de una alícuota de la muestra y luego su separación electroforética.

La concentración de agarosa (tamaño del poro) dependerá siempre del tamaño del ácido nucleico que se desea analizar. Esto es importante, ya que permitirá una mejor resolución de las muestras si el porcentaje de concentración es el adecuado.

Usualmente los porcentajes de concentración van desde el 0.2% hasta un 6%, dependiendo del número de pares de bases (pb). A mayor concentración del gel, los poros serán más pequeños por lo que se podrán apreciar aquellos fragmentos con un número menor de pb y viceversa.

Para este trabajo, el ADN obtenido se cuantificó y estimó su calidad en gel de agarosa al 0,8 % disuelto en Buffer TAE 1x [Tris-acético 40 mM y EDTA 1 mM (pH 8)].

**Preparación del gel de agarosa al 0,8 %:**

- En un Erlenmeyer de 500 ml se agregó 1,6 gr de agarosa ultra pura.
- Se disolvió en 200 ml de buffer TAE 1 x (Tris-HCl 0.04M, EDTA disódico 0.001M y 11.4 ml de ácido acético) (Anexo I) y 225 ml de agua destilada estéril.
- Se llevó la solución a un microondas hasta hervor durante 10 segundos o hasta que se disolvió bien la agarosa.
- Se dejó enfriar hasta los 60°C.
- Se preparó un molde para el gel y se colocó un peine adecuado.
- Se volcó la agarosa en el molde de la cuba electroforética y se dejó solidificar.
- En la cuba conteniendo Buffer de corrida se sumergió el gel y se retiró el peine.

**Mezcla para siembra:**

- En tubos de PCR, se colocaron 5 µl de ADN a cuantificar, 2 µl de colorante GelRed™ Nuclei Acid Gel Stain (Anexo I), 2 µl de buffer de siembra (Anexo I).
  - En otro tubo de PCR, se preparó 5 µl del marcador de peso molecular conocido (fago *Lambda* digerido con *EcoRI/Hind III*) (Anexo I) y 2 µl de colorante GelRed™.
  - Ambas mezclas se centrifugaron suavemente (menos de 1 segundo).
  - Cada mezcla con el ADN a cuantificar se sembró con micropipeta en cada pocillo del gel. Y en una calle central del gel se sembró la mezcla con el marcador de peso molecular conocido.
  - Se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se dejó correr el ADN a 100V durante 1 hora.
  - Se colocó el gel sobre un Transiluminador de luz ultravioleta marca *DNR MiniBis Pro*, provisto de cámara fotográfica digital.
  - Se visualizaron los fragmentos de ADN que forman bandas y se compararon con las bandas obtenidas del marcador de peso molecular conocido.
- Según la intensidad de las bandas se observó a qué banda del marcador se asemejó la del ADN a cuantificar y, en base a la cantidad de ADN que existe en esa banda del marcador, inferimos la cantidad sembrada del ADN a cuantificar. También de este modo se pudo determinar la concentración de cada una de las muestras.
- Las muestras fueron conservadas a -20 °C.



## Para estudios de FISH

### ***Obtención de sondas ribosomales 5S y 45S de *Triticum aestivum*:***

La extracción de ADN de la cual se obtuvieron las sondas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983).

- Se sembraron semillas de *Triticum aestivum*.
  - Las plantas se desarrollaron en macetas en condiciones de invernáculo.
  - El ADN se extrajo de material fresco (hojas jóvenes y tiernas) en muy buen estado.
  - Se identificó el tamaño, cantidad y calidad del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa y medición con Espectrofotómetro.
  - Las secuencias repetitivas correspondientes a los genes ribosomales de trigo, las cuales son compatibles con las especies a analizar, fueron obtenidas del “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
  - Utilizando el programa “Primer 3”, diseñado por Rozen & Skaletsky (2000) para el White Institute for Biomedical Research & Howard Hughes Medical Institute, USA ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)).
  - A partir de las secuencias obtenidas en base a los datos de secuencias nucleotídicas, se diseñaron los iniciadores (“primers”) adecuados para la amplificación de dichas secuencias, las cuales se obtuvieron mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
  - Se ordenó la síntesis de estos “primers” a la firma *Invitrogen*.
- Las secuencias cebadoras diseñadas fueron las siguientes:

- Para amplificar la secuencia de “220 pb”:

<b>Left primer</b>	<b>AAGTCCTCGTGTTCATTCC</b>
<b>Right primer</b>	<b>GACGAGTTTAACGCGGTTTC</b>

- Para amplificar la secuencia de “940 pb”:

<b>Left primer</b>	<b>TAGATCCCCGTTGTACTGC</b>
<b>Right primer</b>	<b>CTTGGATGTGGTAGCCGTTT</b>

### ***Amplificación de las sondas por PCR:***

El procedimiento de amplificación a partir de estos primers fue el siguiente:

- Las reacciones se realizaron a un volumen final de 25 µl, utilizando una mezcla para PCR (Anexo I).
- Las muestras se colocaron en un termociclador *Bioer Gene Pro Thermal Cyclers TC-E-4L*.
- Los ciclos de amplificación en el termociclador fueron los siguientes:
  - Desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min;
  - 30 ciclos de desnaturalización (apertura de la doble hélice) de 30 segundos a 94 °C,
  - 30 segundos de unión del cebador (hibridación del cebador y síntesis del ADN) a 56 °C,
  - 90 seg de elongación a 72 °C,
  - una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

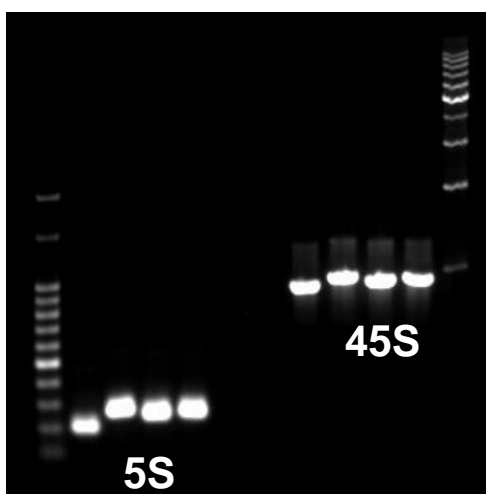
***Separación de los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa:***

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en Buffer TAE 1x (0,04 M Tris, 0,114% ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8,0).

- La electroforesis se realizó con corrida a 100 V durante 1 hora, tiempo necesario para el análisis de los fragmentos.
- El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó por comparación con marcadores de peso molecular conocido (*Lambda EcoR1/HindIII* PB-L) y *qLadder de 100 pb* PB-L) (Anexo I).
- Los geles fueron observados y fotografiados en un Transiluminador marca *DNR MiniBis Pro*, provisto de cámara fotográfica digital.
- Las bandas seleccionadas (secuencias amplificadas 5S y 45S), fueron recortadas del gel, bajo el transiluminador de luz ultravioleta y almacenadas a 4°C en tubos tipo "eppendorf".
- Las secuencias amplificadas se extrajeron del gel mediante "kits" comerciales de elusión de bandas como el "Gel Extraction Kit" (Ambión, cat. N° 1950) o el "KitGel Extraction" (QuiaGen, cat. N° 28704), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.
- Con el producto de la elusión se realizó una nueva corrida electroforética en gel de agarosa para cuantificar los resultados.

**Mezcla para siembra de la sonda 5S y 45S**

- En tubos de PCR, se colocaron 5 µl de la sonda, 2 µl de colorante GelRed™ Nuclei Acid Gel Stain (Anexo I), 2 µl de buffer de siembra (Anexo I).
- En otro tubo de PCR, se preparó 5 µl del marcador de peso molecular conocido (*Lambda EcoRI/Hind III*) (Anexo I) y 1 µl de colorante GelRed.
- En otro tubo de PCR, se preparó 5 µl del Ladder Marker 100 pb (*PB-L*) (Anexo I) y 1 µl de colorante GelRed.
- En otro tubo de PCR, se preparó 5 µl del control (mix para PCR sin ADN) y 1 µl de colorante GelRed.
- Ambas mezclas se centrifugaron suavemente (menos de 1 segundo).
- Cada mezcla con las sondas se sembró con micropipeta en cada pocillo del gel.
- En la primera calle del gel se sembró la mezcla con el marcador de peso molecular conocido *Lambda EcoRI/Hind III* y en la última calle el *Ladder Marker 100 pb*.
- Se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se dejó correr el ADN a 100V durante 1 hora.
- Se colocó el gel sobre un Transiluminador de luz ultravioleta marca *DNR MiniBis Pro*, provisto de cámara fotográfica digital.
- Para visualizar los fragmentos de ADN que forman bandas y se comparan con las bandas obtenidas del marcador de peso molecular conocido.



Según la intensidad de las bandas, se observó a qué banda del marcador se asemejó la del ADN a cuantificar y, en base a la cantidad de ADN que existe en esa banda del marcador, inferimos la cantidad sembrada del ADN a cuantificar. También de este modo se pudo determinar la concentración de cada una de las muestras.

- Las muestras fueron conservadas a -20 °C.

**Marcado de las sondas:**

Los procedimientos de marcación de las sondas pueden ser radiactivos o no radiactivos, siendo estos últimos lo más utilizados en la actualidad por las ventajas que brindan a la técnica de hibridación *in situ*.

Durante estos procesos, la marca puede incorporarse al ADN a través de sistemas enzimáticos como "*Nick Translation*" o "*Oligolabelling (=Random Primed Labelling)*" los cuales sintetizan ácidos nucleicos utilizando nucleótidos marcados.

Muchas veces, de la extracción de ADN de los tejidos, se obtienen largas moléculas de ADN, las cuales deben ser degradadas a fragmentos menores a 1000 pb, para lograr una efectiva marcación de la sonda. Se pueden obtener fragmentos más cortos por medio de del paso reiterado de la sonda a través de agujas hipodérmicas o por acción de un vortex durante 3-5 minutos.

Las sondas utilizadas en este trabajo fueron marcadas con marcadores no radiactivos: biotina y digoxigenina. Estos marcadores son detectados por métodos inmuno-histoquímicos. La biotina es la vitamina H que suele encontrarse en la clara de huevo. Es incorporada al ácido nucleico bajo la forma de biotin-11-dUTP, biotin-16-dUTP, biotin-14-dATP y biotin-11-dCTP. La digoxigenina, es un esteroide que se encuentra normalmente en las plantas *Digitalis purpurea* y *D. lanata*. Se vende bajo la forma de digoxigenin-11-dUTP o digoxigenin-11-UTP.

**Métodos de marcado enzimáticos:**

Existen métodos donde el marcado de la sonda es uniforme (Nick translation y Oligolabelling (= Random primed labelling) y otros métodos de marcado terminal de la secuencia (end labelling). Estos métodos son los más utilizados pues incorporan mayor cantidad de marca al ADN. Sin embargo, las sondas marcadas por End Labelling pueden ser más sensibles puesto que se reduce el efecto del impedimento estérico entre la sonda y el ADN blanco.

Las sondas de ADN total obtenidas para esta Tesis, se marcaron con los métodos de marcado uniforme que se describen a continuación:

**a) "*Nick translation*":**

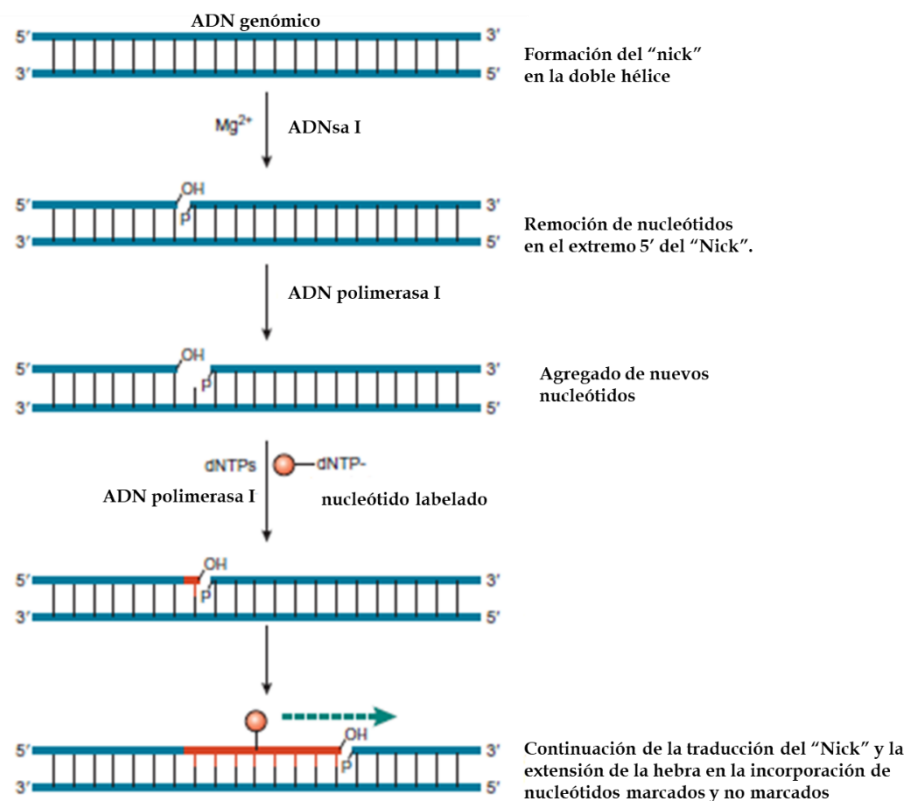
- La reacción utiliza 2 enzimas: la ADNsa I que induce a roturas en una de las cadenas del ADN de doble cadena. Luego, la ADN polimerasa I de *E.coli* se une al punto de rotura y remueve nucleótidos del extremo 5' mientras agrega nucleótidos en el extremo 3'. Este proceso da como resultado la traslación de las roturas en dirección 5'a 3' mientras se reemplaza la cadena de ADN original por nucleótidos nuevos: desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) marcados y no marcados.

- La ADNsa I introduce una ruptura en una de las cadenas (una muesca "Nick") lo que expone un grupo 3'-OH libre.

- La actividad exonucleasa 5'-3' del ADN polimerasa I, remueve los mononucleótidos en el lado 5' del "Nick".

- La ADN polimerasa cataliza, la incorporación de nuevos dNTPs desde la solución en el extremo 3'-OH del "Nick".

- Las actividades combinadas de las exonucleasas y las polimerasas dan como resultado la síntesis de una nueva hebra de ADN en dirección 5'-3'. Ya que algunos de los dNTPs que se agregaron en la solución estaban marcados, esta nueva hebra también lo estará.



Procedimiento de marcado de la sonda con biotina

En el presente trabajo, se utilizó la técnica indicada en el kit comercial *BioNick™ Labelling System (Invitrogen)* (Anexo I) realizándose los siguientes pasos:

- En un recipiente con hielo, se colocaron tubos tipo “eppendorf” de 0.5-0.6 ml, identificados.
- Se pipetearon los siguientes componentes, provistos por el kit.
  - 5 µl 10 x dNTP Mix
  - 1 µg ADN
  - 5 µl 10 x mix de enzimas
  - Agua destilada hasta volumen de 45 µl
- Se mezcló el contenido de los tubos con la yema de los dedos y se centrifugaron a 13.000 rpm, durante 1 minuto.
- Las muestras se incubaron a 16 °C, durante 2 horas.

Para marcar las sondas que se usarán en técnicas de hibridación *in situ*, es aconsejable, incubar la reacción durante 2 h, ya que se requiere un rango de sonda de menor tamaño para facilitar su penetración en la muestra.

- Se agregaron 5 µl de Buffer Stop (provisto por el kit).
- Se conservaron en el freezer hasta su utilización.

**b) "Oligolabelling"** (=Random primed labelling):

Esta técnica de marcado utiliza el fragmento “klenow” de ADN polimerasa de *E. coli* (actividad polimerasa 5’-3’) y oligonucleótidos al azar para incorporar los trifosfatos marcados y no marcados (dNTPs) en el ADN.

- El ADN de doble cadena es desnaturalizado en ADN de cadena simple y los oligonucleótidos o “cebadores” al azar se unen en forma complementaria al ADN de cadena simple.
- Los 3’-OH terminales de los oligonucleótidos sirven como cebadores de la actividad 5’-3’ de la enzima Klenow. Al incluir los dNTPs marcados en la mezcla, la cadena recientemente sintetizada quedará marcada.

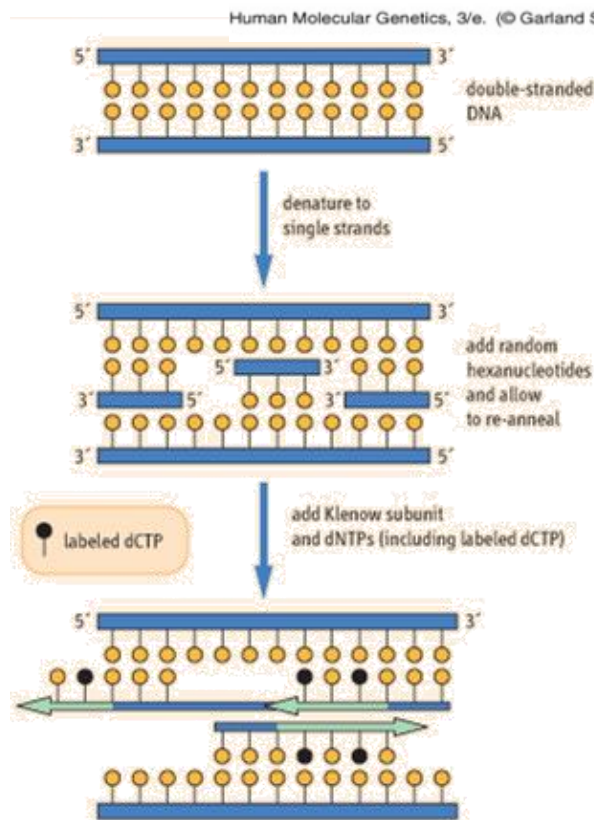
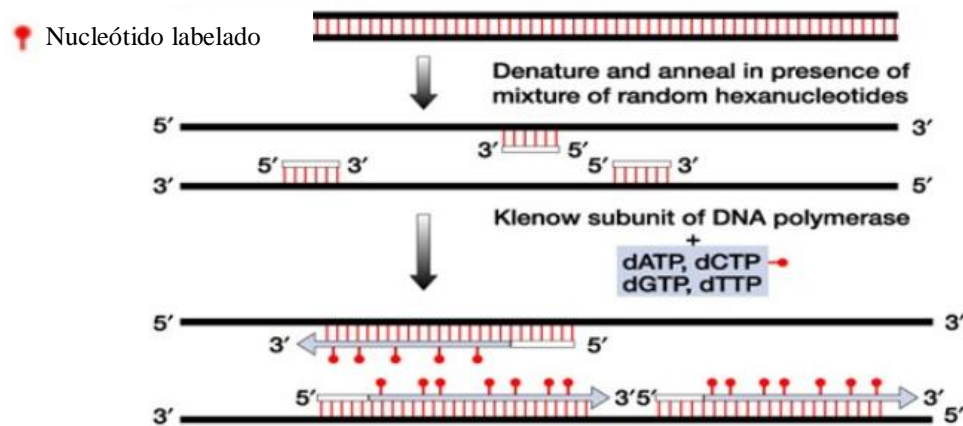


Figure 34.3 Random primer labeling of probe DNA. Random hybridization of hexanucleotides to the template allows the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I to fill in the gaps, incorporating radiolabeled dCTP to create radiolabeled complementary strands of DNA.

### Procedimiento de marcado de la sonda con digoxigenin 11-dUTP

En el presente trabajo, se utilizó la técnica indicada en el kit comercial *DIG-High Prime* (Roche) (Anexo I) realizándose los siguientes pasos:

- Se trabajó con tubos tipo “eppendorf” de 0.5-0.6 ml, identificados.
- En cada tubo se colocaron x µl de agua bidestilada y se agregó x µl de la sonda a marcar. Estas cantidades dependerán de la concentración del ADN a marcar. El volumen final que se debe conseguir para la reacción es de 16 µl.

- Las muestras se colocaron en un baño de agua hirviendo, para desnaturalizar el ADN durante 10 minutos. Este proceso de desnaturalización debe ser completo y es crítico, ya que se deben abrir bien las cadenas para que la marcación de la sonda sea eficiente.
- Pasado este tiempo, las muestras se pasaron inmediatamente a un recipiente con hielo, durante 10 minutos, para que las cadenas se mantengan abiertas.
- Se mezcló bien el *Dig High Prime* y se agregaron 4 µl a cada tubo que se encontraban en el hielo.
- Las muestras se mezclaron y se centrifugaron brevemente.
- Se dejaron incubando en estufa a 37 °C toda la noche. Las incubaciones largas, de hasta 20 horas aumentan el rendimiento del ADN marcado con Digoxigenina.
- Para detener la reacción, se agregó 2 µl de 0.2 M EDTA (pH 8.0) y se colocaron las muestras a baño María a 65 ° C durante 10 min.
- Se conservaron en el freezer hasta su utilización.

Las sondas 5S y 45S fueron marcadas con la técnica *BioNick™ Labelling System* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **Tipos de detección de la marcación enzimática**

A su vez, los métodos de detección, pueden ser directos o indirectos, dependiendo de que la marca que se incorpora en la sonda se pueda visualizar en forma directa o requiera de otra molécula para su visualización.

### **Métodos directos**

La marca se incorpora al ácido nucleico de la sonda y éste puede visualizarse directamente. Por ejemplo, el fluorocromo *tetramethyl rhodamine isothiocyanate* (TRITC, derivado de la rodamina), el cual se acopla químicamente al extremo terminal del ARN; otros son los nucleótidos marcados con fluorocromos como el *fluorescein isothiocyanate* (FITC), la *rodamina* (TRITC) y el *7-amino-4-methyl-coumarin-3-acetic acid* (AMCA), los cuales pueden ser incorporados enzimáticamente dentro de los ácidos nucleicos. Si bien son métodos más rápidos, existe menos probabilidad de detectar secuencias únicas o de bajo número de copias.



## Métodos Indirectos

En los métodos indirectos, la marca que se incorpora no se puede visualizar directamente. La sonda es marcada con un anticuerpo *anti-fluoresceína* que luego de hibridar con el ADN blanco, se une con una molécula de *fluoresceína*, la cual permite ver la señal.

### Estimación del rendimiento de la marcación por *Dot Blot*

La eficiencia de marcado de las sondas, es decir, la confirmación de que los nucleótidos marcados, fueron satisfactoriamente incorporados dentro del ADN durante la reacción de marcado, se realizó mediante un test de *Dot Blot* de detección inmunológica y comparación colorimétrica, según lo propuesto por Schwarzacher & Heslop-Harrison, (2000).

- Se cortó una membrana de nitrocelulosa (*Hybond™ N+*, Amersham) del tamaño del tubo que se utilizó para la reacción.
- La membrana sin sembrar, se dejó embebiéndose dentro de un tubo tipo “falcon” con 5 ml de Buffer 1 (Anexo I), durante 5 minutos y luego se la dejó secar entre papeles de filtro dentro de una cápsula de Petri de vidrio. Es importante que se empape con el Buffer 1 en forma completa y uniforme.

#### Siembra de la membrana:

- Con un lápiz negro, se marcaron sitios de siembra sobre la membrana, cada 1 cm y se identificaron los espacios destinados a cada muestra marcada, dejando un espacio para el control “C” (ADN sin marcar).
- Con micropipeta se sembró 1 µl de la reacción de marcado y 1 µl del control “C”.
- La siembra se dejó secar a temperatura ambiente hasta no ver más las manchas.
- La membrana se colocó en una caja de Petri, entre dos papeles secantes y fue tapada.
- En una plancha de hibridación, se realizó la incubación a 80 °C durante 30 minutos.
- Se sumergió la membrana en Buffer 1 durante 1 minuto, y luego se la colocó en Buffer 2 (Anexo I) durante 30 minutos, con suave agitación en un shaker.
- Se dejó secar la membrana en la caja de Petri entre papeles de filtro.
- Posteriormente, fue bloqueada con solución BSA (Tris-HCl 0,1 M pH 7.5, NaCl 0,1 M, BSA 3 %), durante 20 minutos, e incubada a 37 °C en estufa, en solución de

anticuerpos conjugados (estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina 0,15 U/ml [Streptavidin-AP-conjugate, Roche], anticuerpo anti-digoxigenina conjugada a fosfatasa alcalina 0,75 U/ml [Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche], Tris-HCl 0,1 M pH 7.5, NaCl 0,1 M), durante 10 minutos, con suave agitación.

- Se retiró la membrana de la estufa de incubación y se realizaron 3 lavados con Buffer 1, de 5 minutos cada uno.
- Se transfirió la membrana al Buffer 3 (Anexo I), durante 2 minutos.
- Se preparó el agente de detección, disolviendo las tabletas *BCIP®/NBT Sigma FAST™* en agua ultra pura (Anexo I), en un tubo y conservándola en oscuridad.
- Luego de los lavados, se dejó escurrir la membrana y se la sumergió dentro del tubo conteniendo el agente de detección, durante 10 a 20 minutos, en oscuridad, cuidando de no exponer demasiado la membrana ya que podría quemarse. A los 10 minutos ya se debería observar el desarrollo de la reacción colorimétrica.
- Luego se retiró la membrana del tubo, y se realizaron 2 lavados con agua ultra pura dentro de una caja de Petri.
- Se la dejó secar al aire y se la incubó a 37 °C en estufa, durante 30 minutos.
- La sonda marcada fue detectada por una tinción de color púrpura-marrón (oscuro) como manchas de la sonda.
- La membrana fue conservada en oscuridad y se realizó su interpretación.

### **Reacción de hibridación entre la sonda y el ADN blanco (GISH-FISH)**

La técnica de Hibridación *in situ* (GISH-FISH), se realizó de acuerdo con Cuadrado & Jouvé (1995) con algunas modificaciones propias para el material bajo estudio (Poggio et al., 1999 a, b).

Para la realización de los preparados, se emplearon raíces que fueron pretratadas y fijadas como se describe a continuación:

#### ***Pretratamiento de las raíces:***

- Se lavaron las raíces en agua destilada 3 veces por 10 minutos cada vez para remover el fijador 3:1 en el que se encontraban.
- Las raíces fueron colocadas en buffer tampón de ácido cítrico-citrato de sodio 0,01 M, pH 4.8 (Anexo I), y se les realizaron 3 lavados de 10-15 minutos cada uno.

- Se transfirieron a una solución conteniendo un mix de enzimas (celulasa Onozuka RS al 2% (p/v) y pectinasa al 20 % (p/v) (Anexo I), para realizar la digestión durante 3-4 horas en estufa a 37 °C.

***Obtención de preparados cromosómicos:***

- Se seleccionaron aquellas raíces que perdieron su dureza, en las cuales el ápice se desprendió del resto de la raíz y fueron transferidas al buffer tampón para ser lavadas 3 veces durante 10-15 minutos cada vez y retirar el exceso de enzimas.
  - Con los ápices seleccionados, se realizaron los preparados.
  - El ápice se colocó sobre un portaobjeto limpio, procediéndose a su aplastado en una gota de ácido acético 45%.
  - Aquellos preparados con metafases adecuadas, cromosomas bien dispersos y limpios de citoplasma fueron seleccionados por observación con un microscopio de contraste de fases *Leica ICC50*, provisto de cámara digital.
  - El cubreobjeto se retiró por congelamiento con gas carbónico.
  - Dejándolos que se sequen durante al menos 2 horas a temperatura ambiente.

***Realización de la Técnica:***

***1) Pretratamientos y lavados***

***1.a) Tratamiento con ARNasa***

- Los preparados fueron pretratados con una dilución 1:100 de solución stock de ARNasa (10 mg/ml) (Anexo I) para degradar el ARN y se cubrieron con cubreobjeto de plástico o de papel de acetato.
  - Se incubaron en cámara húmeda con papel embebido en 2 x SSC (Anexo I), a 37 °C durante 1 hora.
  - Se realizaron 2-3 lavados en 2 x SSC, durante 5-10 minutos cada uno, con suave agitación.

***1.b) Tratamiento con paraformaldehído***

- Los preparados se incubaron en una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) (Anexo I) a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Este paso ayuda a fijar a los cromosomas.
  - Se lavaron los preparados en 2 x SSC, 3 veces a temperatura ambiente, durante 5-10 minutos cada lavado con suave agitación.

**1.c) Serie de Deshidratación**

- Los preparados se incubaron en una serie de deshidratación alcohólica: alcohol 70%, 90% y 100%, a temperatura ambiente, durante 3 minutos cada uno.
- Aquellos preparados que se rehibridaron, fueron incorporados a la técnica en este paso.
- Se dejaron secar los preparados al aire, por lo menos durante 2 horas.

**2) Pretratamientos y lavados****2a) Mezcla de hibridación**

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la cinética de la hibridación *in situ* dependen fundamentalmente de la cinética de reacción de la doble cadena de ADN. La estabilidad de esta doble cadena puede determinarse a través de su  $T_m$ , que es la temperatura de disociación a la que la mitad de la molécula dúplex (cromosoma y sonda) se disocia en dos hebras simples. Esta temperatura depende de varios factores, entre ellos la concentración de G-C, la concentración de cationes ( $\text{Na}^+$ ) en la solución de hibridación, la longitud de la sonda y la concentración de formamida a utilizar.

**Componentes de la mezcla de hibridación:**

- \* Formamida deionizada: permite alcanzar una alta astringencia sin dañar los cromosomas, ya que si utilizamos la formamida a mayor concentración habrá una mayor astringencia. La concentración utilizada permitirá duplexos estables entre cadenas con ca. 80% de homologías.
- \* Buffer 2 x SSC: estabiliza la doble hélice de ADN.
- \* Sodio Dodecil Sulfato-SDS 10%: ayuda a la penetración de la sonda.
- \* Sulfato dextrano: es un polímero inerte, el cual forma en la mezcla de hibridación, una matriz que concentra la sonda sin aumentar la astringencia.
- \* ADN de esperma de salmón: reduce la hibridación inespecífica, uniéndose a secuencias de homología universal.
- \* ADN competidor: ADN que actúa como bloqueante específico. Se lo utiliza sin marcar.
- \* ADN marcado: sonda a detectar, la cual consiste en una secuencia determinada o en ADNgt.

Concentraciones a las que se utiliza cada componente de la mezcla de hibridación:

- Formamida<sup>1</sup> ultra pura [50%]
- Sulfato dextrano<sup>2</sup> [10%]
- 20 x SSC [2x]
- ADN de salmón (10 mg/ml) ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}^{-1}$ ) [0,33 mg/ml]
- SDS al 10% [0,3 mg/ml]
- Sonda<sup>3</sup>
- ADN competidor<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Formamida ultra pura. <sup>2</sup>Disuelto en agua y esterilizado. <sup>3</sup>Concentración final de la sonda: 25-100 ng por preparado (sondas clonadas) y 75-200 ng por preparado (ADNgt).

<sup>4</sup>Dependiendo de los materiales, añadir en proporción de 2 a 100x.

Preparación de la mezcla de hibridación:

La mezcla fue preparada inmediatamente antes de su utilización (aunque también podría prepararse y almacenarse a -20 °C hasta seis meses). El volumen final de cada mezcla debe ser de 30  $\mu\text{l}$ , ese volumen final se alcanza con el agregado variable de agua ultra pura.

La mezcla de hibridación se preparó en un tubo tipo “eppendorf” con todos los componentes y cantidades indicados en la siguiente Ficha de Hibridación, a excepción de la sonda:

Fecha:

Nombre Especies					
N° de preparados		1	2	3	4
Soluciones	$\mu\text{l}$				
Formamida deionizada	15				
SO <sub>4</sub> de Dextrano	6				
20 x SSC	3				
SDS al 10 %	1				
DNA salmón	1				
DNA bloqueo	-----				
Agua UP	-----				

Sonda:	----				
Sonda:	----				
Volumen total	30				
Observaciones					

**Procedimiento:**

- En un tubo se agregó cada uno de los componentes de la mezcla. Fue conveniente agregar primero la Formamida deionizada pura; luego, el buffer 2 x SSC; Sodio Dodecil Sulfato-SDS 10% (Anexo I); ADN de esperma de salmón; el ADN competidor; Sulfato de Dextrano.
- Estos componentes se mezclaron bien con un vortex y se centrifugó brevemente.
- Se separó la mezcla en distintos tubos tipo “eppendorff”, dependiendo de la cantidad de preparados a hibridar.
- A cada uno de ellos se le agregó el ADN marcado (sonda) para hibridar.
- Cada tubo se mezcló suavemente con la yema de los dedos y se centrifugó brevemente.
- Como no se realizaron experiencias con bloqueos, no se utilizó ADN competidor. Tampoco se utilizó agua para llegar al volumen final.
- La mezcla de hibridación se desnaturalizó en un Baño María a 70 °C durante 15 minutos para abrir las dos hebras de ADN de la sonda e inmediatamente se incubó en hielo durante 5 minutos para mantener separadas las dos hebras de ADN.
- Luego se centrifugó brevemente.
- Se agregó a cada preparado, deshidratado y seco al aire, 30 µl correspondientes al volumen total de la mezcla de hibridación.
- Se cubrió con un cubreobjeto de papel de acetato, cuidando de que no queden burbujas. De quedar burbujas de aire éstas impedirían una eficiente hibridación.

**3) Desnaturalización e hibridación**

- Se llevaron los preparados a un termociclador *Bioer Gene Pro Thermal Cycler TC-E-4L*, con un adaptador para hibridación *in situ*, con el siguiente programa:

75 °C 7 min; 55 °C 30seg; 45 °C 1min; 42 °C 2min; 40 °C 5min; 38 °C 5min; 37 °C tiempo indefinido. La secuencia de temperatura y tiempo de este programa varía con los distintos organismos a hibridar.

- Se incubaron los preparados en una cámara húmeda con 2 x SSC previamente templada a 37 °C y se los dejó en la estufa de hibridación (37 °C) toda la noche.

#### **4) Remoción de la sonda que hibridó de forma inespecífica**

Las hibridaciones *in situ*, generalmente se llevan a cabo en un rango de astringencia entre 70% (descrita como “baja” astringencia) y 90% (“alta” astringencia). Astringencias por debajo o por encima de este rango pueden ser utilizadas, por ejemplo, para localizar sondas heterólogas en un blanco de una especie diferente o para localizar variantes cromosómicas específicas de una familia de secuencias, respectivamente.

El grado de homología entre la sonda (ácidos nucleicos marcados) y el blanco (ADN de los cromosomas) que se requiere para que una molécula híbrida (doble hélice) se forme y permanezca estable durante la hibridación *in situ*, es una información importante para la interpretación de los resultados y debe decidirse antes de comenzar el experimento.

La astringencia es calculada a través de la temperatura de disociación ( $T_m$ ) de la molécula dúplex de ADN (cromosomas y sonda).

La astringencia define el porcentaje de ácidos nucleicos de la sonda que presentan homologías y se aparean con los ácidos nucleicos del blanco o target, que pueden ocurrir sin que se desnaturalice la doble hélice.

Con una astringencia del 85%, la molécula dúplex de ADN con 85% o más de bases a lo largo de la sonda y el blanco es complementario (homólogo) y un 15% o menos de desapareamiento, permanecería estable, así las moléculas híbridas con una homología del 80% no se formarán ni se disociarán de inmediato. A una  $T_m$ , la astringencia es del 100% y la sonda y el blanco (target) permanecerán hibridados solo donde todos los pares de bases de las regiones homologas estén perfectamente apareados.

En todas las experiencias de hibridación *in situ* realizadas para este trabajo de Tesis, los lavados de post-hibridación se realizaron en condiciones de alta astringencia y con constante agitación, controlando la temperatura, la concentración de la formamida y la

concentración de iones  $\text{Na}^+$ , ya que estos elementos controlan la astringencia y son factores críticos del proceso de hibridación.

#### **4.a) Lavados pos-hibridación**

Los lavados de pos-hibridación se realizaron en un *Baño termostático Vicking-modelo Dubnoff* con agitador.

Todas las soluciones se preincubaron a 42°C en el baño María durante toda la noche, y se mantuvieron a esa temperatura.

Tanto la secuencia de lavados, como la temperatura, concentración de sales, etc., es variable según el material utilizado y los objetivos planteados.

- Los preparados fueron sometidos a una secuencia de lavados la cual se indica a continuación, con alta astringencia y con una suave agitación constante:

- en 2 x SSC 10 min a 42°C
  - en Formamida desionizada al 20% (v/v) en 0,1 x SSC 10 min. a 42°C
  - en 0,1 x SSC 5 min. a 42°C
  - en 2 x SSC 5 min. a 42°C
  - en 4x SSC/tween 20 (0,2%) 5 min. a 42°C
  - en 4 x SSC/Tween 20 (0,2%), 2 lavados de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente.
- Los preparados se dejaron escurrir apenas.

#### **5) Bloqueo de la reacción**

A cada preparado se le colocó:

- 100 µl de una solución de BSA (albúmina bovina) al 5% (p/v) en 4 x SSC/Tween 20 (0,2%) (Anexo I). La solución BSA hibrida sobre sitios inespecíficos.
- Cada preparado se cubrió con un cubreobjeto de papel de acetato y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Luego se quitaron los cubreobjetos y se dejó drenar el exceso de solución sobre un papel absorbente.



## 6) Detección visual de los sitios de hibridación

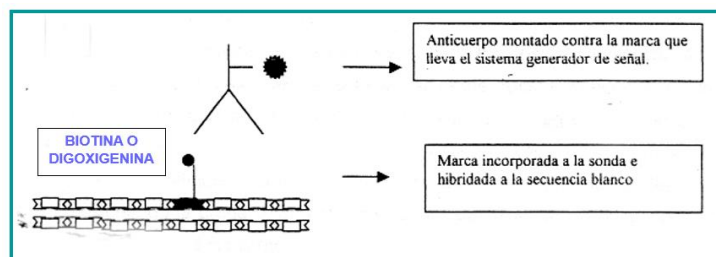
La detección del sitio de hibridación es un paso importante de la ISH que permite la visualización de los híbridos sonda/blanco formados. Los pasos de detección requeridos dependen del nucleótido modificado utilizado para marcar la sonda.

Las técnicas de marcación directa con fluoróforo dUTPs para marcar la sonda, no son inmunológicas para la visualización, ya que la sonda marcada posee el fluorescente incorporado, por lo que a los preparados se les agrega la contratinción y se montan inmediatamente.

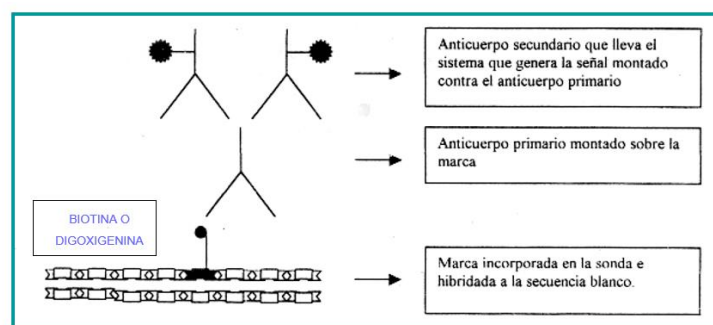
Las sondas marcadas en forma indirecta, son no radioactivas y son inmunológicas, se detectan con anticuerpos que se acoplan sobre la marca. Las sondas marcadas con biotina necesitan detectarse con avidina, streptavidina, avidina adicional o anticuerpos contra la biotina, mientras que las sondas marcadas con digoxigenina necesitarán anti-digoxigenina.

El sistema de detección indirecto consta de 1 o 2 pasos:

- A la marca incorporada a la sonda que se hibridó se le acopla un anticuerpo que lleva el sistema generador de la señal



- A la marca incorporada a la sonda hibridada se le acopla un anticuerpo primario, el cual no lleva la señal y a este se le acopla un anticuerpo secundario, el cual sí genera la señal.



Siendo este método el más sensible y el más utilizado para la hibridación *in situ* de ADN debido a la precisa localización de la señal de hibridación y por tener la ventaja de la detección de múltiples blancos (target) utilizando los diferentes fluoróforos disponibles.

Los siguientes pasos se realizan en totalmente en penumbra u oscuridad, ya que la luz hace que decaigan la fluorescencia.

#### **6.a) Tinción:**

##### Para sondas marcadas con digoxigenina:

- En un tubo tipo “eppendorf” envuelto en papel aluminio, se preparó una solución con BSA 5% (p/v) y antidigoxigenina-FITC (Boehringer Mannheim, Germany): (1:5) (Anexo I).
- Se agregó a cada preparado 50 µl de la misma.
- Se colocó un cubreobjetos de acetato y se colocaron los preparados en una cámara húmeda con 2 x SSC y se incubaron en estufa de hibridación a 37°C durante 1 hora.

##### Para sondas marcadas con biotina:

- En un tubo tipo “eppendorf” envuelto en papel aluminio, se preparó una solución con BSA 5% (p/v) y Streptavidine-CY3 (Sigma) (1:300) (Anexo I).
  - Se agregó a cada preparado 50 µl de la misma.
  - Se colocó un cubreobjetos de acetato y se colocaron los preparados en una cámara húmeda con 2 x SSC y se incubaron en estufa de hibridación a 37°C durante 1 hora.
- En ambos casos, los preparados se lavaron en 4 x SSC/Tween 20 (0,2%) tres veces, 10 minutos cada vez para eliminar exceso de solución.

#### **6.b.) Contratinción:**

Para un mejor reconocimiento del complemento cromosómico de la célula en estudio, se realiza una contra tinción con DAPI o Ioduro de propidio.

En este trabajo se realizó la contratinción con DAPI. Para la observación microscópica se debe seleccionar el filtro adecuado a la longitud de emisión del fluorocromo con que se trabaja.

Todo el procedimiento se realizó en oscuridad o penumbra:

- A cada preparado se agregó 75 µl de DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) de una solución de trabajo de 2 µg/ml (Anexo I).
- Se cubrieron con cubreobjetos de papel de acetato y se incubaron a temperatura ambiente, durante 15 a 20 min, en oscuridad. Este colorante se utilizó como tinción de contraste y además para obtener datos de bandeo DAPI pues tiñe con más intensidad las zonas heterocromáticas ricas en A-T.
- Los preparados se lavaron rápidamente en 4 x SCC/Tween 20 (0,2 %) para eliminar los cubreobjetos y el exceso de DAPI y se dejaron drenar sobre un papel absorbente.
- En cada preparado se agregaron 2 gotas de medio de montaje (Anexo I) y se cubrieron con cubreobjetos de vidrio de 24 x 60 mm.
- El exceso de líquido se eliminó presionando cada preparado suavemente entre papeles absorbente.
- Los preparados se conservaron en oscuridad y en la heladera por aproximadamente 4-5 días, hasta su posterior observación y fotografía.

#### 7) Observación de los preparados.

Los preparados se observaron en un microscopio epifluorescente *Leica DMLB*, con cámara fotográfica digital *DFC350 FX CCD*, con juego de filtros apropiados para la excitación de los diferentes fluorocromos:

Colorante	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FITC	436	520 - 540 (Verde)
Cy3	510 - 560	590 (Rojo)
RODAMINA	545 - 546	570 - 600 (Rojo)
DAPI	365 (UV)	420 - 480 (Azul-Blanco)

Se utilizó un Procesador de imagen software *Leica IM50*, versión 4.0 (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK).

#### Re-hibridaciones

Aquellos preparados que ya tuvieron un tratamiento previo de hibridación pueden ser hibridados nuevamente, y se procedió de la siguiente manera:

- Se individualizaron aquellos preparados que se desearon re-hibridar.

- Se los colocó en un vaso coplin con tres partes de alcohol etílico : 1 parte de ácido acético glacial (3:1).
- Se los dejó toda la noche para que se destiñan y se disuelva el medio de montaje y el pegamento de los cubreobjetos de vidrio.
- Se los lavó con alcohol etanol y se los dejó secar al aire a temperatura ambiente.
- Estos preparados se incorporaron a la reacción de hibridación en el momento en que se realizó la serie de deshidratación prosiguiendo con la técnica desde allí hasta el final.

# RESULTADOS

## Especies diploides, sección *Leptopogon* de *Andropogon*

### Citogenética clásica

#### Características morfológicas generales de los cariotipos

Los números cromosómicos somático, gamético y la fórmula cariotípica propuesta para las especies diploides analizadas en el presente trabajo, se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1: Números cromosómicos y fórmula cariotípica propuesta para las especies diploides de la sección *Leptopogon* analizadas.**

Especie	n	2n	Fórmula cariotípica
<i>A. gyrans</i>	10	20	18 m + 2 sm
<i>A. selloanus</i>	10	20	18 m + 2 sm
<i>A. macrothrix</i>	10	20	18 m + 2 sm

Las características generales de los cariotipos se resumen en la Tabla 2; el diagrama de dispersión de los índices de asimetría  $A_1$  y  $A_2$  se muestra en la Figura 7.

**Tabla 2: Características cromosómicas de las especies diploides de *Andropogon*.** LTC= longitud total del cariotipo; LCM= longitud cromosómica media; IC= índice centromérico;  $A_1$ = índice de asimetría intracromosómica;  $A_2$ = índice de asimetría intercromosómica. Los valores de LTC, LTCH y LCM se expresan en micrones.

Especie	LTC ( $\mu\text{m}$ )	LCM ( $\mu\text{m}$ )	IC ( $\mu\text{m}$ )	$A_1$	$A_2$
<i>A. gyrans</i>	75,24	3,76	45,98	0,14	0,13
<i>A. selloanus</i>	64,25	3,21	44,93	0,17	0,16
<i>A. macrothrix</i>	101,40	5,07	43,56	0,21	0,16

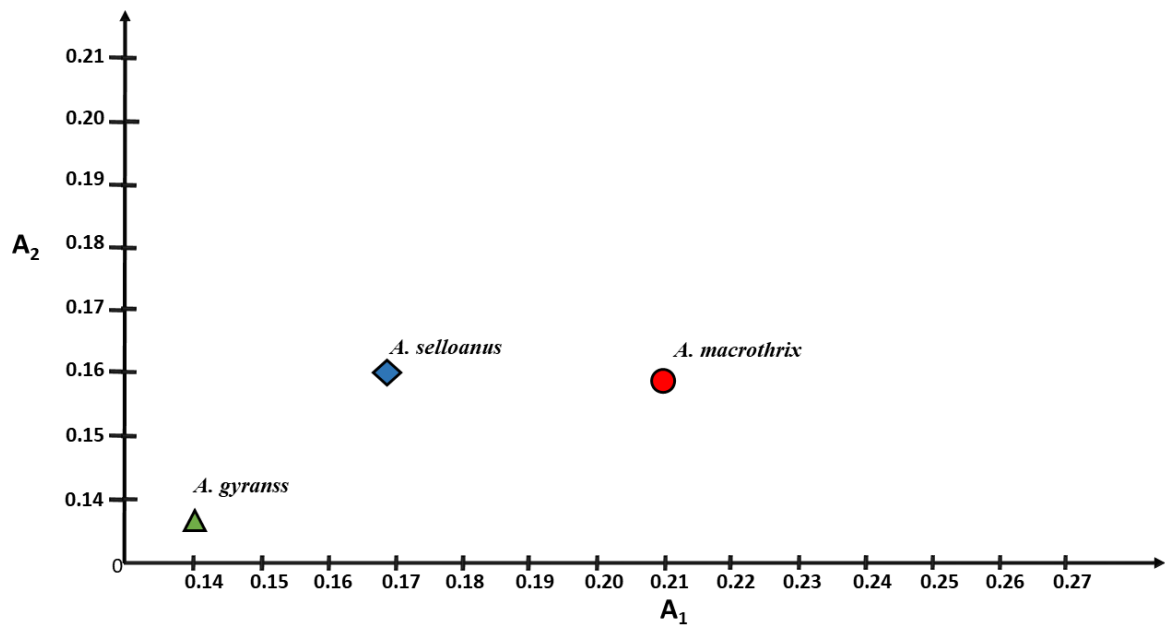


Figura 7: Diagrama de dispersión mostrando la relación entre los Índices de Asimetría intracromosomal ( $A_1$ ) e intercromosomal ( $A_2$ ). Los valores de  $A_1$  y  $A_2$  se resumen en la Tabla 2.

*Andropogon selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans* presentaron 20 cromosomas en todas las células estudiadas. El análisis cromosómico de estas especies, se realizó a partir de metafases mitóticas (Figura 8 A; Figura 9 A y Figura 10 A). Las características cromosómicas de las diferentes especies se describen a continuación:

*Andropogon selloanus*: la longitud de sus cromosomas varía de 2,05  $\mu\text{m}$  a 4,71  $\mu\text{m}$ . Su cariotipo está constituido por 18 cromosomas metacéntricos (*m*) y 2 cromosomas submetacéntricos (*sm*). Se observó la presencia de satélite en el brazo corto de un par de cromosomas metacéntricos (Figura 8 A y B).

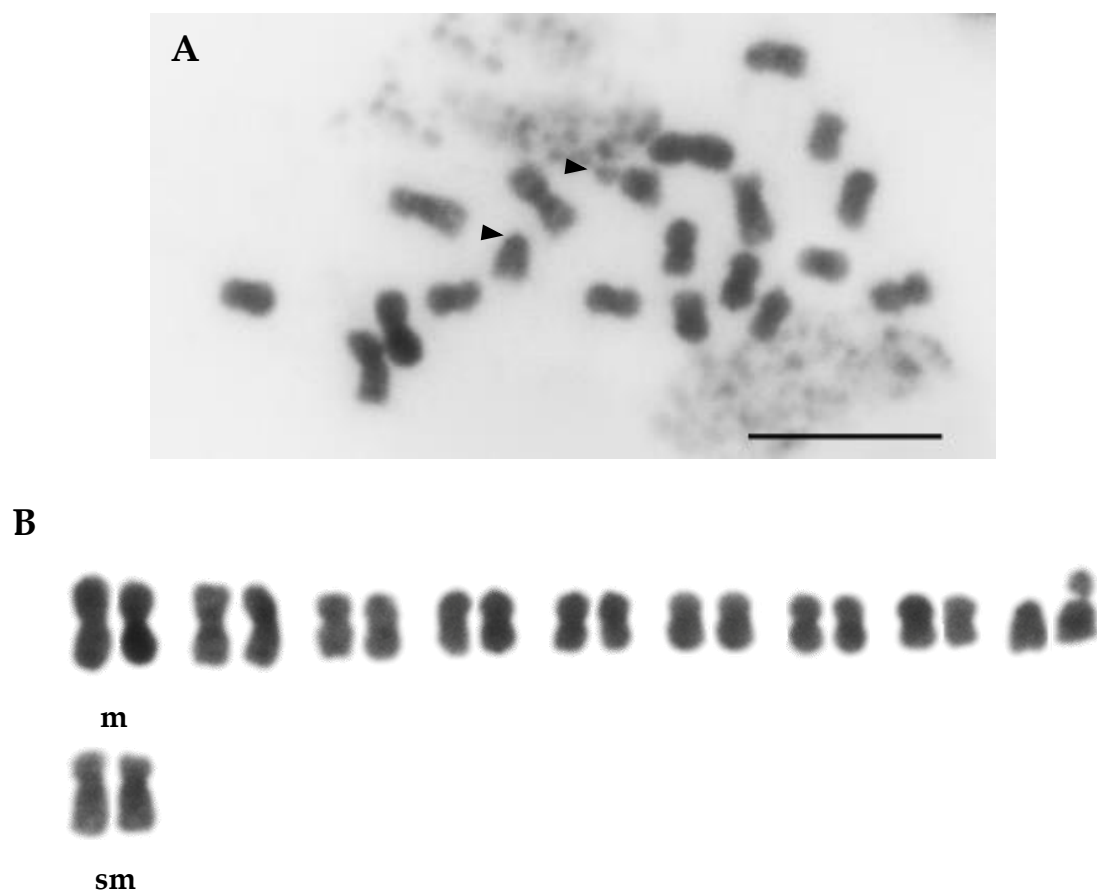
*Andropogon macrothrix*: la longitud de sus cromosomas varía de 3,14  $\mu\text{m}$  a 7,80  $\mu\text{m}$ . Su cariotipo, al igual que la especie anterior, está constituido por 18 cromosomas metacéntricos (*m*) y 2 cromosomas submetacéntricos (*sm*). Se observó la presencia de satélites en el brazo corto de dos cromosomas metacéntricos de diferentes pares cromosómicos (Figura 9 A y B).

*Andropogon gyrans*: la longitud de sus cromosomas varía de 2,89  $\mu\text{m}$  a 4,79  $\mu\text{m}$ . Su cariotipo está constituido por 18 cromosomas metacéntricos (*m*) y 2 cromosomas submetacéntricos (*sm*). Se observó la presencia de satélites en el brazo corto de un par de cromosomas metacéntricos (Figura 10 A y B).

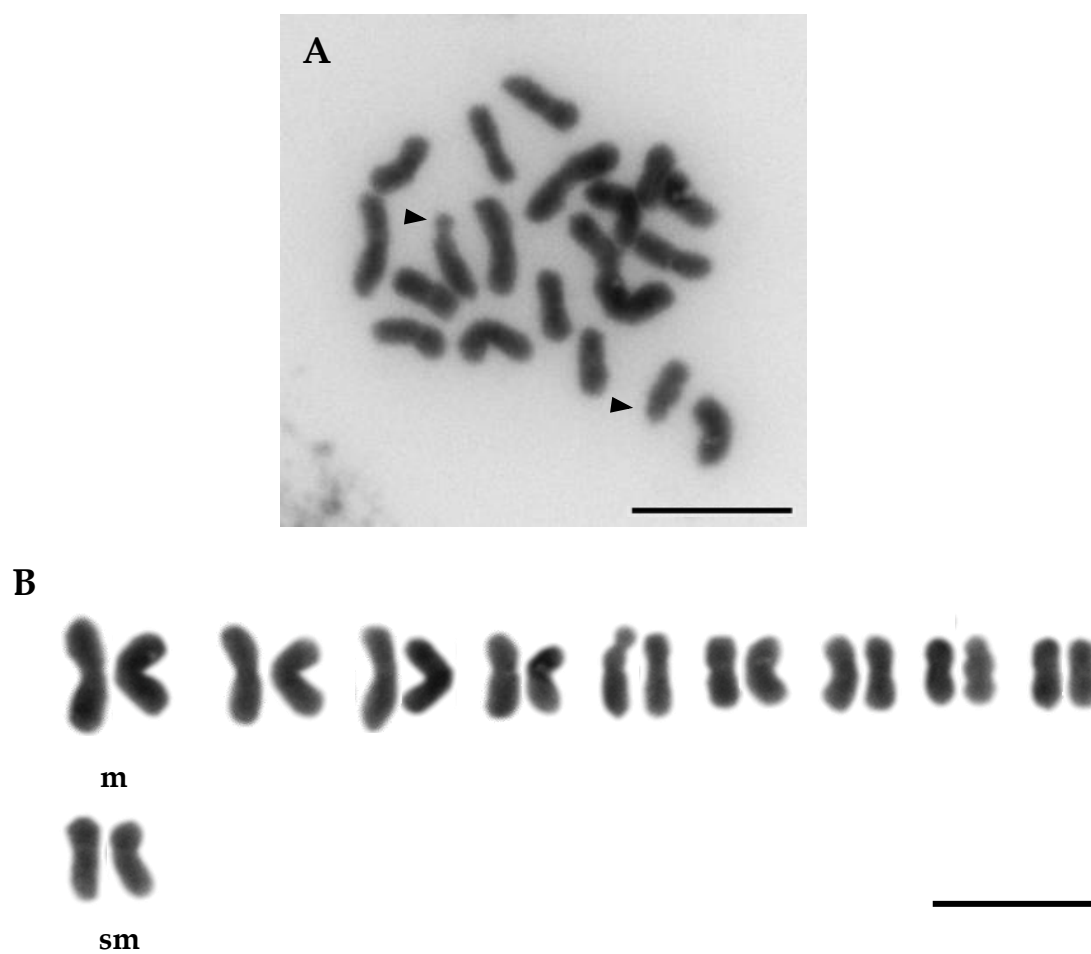
En *A. macrothrix*, los satélites, se observaron de tamaño similar o ligeramente menor al segmento proximal del brazo corto y asociadas al brazo corto en ambos pares. En *A. gyrans*, los satélites observados, de menor tamaño que el segmento proximal del brazo corto, se localizaron en ambos cromosomas homólogos. En todas las células estudiadas de *A. selloanus* y en algunas células de *A. macrothrix*, se observó que uno de los satélites se evidenciaba claramente, ya que se lo observaba separado del brazo corto (Figura 8 A y B), mientras que el satélite del cromosoma homólogo, permanecía retraído sobre su propio brazo cromosómico. Esto se evidenció con brillante señal C+/DAPI (Figura 13 A y B) y CMA+/DAPI- (Figura 20 B y C).

La longitud cromosómica promedio de las especies analizadas varió de 3,21  $\mu\text{m}$  (*A. selloanus*), 3,76 (*A. gyrans*) y 5,7 (*A. macrothrix*), y la longitud total del complemento haploide varió de 32,12  $\mu\text{m}$  (*A. selloanus*), 37,62  $\mu\text{m}$  (*A. gyrans*) y 50,7 (*A. macrothrix*) (Tabla 2). El índice de asimetría intracromosómica ( $A_1$ ) varió de 0,14 (*A. gyrans*) a 0, 21 (*A. macrothrix*) mientras que el índice intercromosómico ( $A_2$ ) varió de 0,13 (*A. gyrans*) a 0,16 (*A. macrothrix*), siendo muy simétricos los tres cariotipos (Figuras 8, 9 y 10 B).

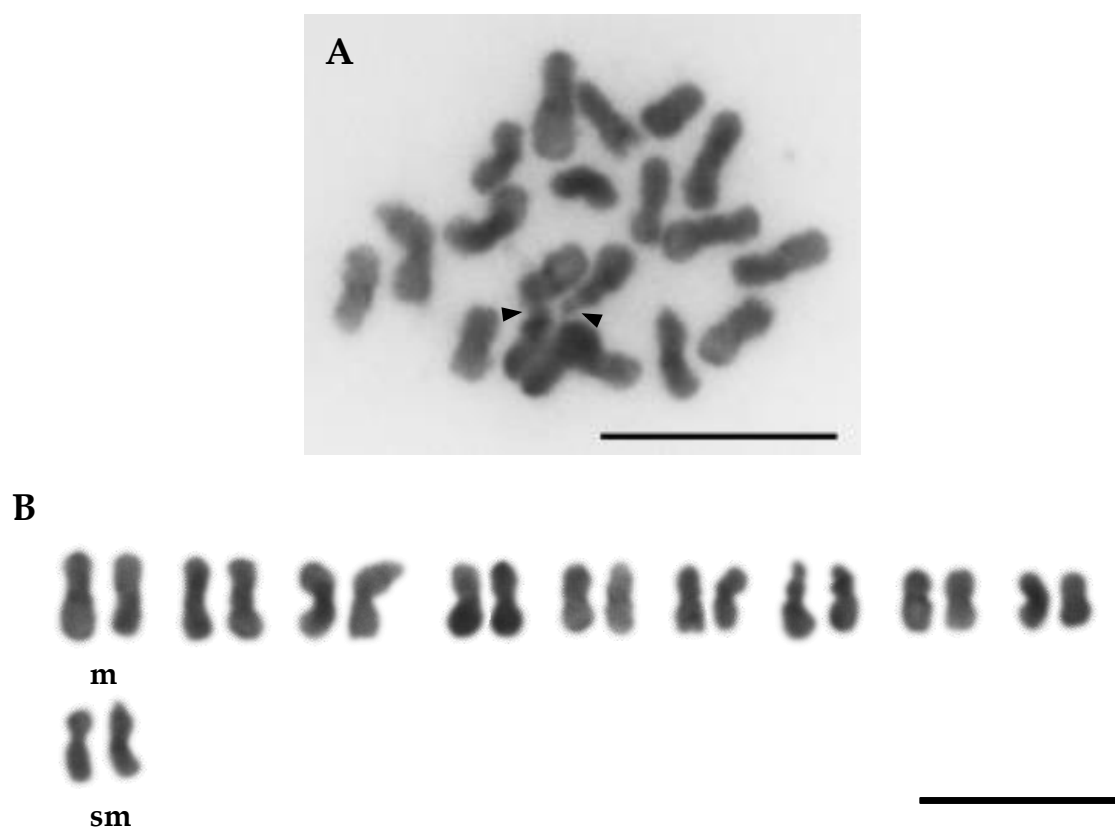




**Figura 8: *Andropogon selloanus*.** A. Cromosomas mitóticos. Las cabezas de flechas señalan los satélites. B. Cariotipo. Barra: 10  $\mu$ m



**Figura 9: *Andropogon macrothrix* A.** Cromosomas mitóticos. Las cabezas de flechas señalan los satélites. **B.** Cariotipo. Barra: 10  $\mu$ m.



**Figura 10: *Andropogon gyrans*. A.** Cromosomas mitóticos. Las cabezas de flechas señalan los satélites. **B.** Cariotipo. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

En el presente trabajo se confirman los números cromosómicos somáticos de las especies diploides *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans*, pertenecientes a la Sección *Leptopogon* Stapf. cuyos primeros recuentos cromosómicos reportados figuran en la Tabla 3:

**Tabla 3: Recuentos cromosómicos de las especies diploides analizadas.**

<b>Especie</b>	<b>2n</b>	<b>Sección</b>	<b>Recuentos</b>
<i>A. selloanus</i>	20	<i>Leptopogon</i> Stapf	Gould (1956) Davidse & Pohl (1974) Hidalgo et al. (2019)
<i>A. macrothrix</i>	20	<i>Leptopogon</i> Stapf	Norrmann (1985) Hidalgo et al. (2019)
<i>A. gyrans</i>	20	<i>Leptopogon</i> Stapf	Gould (1956, 1967) Hidalgo et al. (2019)

### Estudio de las regiones heterocromáticas

En la Tabla 4, se resume el número y posición de las bandas heterocromáticas C-DAPI y DAPI/CMA<sub>3</sub>.

En la Figura 11 se esquematiza la localización posible de las bandas de heterocromatina C+ y DAPI / CMA<sub>3</sub> en un cromosoma eucariota.

Para describir la posición de las regiones heterocromaticas se utilizó la nomenclatura de Gill & Kimber (1974).

### Distribución de la heterocromatina constitutiva mediante la técnica de Bando C, tinción con DAPI.

En la Figura 12 se resumen los diferentes tipos de patrones de distribución de la heterocromatina C/DAPI observados.

La técnica de bando cromosómico C, mostró que *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans* presentaron bandas C/DAPI en todos los cromosomas del complemento (Figuras 13, 15 y 17 A).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden establecer cinco patrones diferentes de distribución de la heterocromatina constitutiva (HC) C/DAPI, alguno de los cuales presenta alguna variación dentro del mismo patrón (Figura 12).

**Tipo I:** heterocromatina constitutiva en posición centromérica C/DAPI (**IA**); HC en posición pericentromérica C/DAPI con aspecto de puntos (**IB**).

**Tipo II:** heterocromatina constitutiva en posición pericentromérica con aspecto de puntos y banda en posición terminal en un brazo cromosómico C/DAPI (**IIA**); HC en posición centromérica y banda en posición terminal en un brazo C/DAPI (**IIB**).

**Tipo III:** heterocromatina constitutiva en posición centromérica y banda en posición terminal C/DAPI en ambos brazos cromosómicos.

**Tipo IV:** heterocromatina constitutiva en posición centromérica y banda en posición intersticial C/DAPI en un brazo cromosómico.

**Tipo V:** heterocromatina constitutiva en posición centromérica, banda en posición intersticial con aspecto de puntos en un brazo y banda en posición terminal con aspecto de puntos en otro brazo C/DAPI.

De acuerdo con la descripción de cada patrón de distribución obtenido, la mayoría de los cromosomas del complemento de las tres especies diploides analizadas, presenta el patrón del Tipo IA, observándose en 7 pares de cromosomas en *A. selloanus* y *A.*

*macrothrix* y en 9 pares en *A. gyrans*. Estas bandas, en general, son conspicuas, fuertemente brillantes, algunas con forma de bandas propiamente dichas, y otras con aspecto de “puntos”.

Además, *A. selloanus*, presenta el patrón de Tipo IB, el cual se observó en un par de cromosomas, donde la posición de la heterocromatina se encuentra en la región pericentromérica de los cromosomas, donde se presenta con aspecto de puntos por encima de la constricción primaria y como una delgada banda por debajo de dicha constricción; otro patrón observado fue el Tipo III en dos pares de cromosomas. En este caso, las bandas terminales tienen menor intensidad que las pericentroméricas y en un cromosoma es puntiforme, mientras que en los otros tiene forma de banda propiamente dicha (Figura 13 B; Figura 14).

En *A. macrothrix*, además del patrón Tipo IA, se observó un patrón de distribución de la HC de Tipo IIA en un par de cromosomas, donde, como en *A. selloanus*, la posición de la heterocromatina es pericentromérica, presentándose con aspecto de puntos por encima de la constricción primaria y como una delgada banda por debajo de dicha constricción; el patrón Tipo IIB en un par de cromosomas y el Tipo V en un par de cromosomas, donde la heterocromatina de la región centromérica tiene fuerte intensidad y forma de banda propiamente dicha y la heterocromatina en posición intersticial es puntiforme (Figura 15 B; Figura 16)

*Andropogon gyrans*, además del patrón de distribución de la heterocromatina Tipo IA, presenta el patrón Tipo IV en un par de cromosomas, con heterocromatina de posición centromérica e intersticial puntiforme (Figura 17 B; Figura 18).

En todas las especies analizadas, los satélites se evidenciaron a través de brillantes señales heterocromáticas C+ (Figura 13, 15 y 17 A).

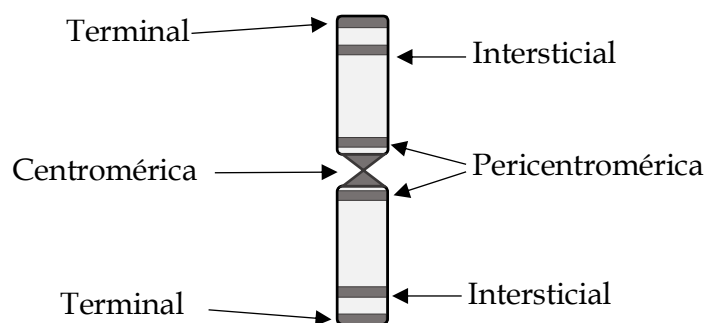
El tamaño promedio de las bandas de heterocromatina constitutiva de la región centromérica varía de 0,60  $\mu\text{m}$  – 1,75  $\mu\text{m}$  en *A. selloanus*; de 0,72  $\mu\text{m}$  – 1,52  $\mu\text{m}$  en *A. macrothrix*; de 0,46  $\mu\text{m}$  – 1,02  $\mu\text{m}$  en *A. gyrans*, siendo que el tamaño de la banda de heterocromatina constitutiva de la región telomérica varía de 0,64  $\mu\text{m}$  – 0,71  $\mu\text{m}$  en *A. selloanus* y 0,34  $\mu\text{m}$  – 0,70  $\mu\text{m}$  en *A. macrothrix*; el tamaño de la banda de heterocromatina constitutiva de la región pericentromérica es de 0,35  $\mu\text{m}$  en *A. selloanus* y 0,34  $\mu\text{m}$  en *A. macrothrix*; el tamaño de la banda de heterocromatina

constitutiva de la región intersticial fue conservado en *A. macrothrix* y *A. gyrans*, siendo las mismas de 0,40  $\mu\text{m}$  - 0,51  $\mu\text{m}$ .

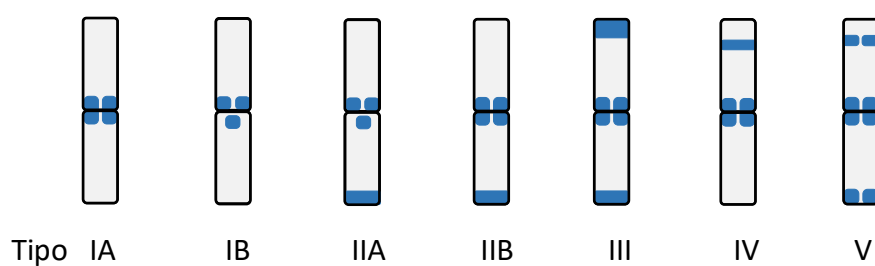
La cantidad total de heterocromatina constitutiva C/DAPI varió desde 16,19% (*A. gyrans*); 24,23% (*A. macrothrix*); 26,25 % (*A. selloanus*), con respecto a la longitud total del complemento cromosómico. En cada una de las especies analizadas, el tamaño promedio de las bandas de la región centromérica fue de 1,11  $\mu\text{m}$ , siendo este un valor constante entre las tres especies; el valor promedio del tamaño de las bandas de la región telomérica, fue ligeramente mayor en *A. selloanus* (0,68  $\mu\text{m}$ ) con respecto a *A. macrothrix* (0,55  $\mu\text{m}$ ) y el tamaño promedio de las bandas intersticiales fue muy conservado en *A. gyrans* (0,48  $\mu\text{m}$ ) y *A. macrothrix* (0,44  $\mu\text{m}$ ).

**Tabla 4: Número y posición de bandas heterocromáticas C/DAPI y DAPI/CMA<sub>3</sub>. Abreviaturas: NB: número de bandas heterocromáticas; Ce: centromérica; Per: pericentromérica; Int: intersticial; Ter: terminal; Br Het: brazo heterocromático; Crom Het: cromosoma heterocromático.**

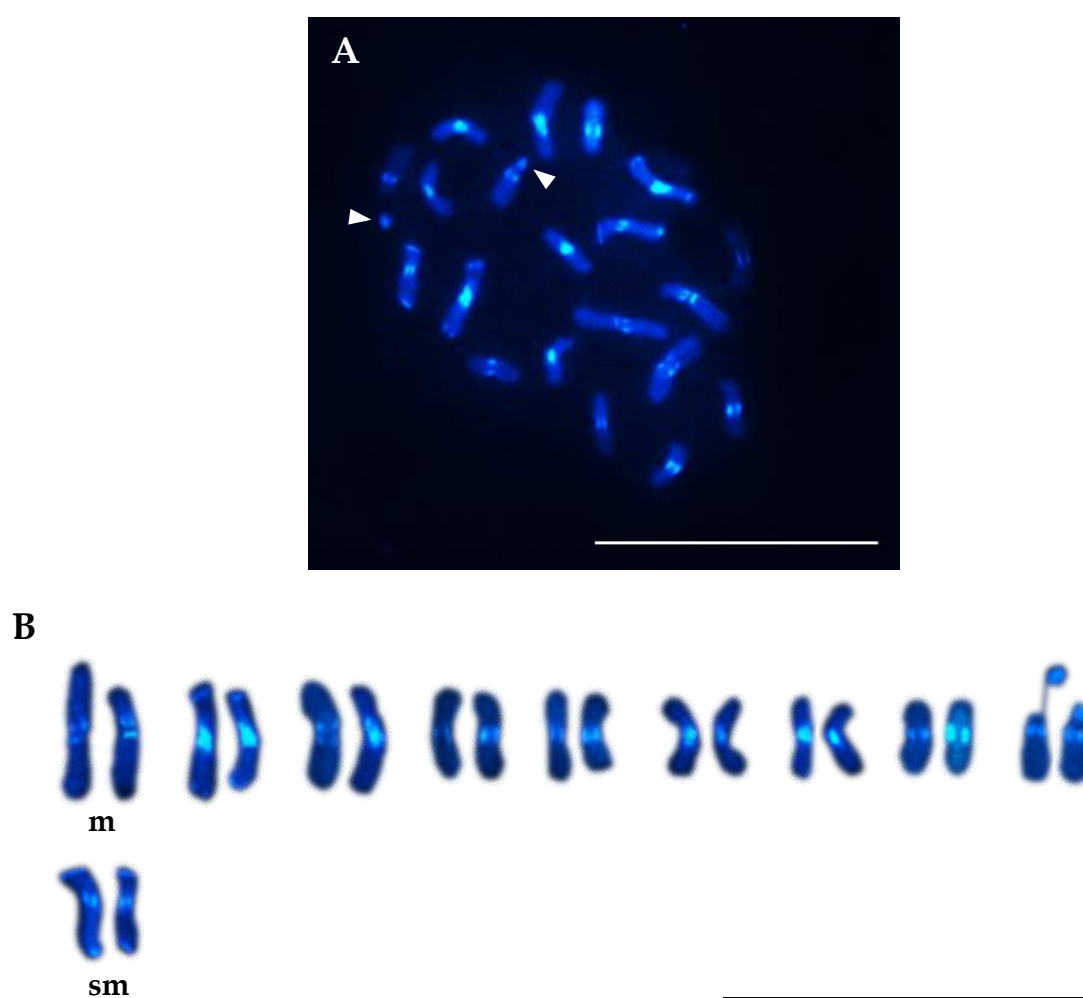
Especie		Heterocromatina C+/DAPI					Heterocromatina DAPI/CMA <sub>3</sub>					
	2n	NB Ce	NB Per	NB Int	NB Ter	%	NB Pe	NB Per	NB Int	NB Ter	Br Het	Crom Het
<i>A. gyrans</i>	20	20	---	2	---	16.19	20	---	---	12	2	---
<i>A. selloanus</i>	20	18	4	---	8	26.25	20	---	---	4	8	2
<i>A. macrothrix</i>	20	18	4	2	6	24.23	8	---	---	12	2	---



**Figura 11: Localización posible de las bandas de heterocromatina C+ y DAPI/CMA<sub>3</sub> en un esquema que representa a un cromosoma eucariota.**

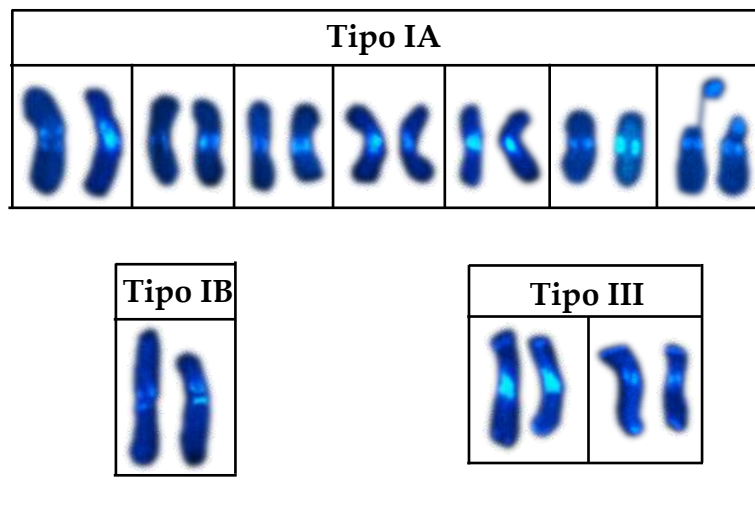


**Figura 12:** Patrones de distribución de la heterocromatina constitutiva C/DAPI en las especies diploides de *Andropogon*, de acuerdo con la posición de las bandas.

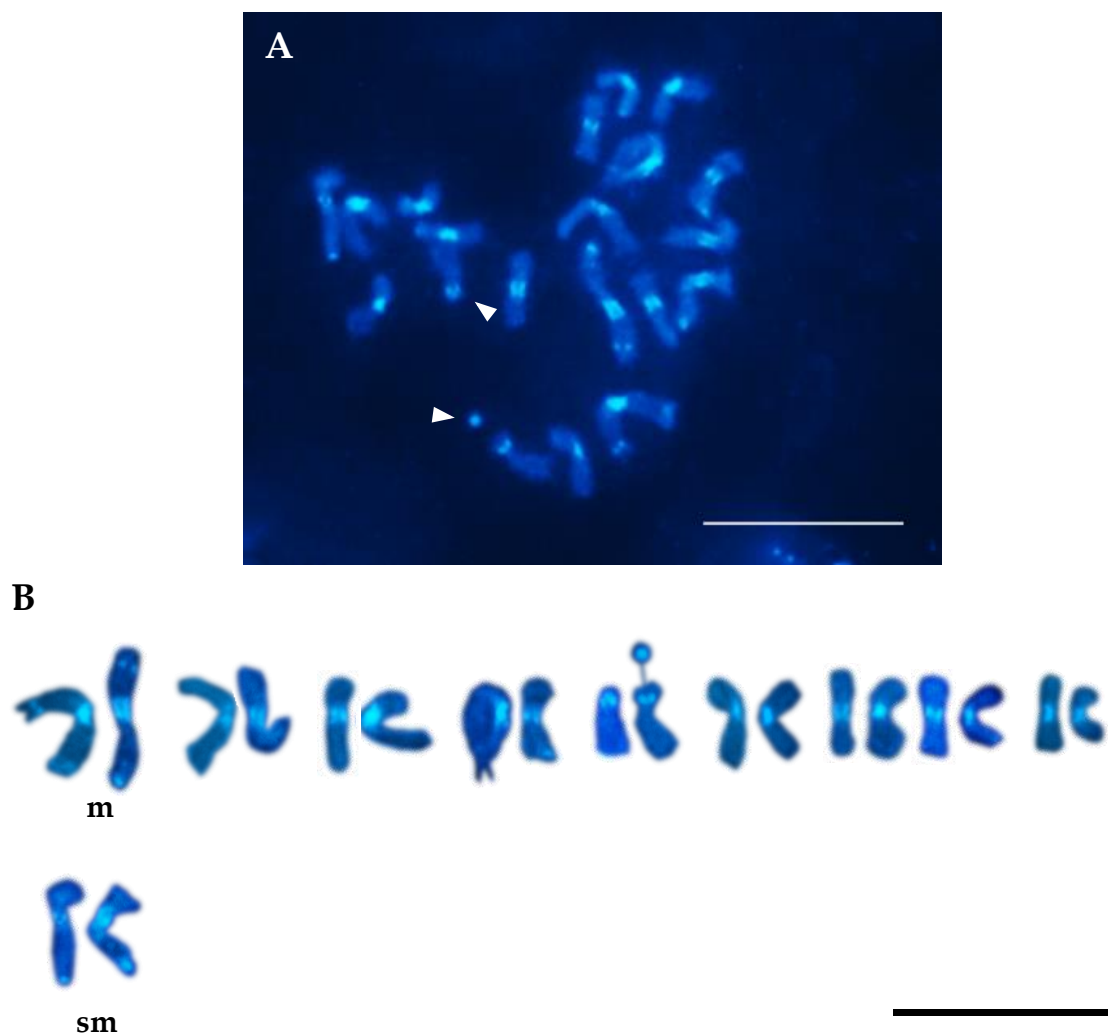


**Figura 13:** Distribución de la heterocromatina constitutiva por medio de Bandeo C/DAPI: **A.** Cromosomas mitóticos de *A. selloanus*. Las cabezas de flechas indican satélites. **B.** Cariograma de bandas C/DAPI. Barra: 10 µm.





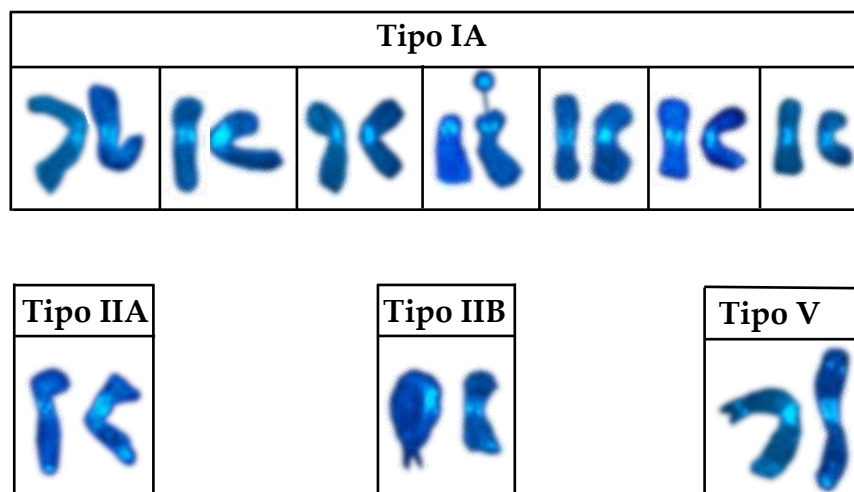
**Figura 14: Cromosomas de *A. selloanus* mostrando los diferentes patrones de distribución de la heterocromatina constitutiva, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, IB y III.**  
Barra 10  $\mu\text{m}$ .



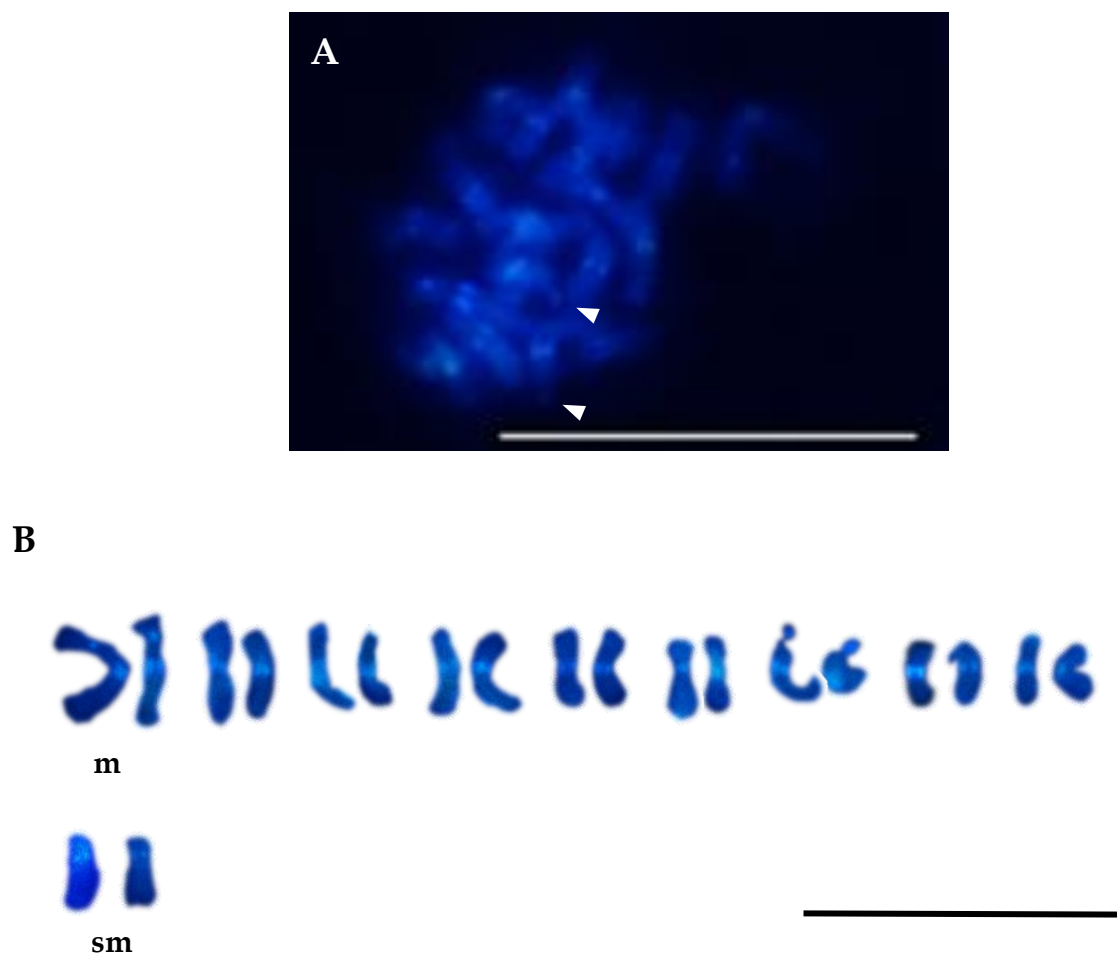
**Figura 15: Distribución de la heterocromatina constitutiva por medio de Bando C/DAPI:**

**A.** Cromosomas mitóticos de *A. macrothrix*. Las cabezas de flechas señalan satélites.

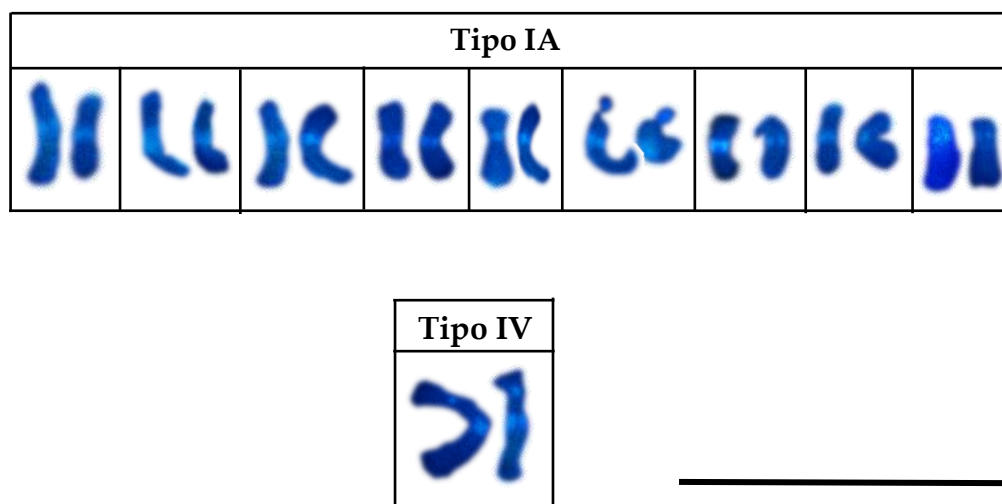
**B.** Cariograma de bandas C+/DAPI. Barra: 10  $\mu$ m.



**Figura 16:** Cromosomas de *A. macrothrix* mostrando los diferentes patrones de distribución de la heterocromatina constitutiva, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, IIA, IIB y V. Barra 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 17: Distribución de la heterocromatina constitutiva por medio de Bandeo C/DAPI:**  
**A.** Cromosomas mitóticos de *A. gyrans*. Las cabezas de flechas señalan satélites. **B.** Cariograma de bandas C/DAPI. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18: Cromosomas de *A. gyrans* mostrando los diferentes patrones de distribución de la heterocromatina constitutiva, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA y IV. Barra 10  $\mu\text{m}$ .**

### **Distribución de la composición de la heterocromatina mediante la técnica de Bando CMA<sub>3</sub> / DAPI.**

En la Figura 19, se resumen los diferentes tipos de patrones de distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub>/DAPI observados.

Los complementos cromosómicos de las especies diploides analizadas, mostraron diferentes patrones de distribución de la composición de la heterocromatina en cuanto a número, composición y localización de las bandas. Estos patrones son consistentes entre las células de cada individuo, siendo cada cariotipo, homomórfico para cada patrón.

Para simplificar la descripción y la comparación de los cariotipos, se establecieron 7 tipos diferentes de patrones de organización de las regiones heterocromáticas, algunos de los cuales presenta alguna variante:

**Tipo I:** heterocromatina en posición centromérica CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (**IA**); heterocromatina en posición centromérica DAPI+/CMA<sub>3</sub>- (**IB**).

**Tipo II:** heterocromatina en posición centromérica DAPI+/CMA<sub>3</sub>- y heterocromatina en posición terminal CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ en un brazo cromosómico (**IIA**); heterocromatina en posición centromérica y en posición terminal en un brazo cromosómico CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (**IIB**); heterocromatina en posición centromérica DAPI+/CMA<sub>3</sub>- y heterocromatina en posición terminal CMA<sub>3</sub>+/DAPI- en un brazo cromosómico (**IIC**).

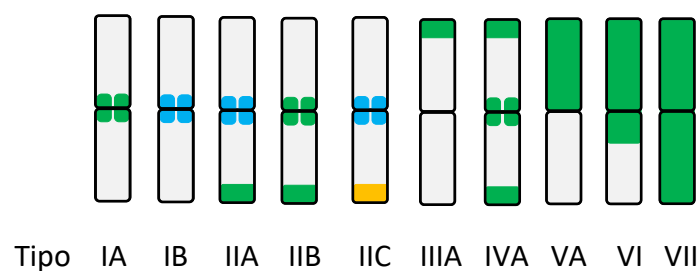
**Tipo III:** heterocromatina en posición terminal CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (**IIIA**).

**Tipo IV:** heterocromatina centromérica y en posición terminal en ambos brazos cromosómicos CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (**IVA**).

**Tipo V:** brazo cromosómico con bloque heterocromático CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (**VA**).

**Tipo VI:** brazo cromosómico con bloque heterocromático extendiéndose a la región pericentromérica del otro brazo CMA<sub>3</sub>+/DAPI+.

**Tipo VII:** ambos brazos con bloque heterocromático CMA<sub>3</sub>+/DAPI+.



**Figura 19: Patrón de distribución de la heterocromatina en las especies diploides de *Andropogon*, de acuerdo con la posición de las bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI. Referencias: DAPI+/CMA<sub>3</sub>- (celeste); CMA<sub>3</sub>+/DAPI- (anaranjado); CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (verde).**

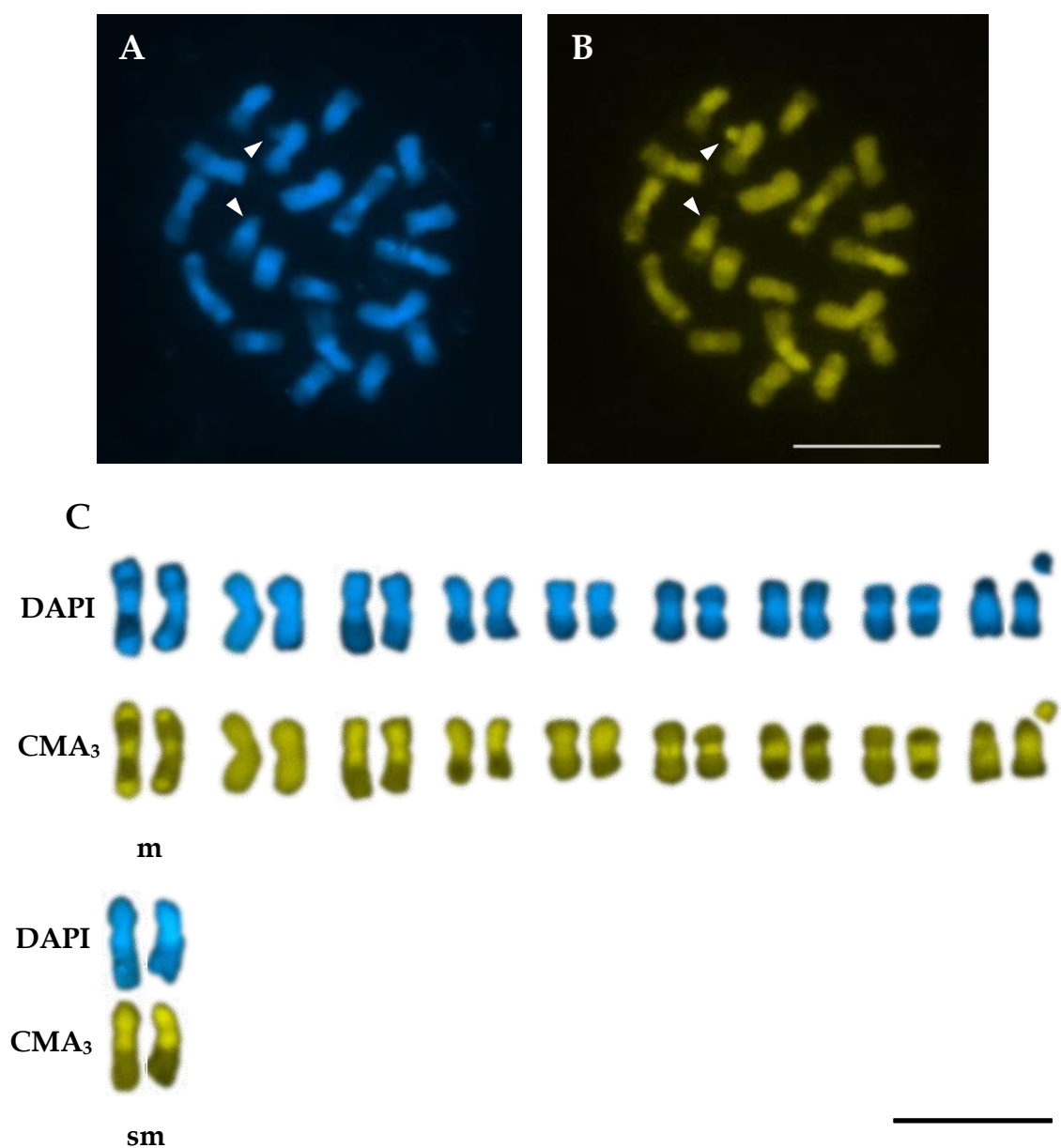
En el cariotipo de *A. selloanus*, se observaron los siguientes patrones de composición de la heterocromatina: el patrón Tipo IA, está presente en cuatro pares de cromosomas, en los cuales las bandas de heterocromatina de posición centromérica, tienen un tamaño constante en tres de ellos, las cuales se observaron con mucha nitidez e intensidad. En el par de cromosomas que lleva el satélite, estas bandas son de mayor tamaño, y se proyectan hacia la región pericentromérica del cromosoma; el satélite manifestó fluorescencia diferencial en un segmento heterocromático CMA<sub>3</sub>+ /DAPI-, con fuerte intensidad y brillo, localizado en la porción terminal del brazo corto del par metacéntrico. El par cromosómico 1, es el único par que presenta el patrón Tipo IVA, donde en uno de los cromosomas la banda de heterocromatina centromérica DAPI+ se observa de mayor tamaño que la banda CMA<sub>3</sub>+ correspondiente, lo cual podría deberse a la intensa fluorescencia de la banda DAPI+ en aquellos cromosomas; en este par de cromosomas, la heterocromatina de la región terminal es bien nítida. En los pares de cromosomas metacéntricos y en el par submetacéntrico, se observó el patrón Tipo VI, siendo que, en todos estos cromosomas, el brazo heterocromático es el brazo corto y la posición centromérica se proyecta hacia la región pericentromérica del brazo largo. El par dos presenta el patrón Tipo VII donde ambos brazos son heterocromáticos CMA<sub>3</sub>+ /DAPI+ (Figura 20 A, B y C; Figura 21).

El cariotipo de *A. macrothrix*, se observó que el par de cromosomas submetacéntricos no presenta bandas heterocromáticas. El patrón de distribución de la heterocromatina de Tipo IA, se observó en un par de cromosomas donde las bandas centroméricas se observaron nítidamente. En el par 1 y en el par 6, se observó el patrón Tipo IIB. En estos cromosomas, el tamaño de las bandas centroméricas se mantuvo constante en ambos pares; las bandas terminales puntiformes y de menor tamaño también fueron similares en ambos pares. En los pares 2 y 9, se observó el patrón Tipo IIIA, con banda de heterocromatina en posición terminal, puntiforme, y de mayor tamaño en el par 2. En el par de cromosomas con patrón Tipo V, el brazo heterocromático es el brazo corto en ambos cromosomas. En el cromosoma que lleva el satélite y su homólogo, no se observaron bandas heterocromáticas, sin embargo, se observó una intensa fluorescencia diferencial en el segmento heterocromático CMA<sub>3</sub>+,

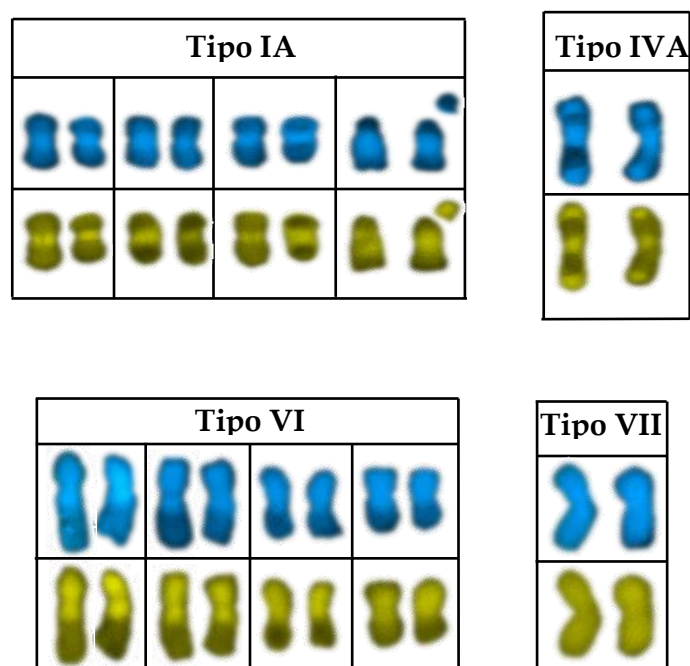


localizado en la porción terminal del brazo corto, correspondiéndose con el satélite (Figura 22 A, B y C; Figura 23).

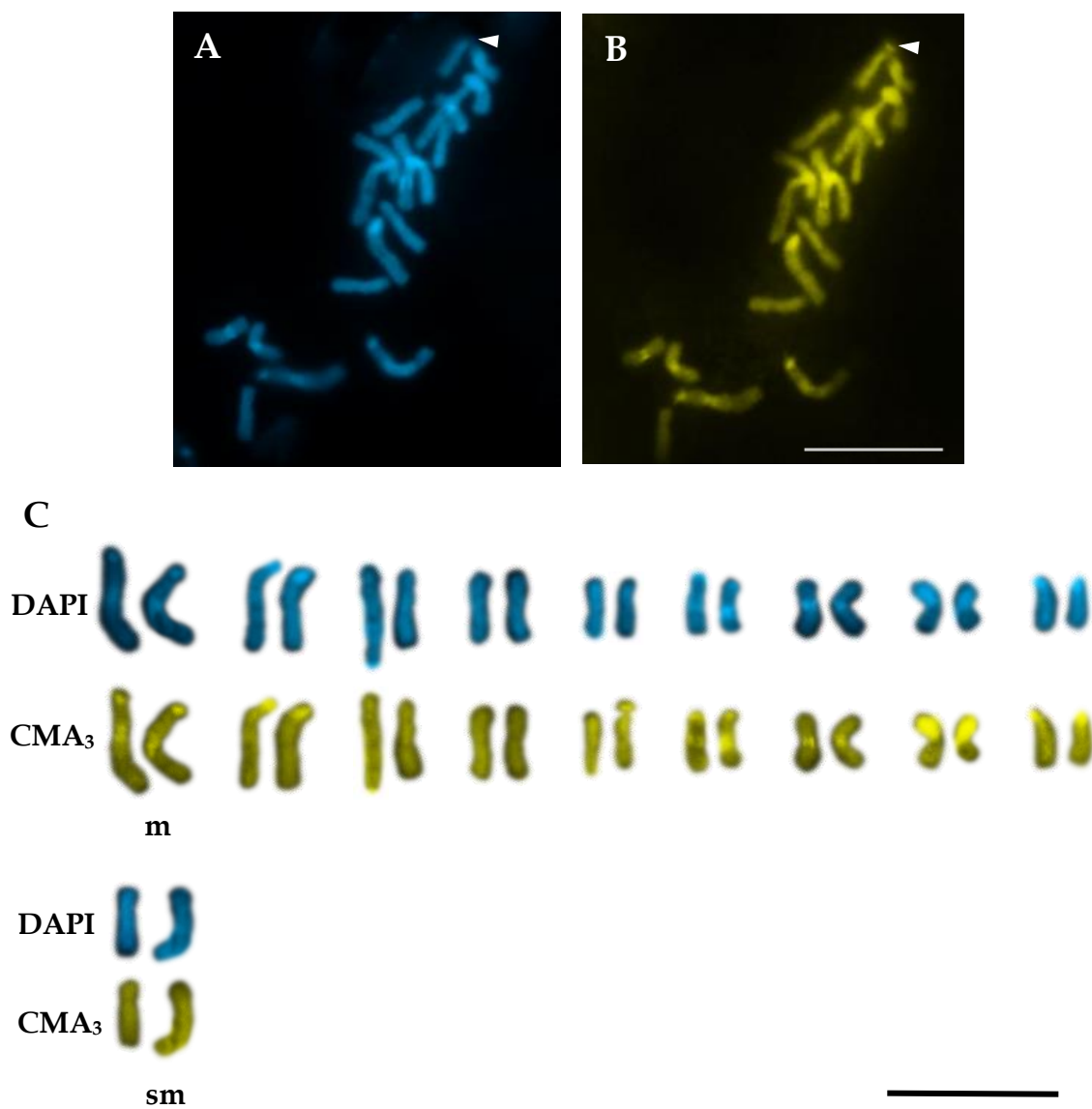
En el cariotipo de *A. gyrans*, la mayoría de los cromosomas del complemento, tienen heterocromatina de posición centroméricas DAPI+, con forma de bandas, de mayor tamaño que las terminales siendo constante en los cromosomas, en cambio, la heterocromatina de posición terminal, puntiformes, son pequeñas y de tamaño constante en los cromosomas. Tres pares de cromosomas metacéntricos y el par submetacéntrico, presentan un patrón de composición de la heterocromatina Tipo IB. En los pares 2 y 9, se observó un patrón Tipo IIA, con bandas de heterocromatina terminal intensas y brillantes. Dos pares con patrón Tipo IIC, mostraron intensas bandas centroméricas y terminales, a excepción de uno de los cromosomas, cuya banda terminal es de muy débil intensidad. El par de cromosomas con satélite, presentó un patrón Tipo V, donde el brazo heterocromático es el brazo corto el cual lleva el satélite. Se observó fluorescencia diferencial en el segmento heterocromático CMA<sub>3</sub>+, brillante, localizado en el brazo corto del cromosoma, correspondiéndose con el satélite (Figura 24 A, B y C; Figura 25).



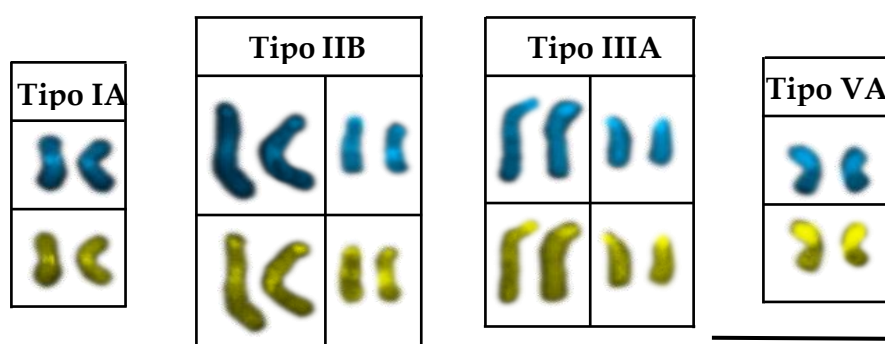
**Figura 20: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI. Bandas heterocromáticas en cromosomas mitóticos de *A. selloanus*. A. Tinción DAPI. B. Tinción CMA<sub>3</sub>. Las cabezas de flechas indican satélites CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. C. Cariograma de bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI. Barra: 10 µm.**



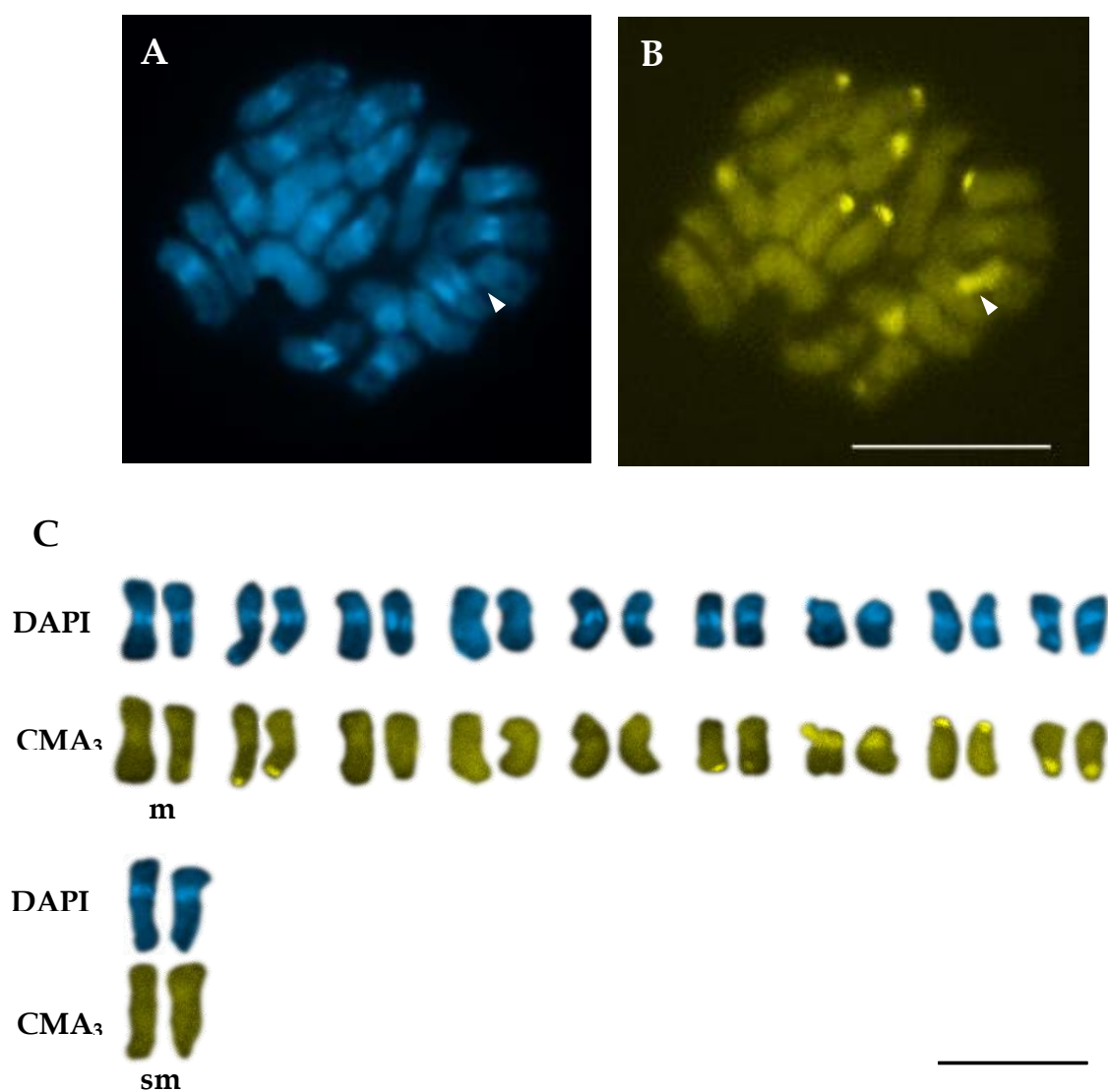
**Figura 21:** Cromosomas de *A. selloanus* mostrando los diferentes patrones de distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, IVA, VI y VII. Barra 10  $\mu$ m.



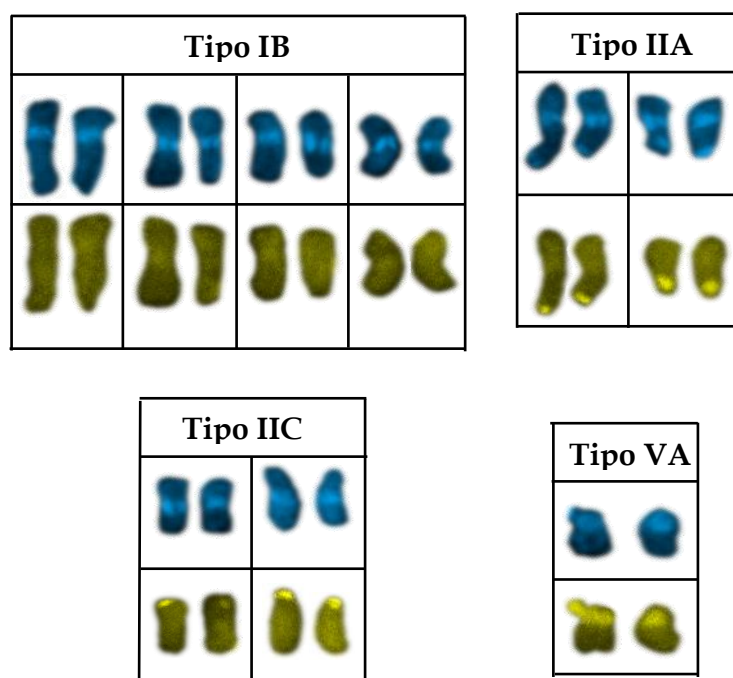
**Figura 22: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI. Bandas heterocromáticas en cromosomas mitóticos de *A. macrothrix*. A. Tinción DAPI. B. Tinción CMA<sub>3</sub>. Las cabezas de flechas indican satélites CMA<sub>3</sub>+ / DAPI-. C. Cariograma de bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI. Barra: 10 µm.**



**Figura 23:** Cromosomas de *A. macrothrix* mostrando los diferentes patrones de distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub>/ DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, IIB, IIIA y VA. Barra: 10 µm.



**Figura 24: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI. Bandas heterocromáticas en cromosomas mitóticos de *A. gyrans*. A. Tinción DAPI. B. Tinción CMA<sub>3</sub>. La cabeza de flecha indica el satélite CMA<sub>3</sub>+/DAPI-. C. Cariograma de bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI. Barra: 10  $\mu$ m.**



**Figura 25:** Cromosomas de *A. gyrans* mostrando los diferentes patrones de distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IB, IIA, IIC y VA. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

## Especies tetraploide y hexaploides

### Citogenética Clásica

#### Características morfológicas generales de los cariotipos

Los números cromosómicos somáticos y la fórmula cariotípica propuesta para las especies pertenecientes a la Sección *Notosolen* analizadas en el presente trabajo, se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5: Números cromosómicos y fórmula cariotípica propuesta de las especies de la sección *Notosolen* estudiadas en el presente trabajo.**

Especie	n	2n	Fórmula cariotípica
<i>A. gayanus</i>	20	40	40 m + Bs (0-2)
<i>A. barretoii</i>	30	60	52 m + 6 sm + 2 t + Bs (2-6)
<i>A. exaratus</i>	30	60	56 m + 4 sm + Bs (2-4)
<i>A. glaucophyllus</i>	30	60	54 m + 6 t

Las características generales de los cariotipos se resumen en la Tabla 6; el diagrama de dispersión de los índices de asimetría  $A_1$  y  $A_2$  se muestra en la Figura 26.

**Tabla 6: Características cromosómicas de las especies de *Andropogon*.** LTC: longitud total del cariotipo, LTCH: longitud total del complemento haploide, LCM: longitud cromosómica media, IC: índice centromérico,  $A_1$ : índice de asimetría intracromosómica,  $A_2$ : índice de asimetría intercromosómica. Los valores de LTC, LTCH y LCM se expresan en  $\mu\text{m}$ .

Especie	LTC	LTCH	LCM	IC	$A_1$	$A_2$
<i>A. gayanus</i>	173,46	43,36	4,33	45,00	0,17	0,03
<i>A. barretoii</i>	318,50	53,08	5,30	45,00	0,17	0,23
<i>A. exaratus</i>	260,72	43,45	4,35	45,70	0,19	0,25
<i>A. glaucophyllus</i>	175,86	29,31	2,93	44,85	0,16	0,21



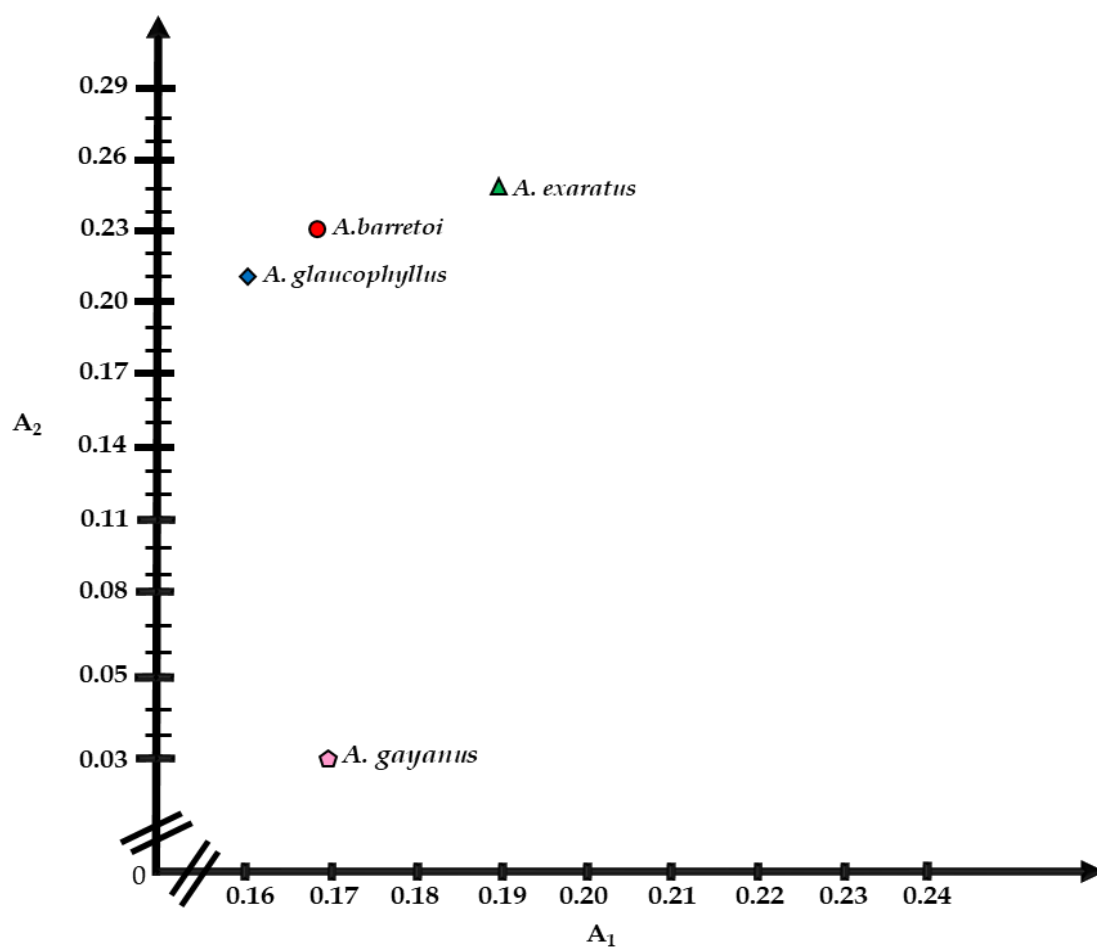


Figura 26: Diagrama de dispersión de los índices de asimetría  $A_1$  y  $A_2$  de Romero Zarco (1986).

*Andropogon gyanus* presenta un cariotipo de 40 cromosomas, *A. barretoj*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* presentaron un cariotipo 60 cromosomas en todas las células estudiadas. En todas las especies se observaron cromosomas Bs, con excepción de *A. glaucophyllus*. Los estudios cromosómicos de estas especies, se realizaron a partir del análisis de metafases mitóticas (Figuras 27, 28, 29 y 30 A).

Las características cromosómicas de las diferentes especies se describen a continuación.

El complemento cromosómico de *A. gyanus*, está constituido por cromosomas metacéntricos, de los cuales un par contiene satélites de mayor tamaño y un par con satélites de tamaño menor, en ambos casos los satélites se observaron localizados en brazos cortos (Figura 27 B). En algunas células estudiadas se observó la presencia de hasta 2 cromosomas B, los cuales se diferencian del complemento cromosómico por su morfología y tamaño. Para esta especie, se propone la fórmula cariotípica: 40 m + cromosomas Bs.

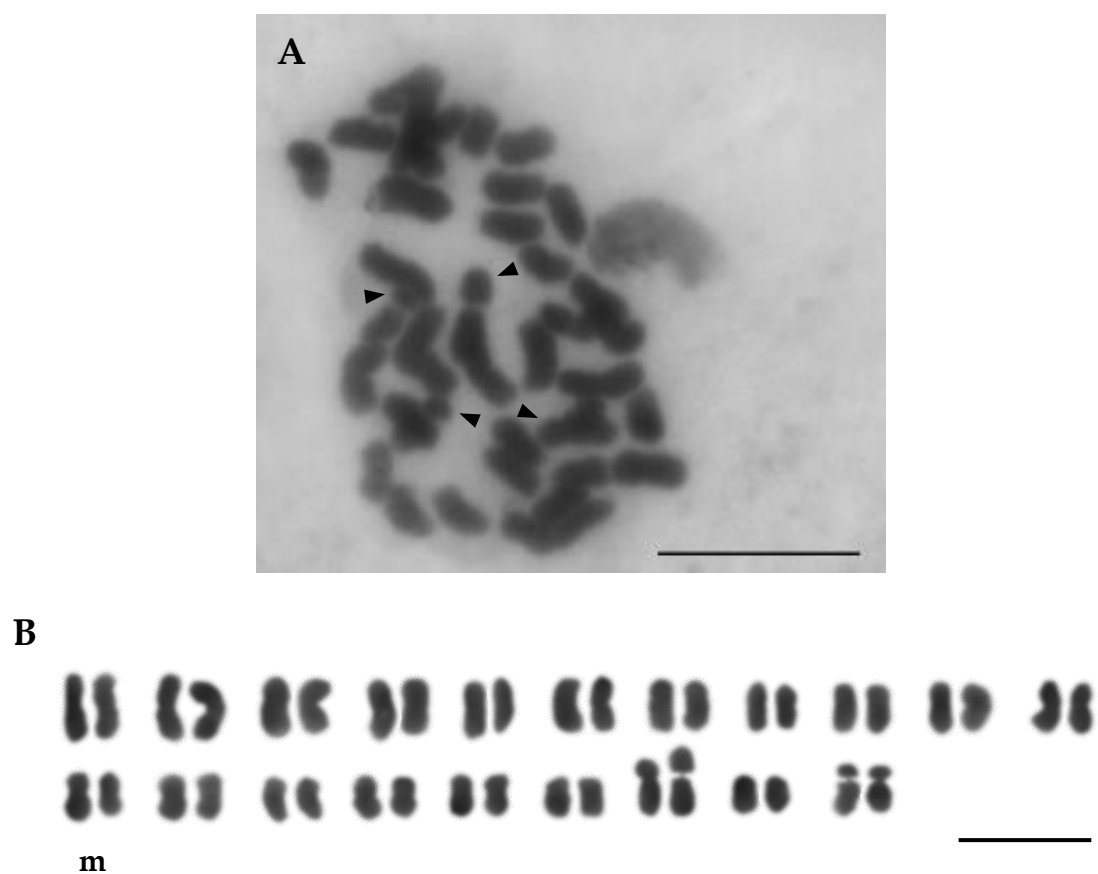
En el cariotipo analizado de *A. barretoj*, se observó que la mayoría de los cromosomas del complemento son metacéntricos (Figura 28 B). Esta especie, a diferencia de las anteriores, posee, además, un par de cromosomas submetacéntricos con satélites en el brazo corto. También, se observó la presencia de cromosomas B en número variable, de 2 a 6, los cuales se diferencian del complemento cromosómico por su morfología y tamaño. De acuerdo con este cariotipo, se propone la fórmula: 52 m + 6 sm + 2 t + cromosomas Bs.

En *A. exaratus*, el análisis del cariotipo (Figura 29 B), mostró que la mayoría de los cromosomas del complemento son metacéntricos, con un par de cromosomas con satélites en el brazo corto y dos pares submetacéntricos. Se observó la presencia de cromosomas B, en número variable de 2 a 4, los cuales se diferencian del complemento cromosómico por su morfología y tamaño. Según el cariotipo analizado, se propone la fórmula: 56 m + 4 sm + cromosomas B.

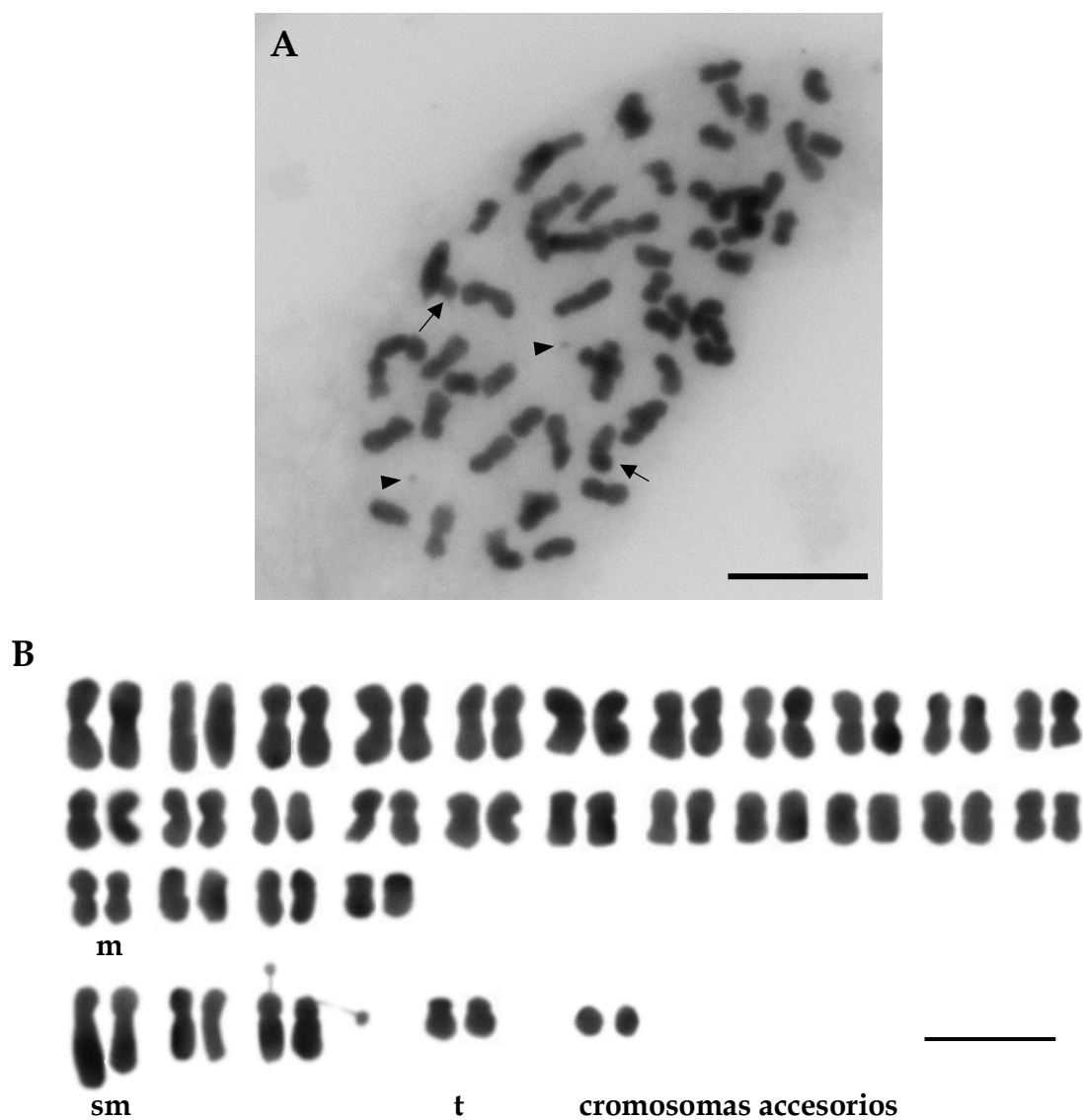
*Andropogon glaucophyllus*, presenta un cariotipo constituido en su mayoría de cromosomas metacéntricos (Figura 30 B), un par de los cuales, posee satélite en el brazo corto de ambos homólogos y tres pares de cromosomas telocéntricos. De acuerdo al análisis del cariotipo se propone la fórmula cariotípica: 54 m + 6 t. En esta especie no se observaron cromosomas Bs.

Si bien todas las especies analizadas, presentan un par de cromosomas con satélites, el tamaño del satélite difiere en cada especie. En *A. gayanus*, los satélites se observaron intensamente teñidos y localizados sobre brazos cortos de dos pares de cromosomas metacéntricos. Un par de cromosomas contiene un par de satélites de mayor tamaño, incluso, mayor que la región distal del cromosoma. En ambos homólogos, se observó la unión al brazo corto por medio de una constricción secundaria prolongada, siendo a veces, más prolongada en un cromosoma que en el otro. El otro par de satélite es de tamaño apenas menor (Figura 27 A y B), observándose que uno de los satélites se mantiene más retraído sobre su propio brazo cromosómico. En *A. barretoii*, se observó un par de satélites la región distal del brazo corto de cromosomas submetacéntricos. Estos satélites son punctiformes, de mucho menor tamaño que el segmento proximal (brazo corto), y ambos cromosomas homólogos se los observó nítidamente unidos al brazo corto por medio de una larga constricción secundaria (Figura 28 A y B). En *A. exaratus*, se observó un par de satélites en la región distal del brazo corto de cromosomas metacéntricos. El tamaño de estos satélites es semejante al tamaño del segmento proximal, y se los observó apenas separados del brazo corto (Figura 29 A y B). En *A. glaucophyllus*, se observó un par de cromosomas metacéntricos con satélites en la región distal del brazo corto. El satélite tiene un tamaño igual o apenas más pequeño que el segmento proximal del brazo corto, mostrando una constricción secundaria asociada al satélite. Con frecuencia se observó uno de los satélites unido al brazo corto del cromosoma (Figura 30 A y B).

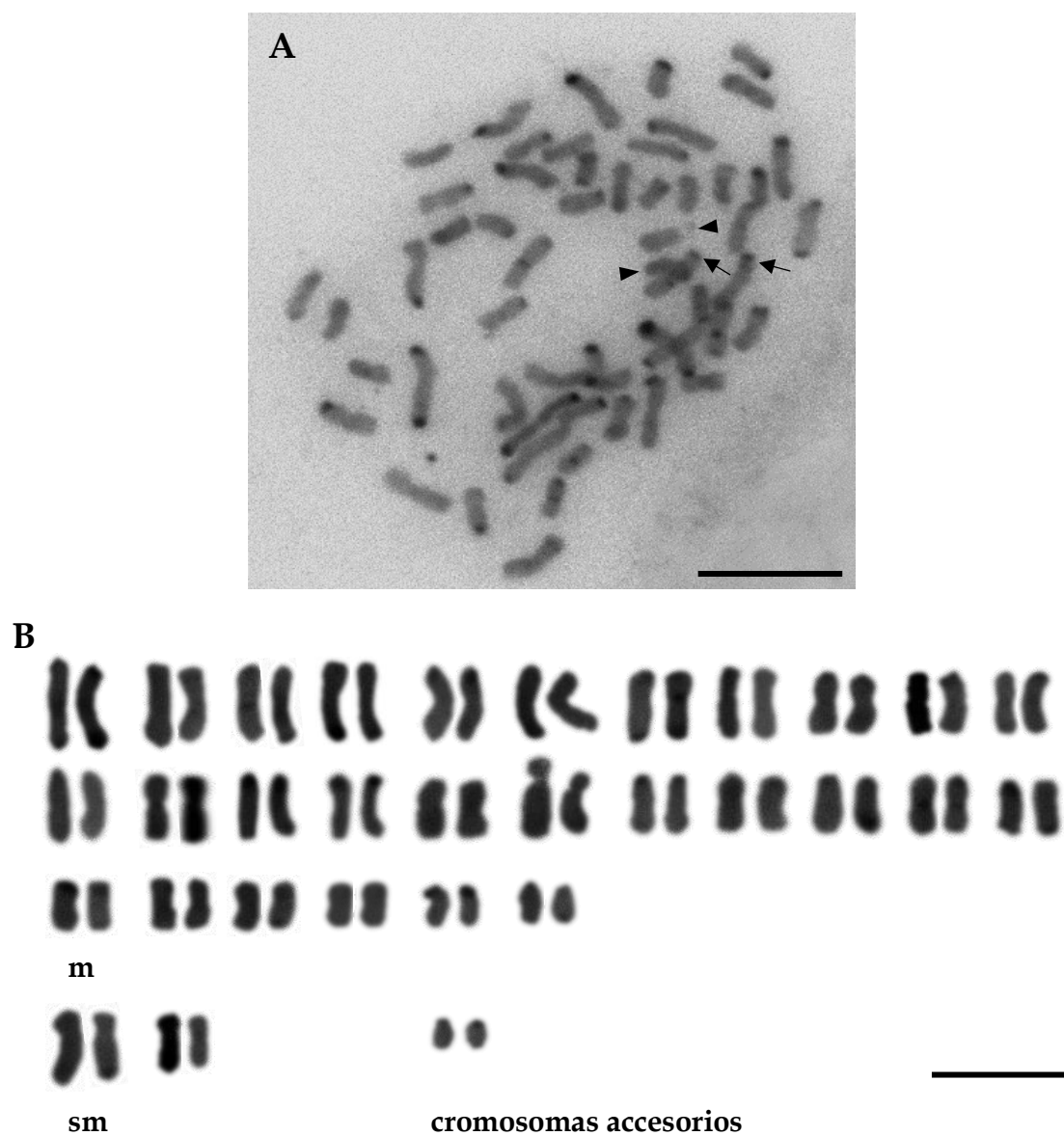
La longitud cromosómica promedio de las especies analizadas varió de 2,93  $\mu\text{m}$  (*A. glaucophyllus*) a 5,30  $\mu\text{m}$  (*A. barretoii*), y el promedio de las longitudes total del complemento haploide varió de 29,31  $\mu\text{m}$  (*A. glaucophyllus*) a 53,08  $\mu\text{m}$  (*A. barretoii*). El índice de asimetría intracromosómica ( $A_1$ ) varió de 0,16 a 0,19, existiendo una pequeña variación entre los brazos cromosómicos en las diferentes especies; sin embargo, el índice intercromosómico ( $A_2$ ) varió de 0,03 a 0,25, mostrando diferencias en el tamaño entre los diferentes cromosomas en cada especie. El índice de asimetría  $A_2$  de *A. gayanus* fue el más pequeño de las especies analizadas. En el diagrama de dispersión de los índices de asimetría  $A_1$  y  $A_2$  (Figura 26) se observó que las tres especies hexaploides forman un grupo, mientras que el tetraploide se mantiene alejado de ese grupo.



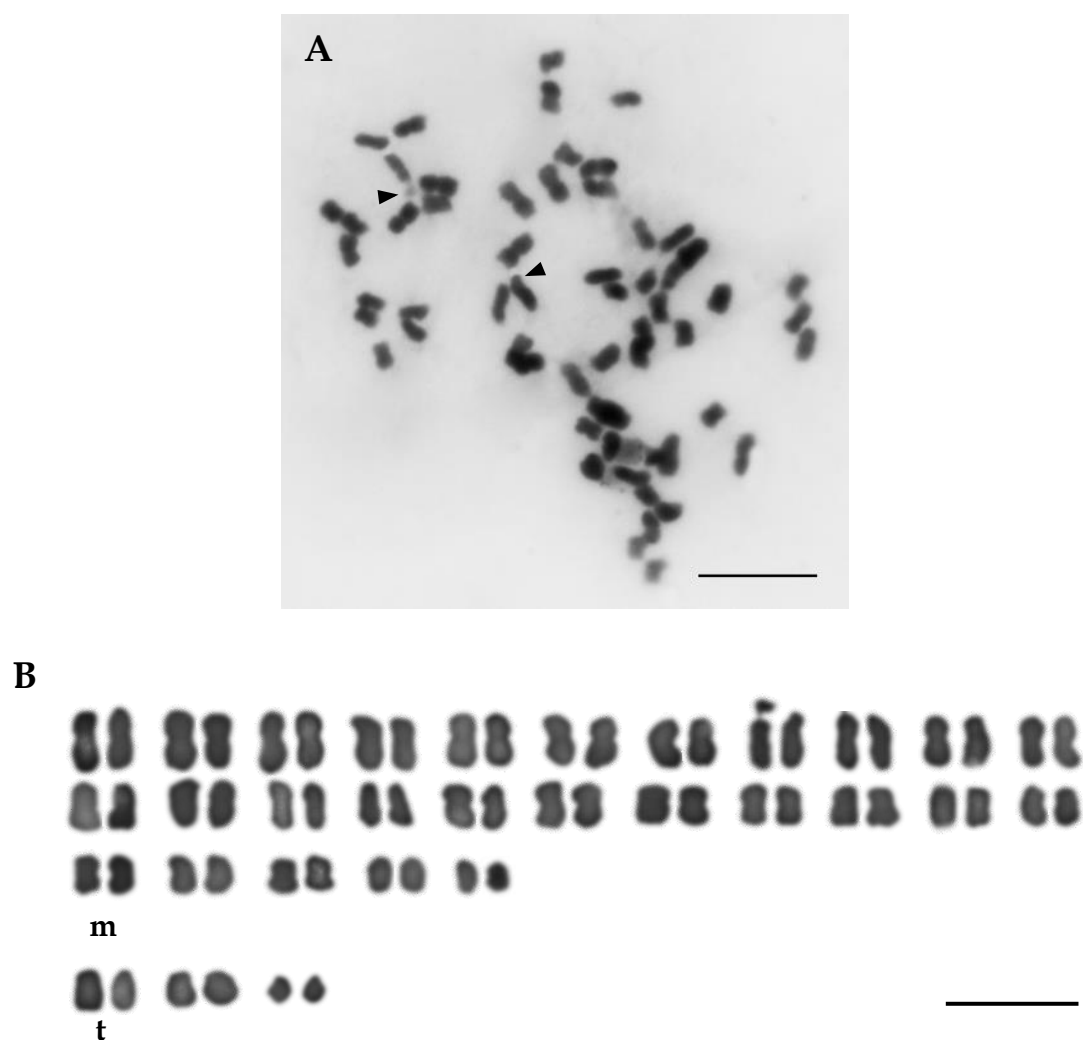
**Figura 27: *Andropogon gayanus*.** A. Cromosomas mitóticos. Las cabezas de flecha indican satélites. B. Cariotipo. En esta figura no se observan los cromosomas B. Barra: 10  $\mu$ m



**Figura 28: *Andropogon barrettoi*. A.** Cromosomas mitóticos. Las cabezas de flecha indican satélites; las flechas enteras indican cromosomas accesorios. **B.** Cariotipo. Barra: 10  $\mu$ m



**Figura 29: *Andropogon exaratus* A.** Cromosomas mitóticos. Las flechas señalan 2 cromosomas accesorios; las cabezas de flecha indican satélites. **B.** Cariotipo. Barra: 10  $\mu$ m



**Figura 30: *Andropogon glaucophyllus*. A.** Cromosomas mitóticos. Las cabezas de flecha indican satélites. **B.** Cariotipo. Barra: 10  $\mu$ m.

En el presente trabajo se confirman los números cromosómicos somáticos de las especies *A. gayanus*, *A. exaratus*, *A. barretoii* y *A. glaucophyllus*, pertenecientes a la Sección *Notosolen* Stapf. cuyos primeros recuentos cromosómicos reportados figuran en la Tabla 7.

**Tabla 7: Recuentos cromosómicos previos de las especies poliploides analizadas.**

<b>Especie</b>	<b>2n</b>	<b>Sección</b>	<b>Recuentos</b>
<i>A. gayanus</i>	40	<i>Notosolen</i> Stapf	Moffett&Hurcombe (1949) Pienaar (1955)
<i>A. exaratus</i>	60	<i>Notosolen</i> Stapf	Norrmann (1985)
<i>A. barretoii</i>	60	<i>Notosolen</i> Stapf	Norrmann & Scarel (2000)
<i>A. glaucophyllus</i>	60	<i>Notosolen</i> Stapf	Norrmann & Scarel (2000)



### Comportamiento meiótico de las especies poliploides analizadas

Se analizó el comportamiento de los cromosomas en meiosis de *Andropogon gayanus* ( $2n=4x=40$ ), *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* ( $2n=6x=60$ ) en Diacinesis y Metafase I. En todas las especies se observó una meiosis regular, con formación de 30 bivalentes (30 II) en las especies hexaploides y 20 bivalentes (20 II) en el tetraploide.

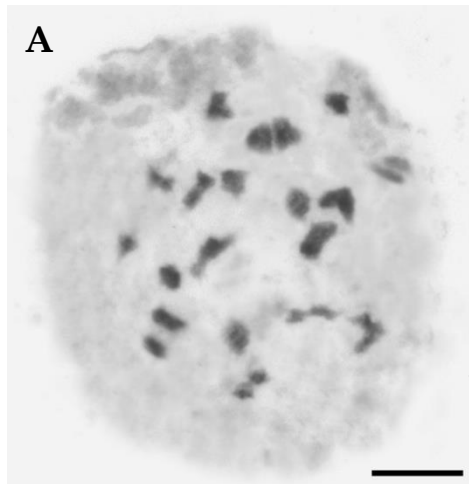
Al analizar el comportamiento de los cromosomas en meiosis en *A. gayanus*, se observó la formación de 20 bivalentes (20 II), dentro de estas configuraciones, se observó disyunción precoz de cuatro bivalentes (Figura 31 A). Si bien, *A. gayanus*, posee 1-2 cromosomas accesorios, estos no se observaron en las células estudiadas en meiosis. En Metafase I, los 20 II se organizaron en el plano ecuatorial de la célula y no se observó la presencia de univalentes. La configuración meiótica observada fue de 20 II.

En *A. barretoii*, las 60 células analizadas en Diacinesis, mostraron cromosomas apareados formando 30 bivalentes, individualizables (Figura 32 A), siendo notoria la presencia de dos a cuatro bivalentes asociados al nucléolo. En la mayoría de las células, se observó la presencia de cromosomas accesorios (cromosomas B), en número variable (1-8), de tamaño pequeño. Algunos de estos cromosomas no se asociaban entre sí, comportándose como univalentes y en cambio, otros formaban asociaciones débiles, o permanecían de a pares muy cercanos uno del otro. En 50 células analizadas en Metafase I, las asociaciones cromosómicas permanecían muy juntas, una al lado de la otra, en el plano ecuatorial, no pudiendo individualizarse a los bivalentes. Los cromosomas accesorios, se comportaron como univalentes, manteniéndose fuera del plano ecuatorial de la célula y alejados del complemento (Figura 32 B). En Anafase I, los cromosomas accesorios siguen comportándose como univalentes, permaneciendo algo rezagados en su migración hacia los polos de la célula, siendo la segregación regular (30:30). La configuración meiótica formada fue de 30 II + 4-8 Bs.

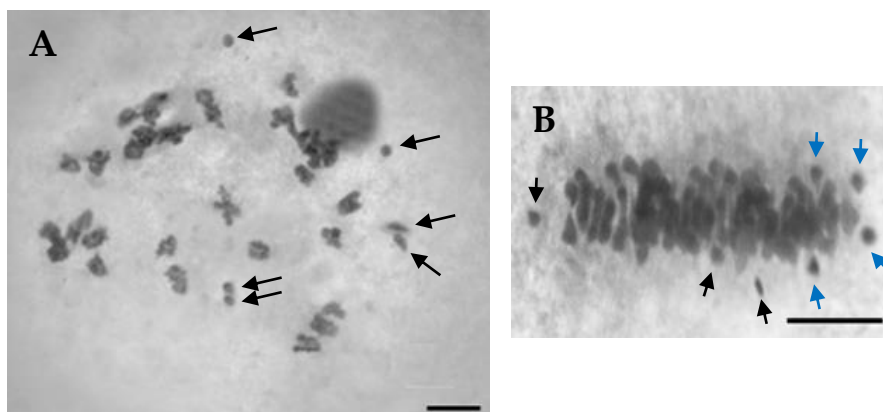
El análisis del comportamiento de los cromosomas en meiosis, observados en 71 células de *A. exaratus*, arrojaron los siguientes resultados. En Diacinesis, se observó que los cromosomas se aparean formando 30 bivalentes (30 II) (Figura 33 A), y a menudo se observan de 2 a 4 bivalentes asociados al nucléolo. Al igual que en la especie anterior, se observó la presencia de 2 cromosomas accesorios (B), de tamaño pequeño, comportándose como univalentes. En Metafase I, se observaron 30 bivalentes (30 II),

identificables, sobre el plano ecuatorial de la célula y 2 cromosomas accesorios, como univalentes, fuera del plano ecuatorial (Figura 33 B). La segregación cromosómica en Anafase I fue regular (30:30), observándose a los cromosomas Bs distribuirse hacia uno u otro polo celular. La configuración meiótica formada fue de 30 II + 2 Bs.

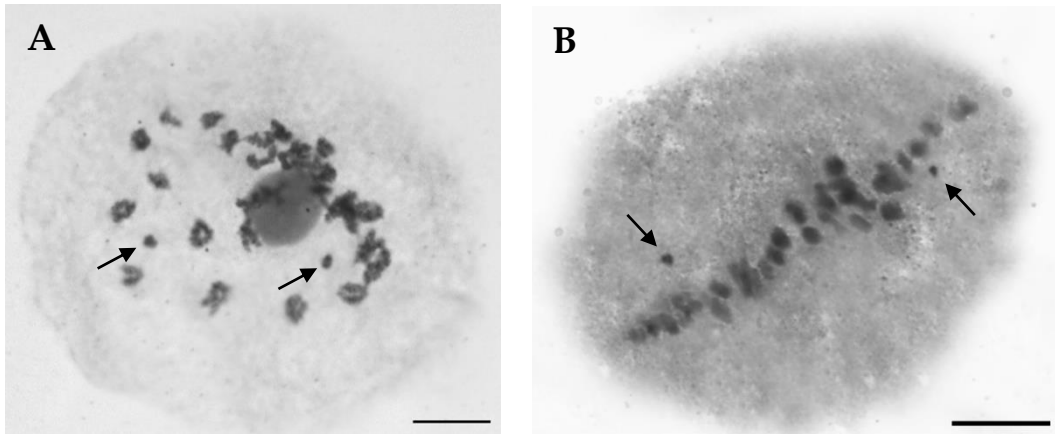
El comportamiento de los cromosomas de *A. glaucophyllus*, en meiosis, fue analizado en 60 células. En Diacinesis, se observaron cromosomas formando 30 bivalentes (30 II) (Figura 34 A), y la presencia de 2 bivalentes asociados al nucléolo. No se observaron cromosomas accesorios en ninguna de las fases de la meiosis. La segregación en Anafase I fue regular (30:30) y la configuración meiótica formada fue de 30 II.



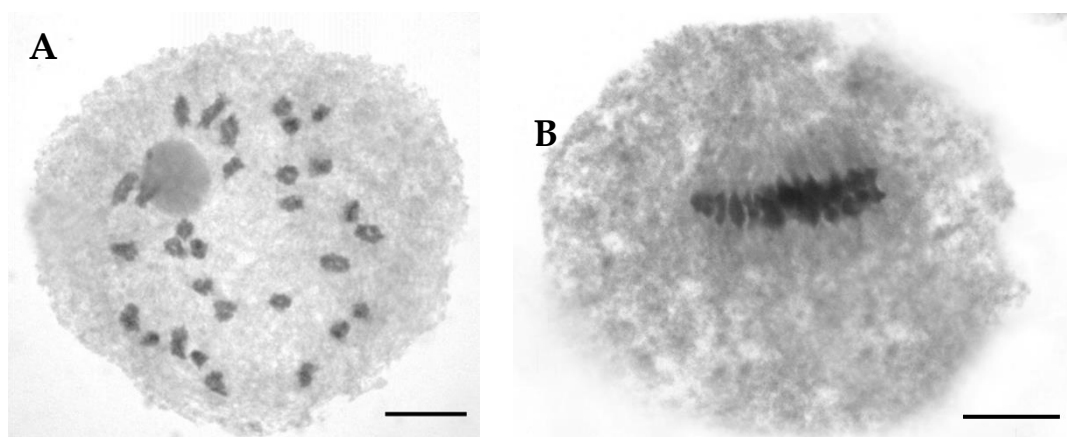
**Figura 31: Células meióticas de *A. gayanus*. A.** Diacinesis. Se observan 20 bivalentes (20 II)  
Barra: 10  $\mu$ m.



**Figura 32: Células meióticas de *A. barretoi*.** **A. Diacinesis.** Se observan 30 bivalentes (30 II) y 6 cromosomas accesorios comportándose como univalentes, alguno de los cuales están muy juntos. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . **B. Metafase I.** Se observa una precoz separación de dos bivalentes y 2 cromosomas accesorios fuera de la placa ecuatorial de la célula, comportándose como univalentes. Las flechas negras indican cromosomas accesorios (cromosomas Bs). Las flechas azules indican desinapsis temprana de dos bivalentes. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 33: Células meióticas de *A. exaratus*.** **A.** Diacinesis. Se observan 30 bivalentes (30 II) y 2 cromosomas accesorios comportándose como univalentes. Barra: 10  $\mu$ m. **B.** Metafase I. Se observan 30 II y 2 cromosomas accesorios fuera de la placa ecuatorial de la célula, comportándose como univalentes. Barra: 10  $\mu$ m. Las flechas indican cromosomas accesorios (cromosomas Bs).



**Figura 34: Células meióticas de *A. glaucophyllus*. A.** Diacinesis. Se observan 30 bivalentes (30 II) Barra: 10 µm. **B.** Metafase I, con 30 II. Barra: 10 µm.

### Estudio de las regiones heterocromáticas

En la Tabla 8, se resume el número y posición de las bandas heterocromáticas C/DAPI y DAPI/CMA<sub>3</sub>.

Para describir la posición de las regiones heterocromáticas se utilizó la nomenclatura de Gill & Kimber (1974).

### Distribución de la heterocromatina constitutiva mediante la técnica de Bando C con tinción con DAPI.

En la Figura 35, se resumen los diferentes tipos de patrones de distribución de la heterocromatina constitutiva C/DAPI observados.

La técnica del bandedo cromosómico C, mostró que *A. gayanus*, *A. barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*, presentaron un patrón de distribución de la heterocromatina, en la mayoría de los cromosomas del complemento (Figuras 36, 37, 38, 39 y 40 A).

En las especies analizadas, el patrón de distribución de la heterocromatina, mostró cariotipos con señales intensas y brillantes de posición centroméricas y terminales en la mayoría de los cromosomas de los complementos. Las mismas se observaron con aspecto de puntos pequeños. Los núcleos interfásicos muestran un número proporcional de cromocentros C+ (Figura 36, 37, 38, 39 y 40 B).

Si bien el patrón de distribución de la heterocromatina, es muy semejante entre estas especies, existe variación en cuanto a la posición y número de las bandas presentes en cada cromosoma.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pueden establecer tres patrones diferentes de distribución de la heterocromatina constitutiva, alguno de los cuales presenta algunas variaciones (Figura 35).

**Tipo I:** heterocromatina constitutiva en posición centromérica C/DAPI (**IA**). Heterocromatina constitutiva en posición pericentromérica C/DAPI puntiforme (**IB**).

**Tipo II:** heterocromatina constitutiva en posición centromérica y banda C/DAPI en posición terminal en un brazo (**IIB**).

**Tipo III:** heterocromatina constitutiva en posición centromérica y banda en posición terminal C/DAPI en ambos brazos cromosómicos.

En *A. gayanus*, se observó que la mayoría de los cromosomas presentaron un patrón del Tipo IA, con una variante del Tipo IB en un par de cromosomas (Figura 36 A); además un par de cromosomas presentó, un patrón del Tipo IIB.

Los cariotipos de *A. barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*, mostraron que la mayoría de los cromosomas presentan un patrón de distribución de la heterocromatina constitutiva del Tipo IA, IIB y IIIB, con muy pocos cromosomas con ausencia de bandas.

El tamaño de las bandas de heterocromatina constitutiva de la región centromérica es de 0,42  $\mu\text{m}$  - 1,64  $\mu\text{m}$  en *A. barretoii*; de 0,60  $\mu\text{m}$  - 1,28  $\mu\text{m}$  en *A. exaratus*; de 0,47  $\mu\text{m}$  - 1,11  $\mu\text{m}$  en *A. glaucophyllus* y 0,61  $\mu\text{m}$  - 1,68  $\mu\text{m}$  en *A. gayanus*; siendo el tamaño de la banda de heterocromatina constitutiva de posición terminal de 0,40  $\mu\text{m}$  - 0,80  $\mu\text{m}$  en *A. barretoii*; 0,49  $\mu\text{m}$  - 0,91  $\mu\text{m}$  en *A. exaratus*; de 0,39  $\mu\text{m}$  - 0,99  $\mu\text{m}$  en *A. glaucophyllus* y de 0,39  $\mu\text{m}$  en *A. gayanus*.

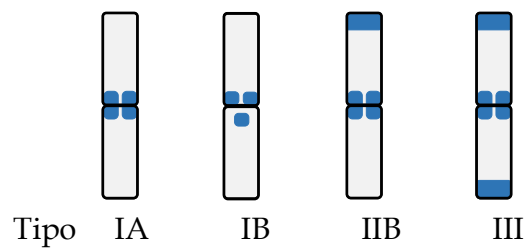
La cantidad total de heterocromatina constitutiva varió desde 7,16 % (*A. gayanus*); 17,50% (*A. glaucophyllus*); 18,26 % (*A. exaratus*) y 19,20 % (*A. barretoii*), con respecto a la longitud total del complemento cromosómico. Solo se obtuvieron los valores de cantidad de heterocromatina constitutiva de las especies que forman parte de la sección *Notosolen*, de cono sur de Sudamérica.

En los preparados con la técnica de Bandas C/DAPI no se pudo distinguir la ubicación de los satélites presentes en estas especies.

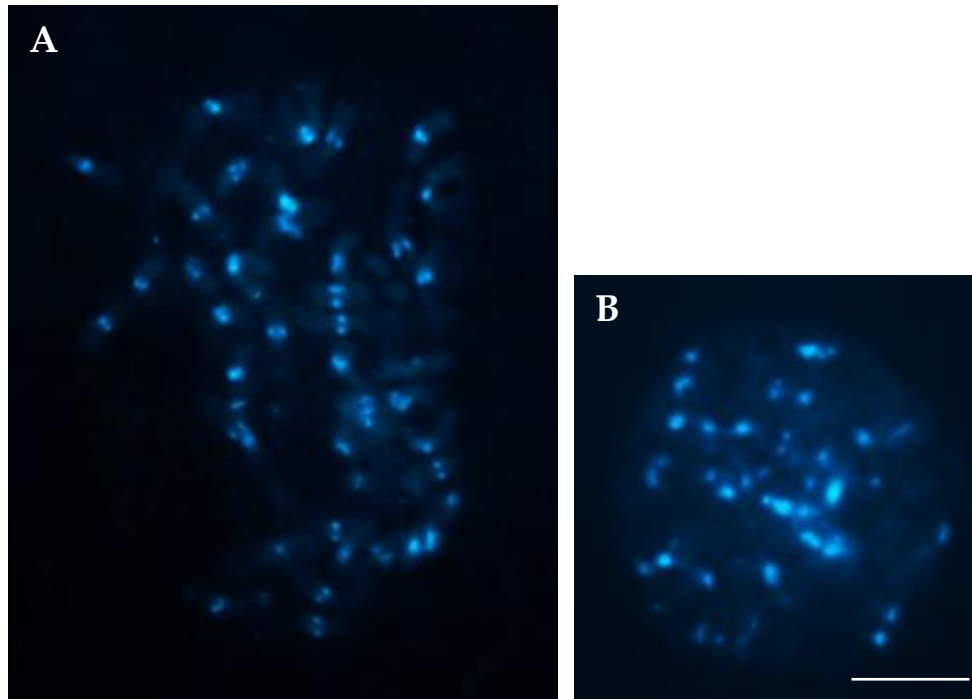


**Tabla 8: Número y posición de bandas heterocromáticas C/DAPI y DAPI/CMA<sub>3</sub> en especies poliploides de *Andropogon*. Abreviaturas: NB: número de bandas heterocromáticas; Ce: centromérica; Per: pericentromérica; Int: intersticial; Ter: terminal. BrHet: brazo heterocromático.**

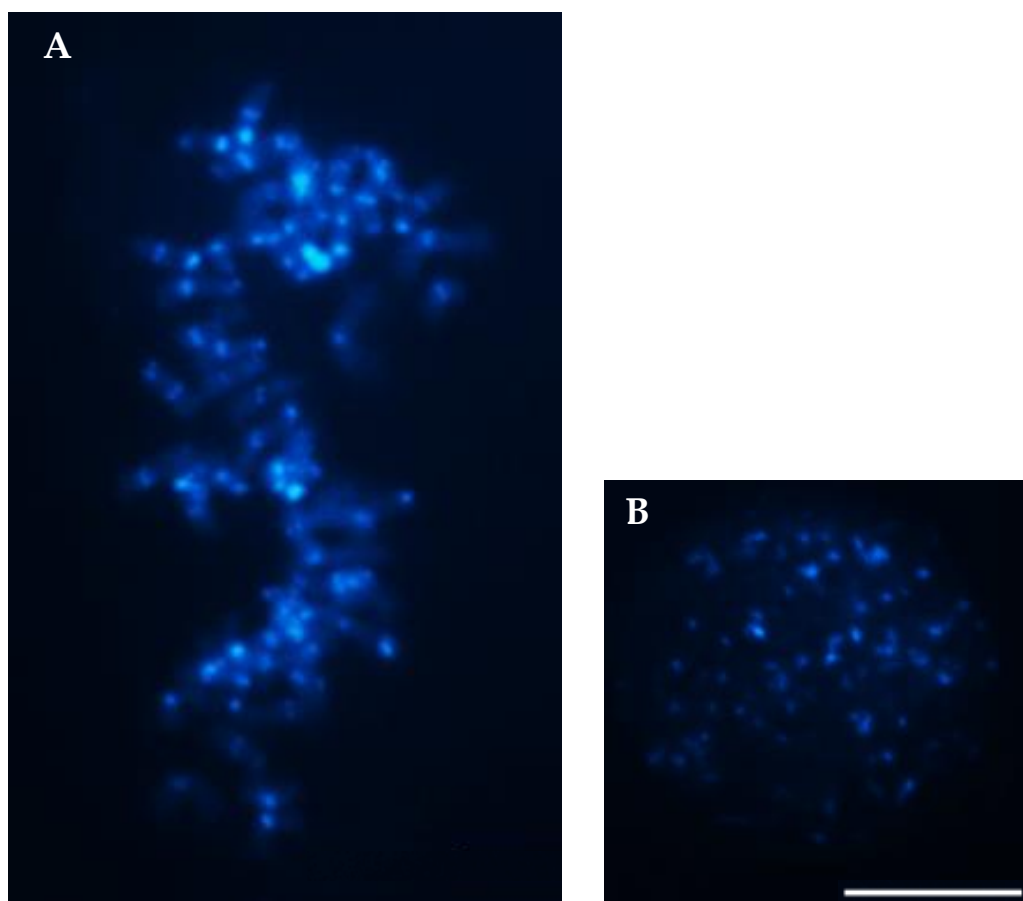
Espec		Heterocromatina C / DAPI					Heterocromatina DAPI / CMA <sub>3</sub>				
	2n	NB	NB	NB	NB	%	NB	NB	NB	NB	Br
		Ce	Per	Int	Ter		Ce	Per	Int	Ter	Het
<i>A. gayanus</i>	40	40	2	0	4	7,16	36	0	0	4	0
<i>A. barretoii</i>	60	60	0	0	30	19,20	12	0	0	54	0
<i>A. exaratus</i>	60	60	0	0	30-40	18,26	16	0	0	58	0
<i>A. glaucophyllus</i>	60	58	2	0	25-30	17,50	0	0	0	2	0
<i>A. gerardii</i>	60	55	2	0	65	sin datos	0	0	0	0	2



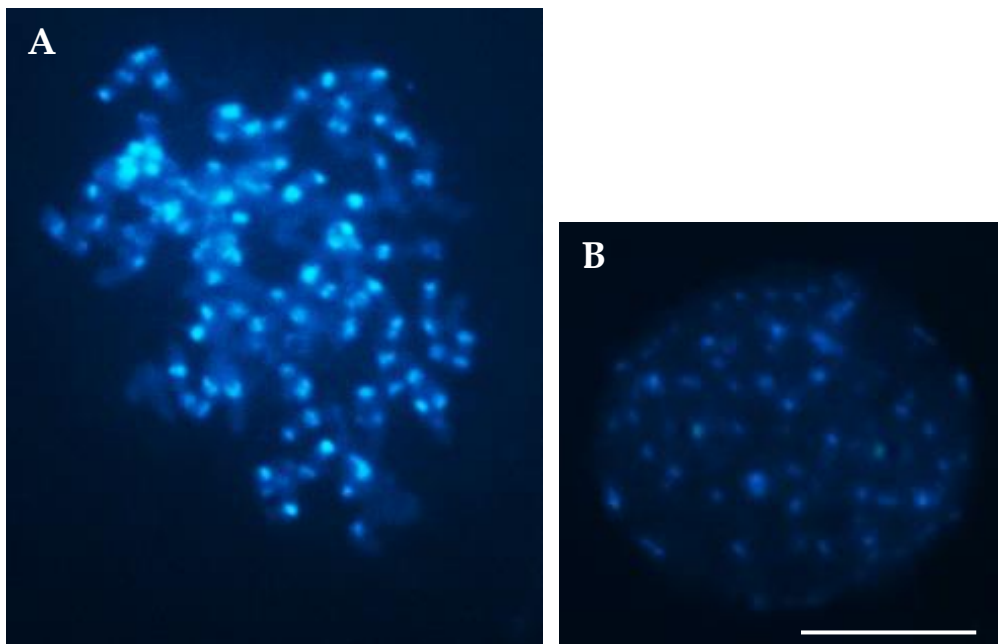
**Figura 35: Patrones de distribución de la heterocromatina constitutiva C/DAPI en las especies poliploides de *Andropogon* analizadas.**



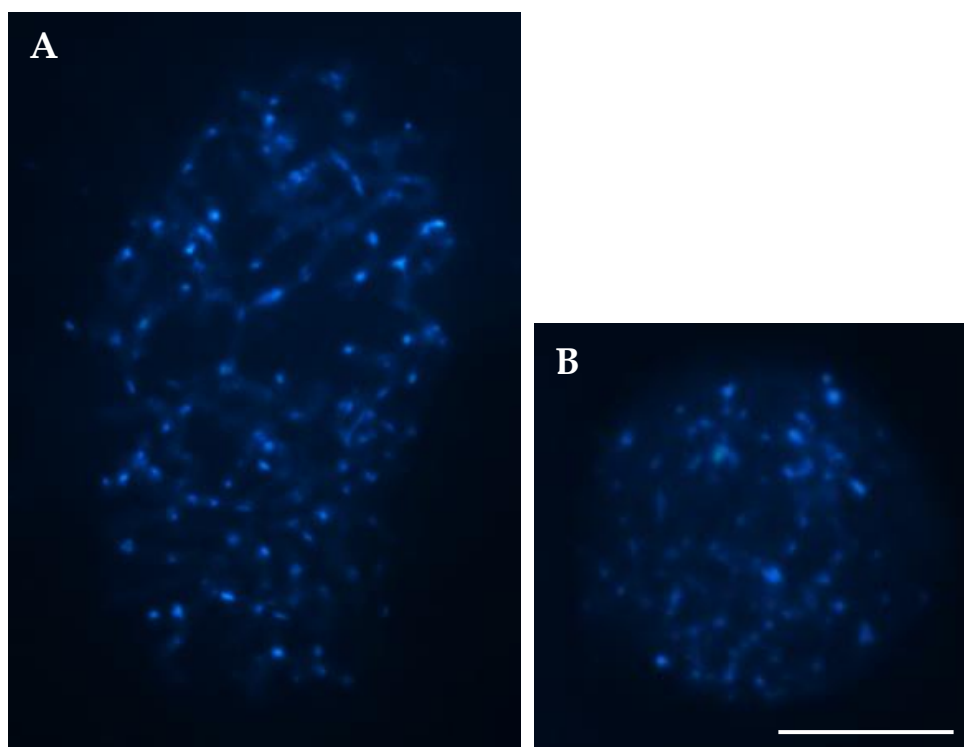
**Figura 36: Distribución de las bandas de heterocromatina constitutiva en *A. gayanus*:**  
**A.** Cromosomas mitóticos. **B.** Interfase. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



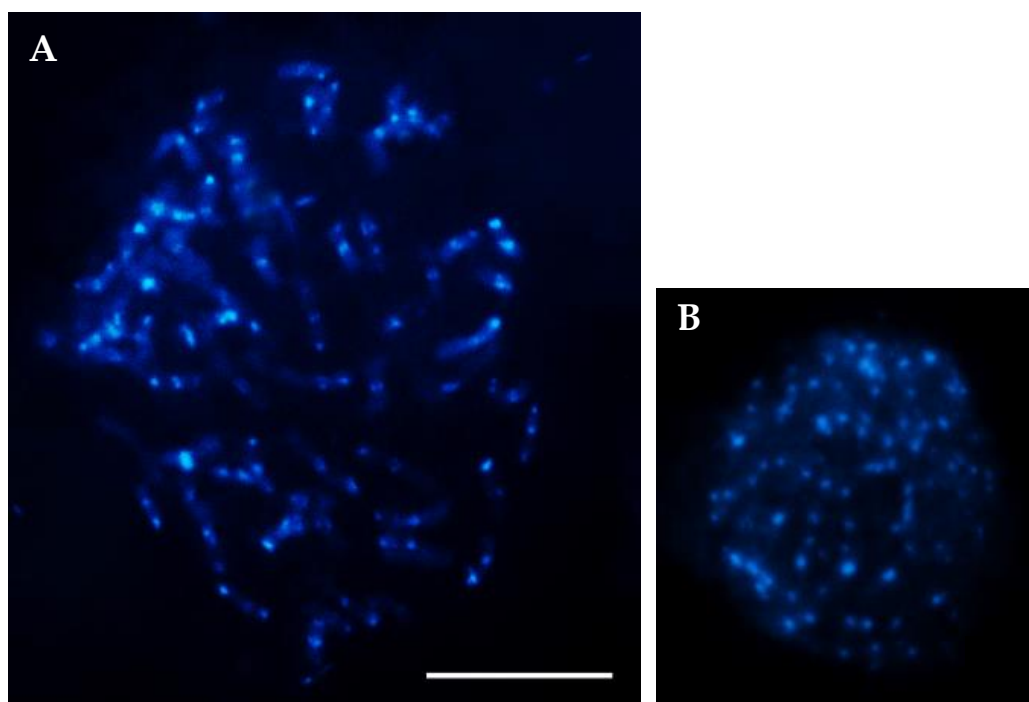
**Figura 37: Distribución de las bandas heterocromatina constitutiva en *A. barretoii*:**  
**A.** Cromosomas mitóticos. **B.** Interfase. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 38: Distribución de las bandas heterocromatina constitutiva en *A. exaratus*.**  
**A.** Cromosomas mitóticos. **B.** Interfase. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 39: Distribución de las bandas heterocromatina constitutiva en *A. glaucophyllus*.**  
**A.** Cromosomas mitóticos. **B.** Interfase. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 40: Distribución de las bandas de heterocromatina constitutiva en *A. gerardii*:**  
**A.** Cromosomas mitóticos. **B.** Interfase. Barra: 10  $\mu$ m.

### Distribución de la composición de la heterocromatina mediante la técnica de Bando CMA<sub>3</sub> / DAPI.

Para simplificar la descripción y la comparación de los cariotipos se establecieron siete tipos diferentes de patrones de composición de las regiones heterocromáticas, algunos de los cuales presenta alguna variante (Figura 41):

**Tipo I:** heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ en posición centromérica (**IA**). Heterocromatina DAPI+ / CMA<sub>3</sub>- en posición centromérica (**IB**).

**Tipo II:** heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ en posición centromérica y terminal en un brazo cromosómico (**IIB**).

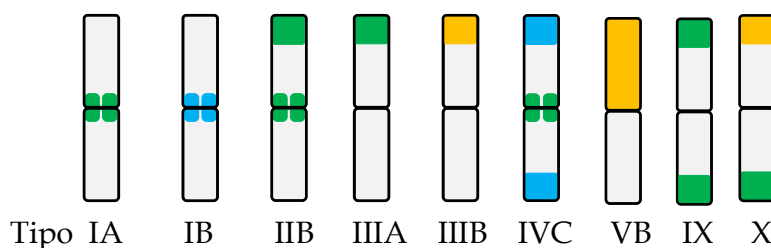
**Tipo III:** heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ en posición terminal en un brazo cromosómico (**IIIA**). Heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI- en posición terminal en un brazo cromosómico (**IIIB**).

**Tipo IV:** heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ en posición centromérica y heterocromatina DAPI+ / CMA<sub>3</sub>- en posición terminal en ambos brazos cromosómicos (**IVC**).

**Tipo V:** brazo heterocromático CMA<sub>3</sub>+ / DAPI- (**VB**).

**Tipo IX:** heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ en posición terminal en ambos brazos cromosómicos.

**Tipo X:** heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ en posición terminal en un brazo y CMA<sub>3</sub>+ / DAPI- en el otro brazo cromosómico.



**Figura 41:** Patrón de distribución de la heterocromatina en las especies poliploides de *Andropogon* analizadas, de acuerdo con el tamaño y posición de las bandas DAPI / CMA<sub>3</sub>. Referencias: DAPI+ / CMA<sub>3</sub>- (celeste); CMA<sub>3</sub>+ / DAPI- (anaranjado); DAPI+ / CMA<sub>3</sub>+ (verde).

En el cariotipo de *A. gayanus* (Figura 42 A y B), se observó que 16 pares de cromosomas mostraron un patrón de composición de la heterocromatina del Tipo IA (Figura 43), con fluorescencia brillantes, en forma de puntos y de tamaño constante en la mayoría de los cromosomas. Se observó un par de cromosomas con satélites de mayor tamaño y del otro par de cromosomas con satélites, solo se observó un satélite. En ambos casos, los satélites se visualizaron mostrando fluorescencia diferencial en un segmento heterocromático CMA<sub>3</sub>+ / DAPI-, localizado en la región terminal del brazo corto del cromosoma, de similar intensidad, notándose claramente la presencia de estos satélites. Cabe destacar, la presencia de un cromosoma accesorio (Figuras 42 B), detectado con tinción diferencial CMA<sub>3</sub>, el cual presenta un brazo heterocromático con fuerte fluorescencia CMA<sub>3</sub>+. Un par de cromosomas mostró un patrón de composición de la heterocromatina del Tipo IVC (Figura 43).

En el cariotipo de *A. barretoii* (Figura 44 A y B), la mayoría de los cromosomas, presentan bandas de heterocromatina de posición terminal en un brazo o en ambos brazos. El tamaño de estas bandas es constante en todos los cromosomas. Se observaron dos pares de cromosomas metacéntricos con un patrón Tipo IA y un par metacéntrico con patrón Tipo IB. La heterocromatina de posición centromérica, tiene aspecto puntiforme, brillantes y el tamaño de las mismas es menor que el tamaño de las bandas terminales. Se observó un par de cromosomas metacéntricos con patrón Tipo IIB y dos pares metacéntricos con patrón Tipo IVA con bandas intensas. La mayoría de los cromosomas presentaron un patrón Tipo IIIA (14 pares), en alguno de los cuales la heterocromatina de posición terminal, se ubicó en el brazo corto. Entre estos cromosomas, se encuentran los cromosomas submetacéntricos y telocéntricos. Tres pares de cromosomas metacéntricos mostraron un patrón Tipo IX y un par Tipo X (Figura 45).

En el cariotipo de *A. exaratus* (Figura 46 A y B), se observaron 5 tipos diferentes de patrones de distribución de la composición de la heterocromatina (Figura 47). Al igual que la especie anterior, la mayoría de los cromosomas presentan heterocromatina en posición terminal, con bandas de tamaño constante en todos los cromosomas. En un par de cromosomas metacéntricos, se observó un patrón de Tipo IA, con intensas señales; en 6 pares de cromosomas el patrón Tipo IIB, siendo que, en algunos cromosomas, la heterocromatina pareciera tener una posición intersticial y no terminal; y el patrón de



Tipo IVA, se observó en un par de cromosomas. En trece pares de cromosomas se observó el patrón Tipo IIIA, con intensa y brillante heterocromatina en posición terminal, entre los cuales, se encuentra un par submetacéntrico, con heterocromatina terminal en el brazo largo. Cuatro pares de cromosomas metacéntricos presentaron un patrón Tipo IX (Figura 47). En el cromosoma con satélite, no se observó la presencia de bandas heterocromáticas, sin embargo, el satélite se evidenció con tinción diferencial CMA<sub>3</sub>+ en posición terminal del brazo corto del cromosoma (Figura 46 A y B).

El cariotipo de *A. glaucophyllus* (Figura 48 A y B), se caracterizó por presentar un solo par de cromosomas metacéntricos, en los cuales se observó un patrón Tipo IIIB, con heterocromatina en posición terminal CMA<sub>3</sub>+ /DAPI- en el brazo corto, siendo ésta intensa y brillante (Figura 49).

El cariotipo de *A. gerardii*, (Figura 50 A y B), presentó un par de cromosomas metacéntricos con intensa señal CMA<sub>3</sub>+ /DAPI+ en uno de los brazos coincidiendo con el patrón de Tipo VA (Figura 51). En el cromosoma con satélite, no se observó la presencia de bandas heterocromáticas, aunque se lo pudo observar con tinción CMA<sub>3</sub>+ y con muy débil señal.

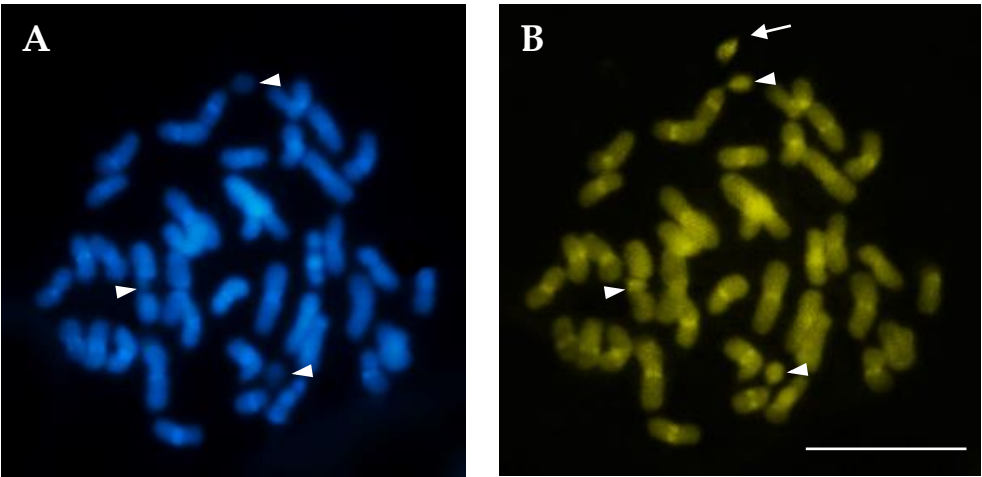


Figura 42: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI en cromosomas mitóticos de *A. gayanus* **A.** Tinción DAPI. **B.** Tinción CMA<sub>3</sub>. La cabeza de flecha indica los satélites CMA<sub>3</sub>+DAPI-. La flecha indica la presencia de un cromosoma accesorio CMA<sub>3</sub>+/DAPI-. Barra: 10 µm.

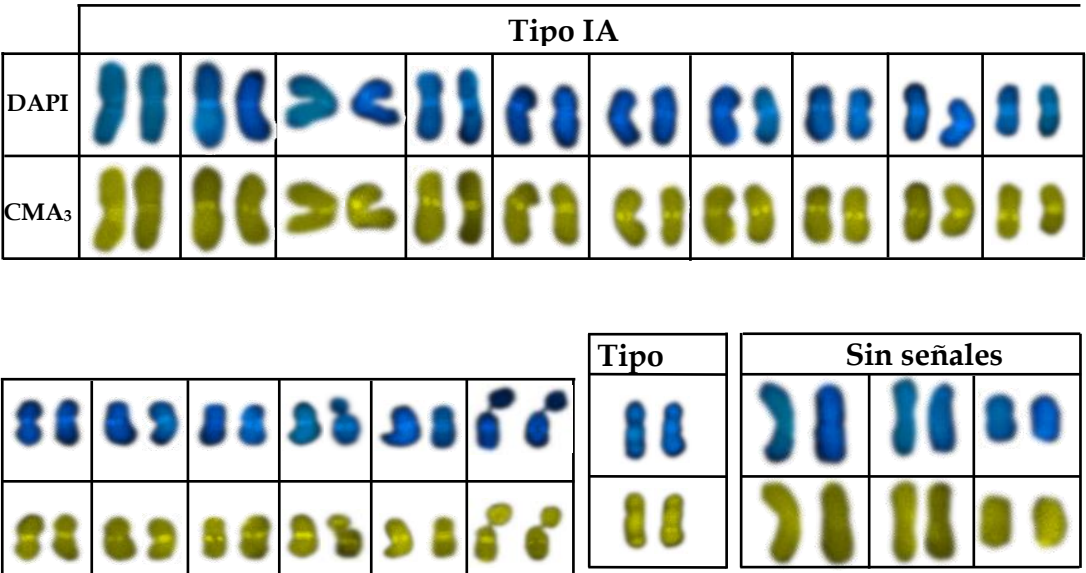


Figura 43: Cromosomas de *A. gayanus* mostrando los diferentes patrones de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, IVC. Barra 10 µm.

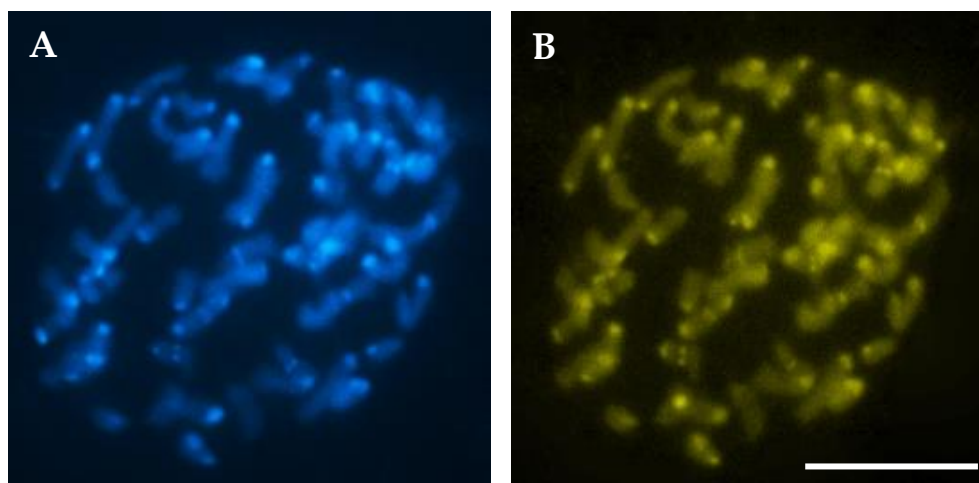


Figura 44: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI. Bandas heterocromáticas en cromosomas mitóticos de *A. barretoii*. A. Tinción DAPI. B. Tinción CMA<sub>3</sub>. Barra: 10 µm.

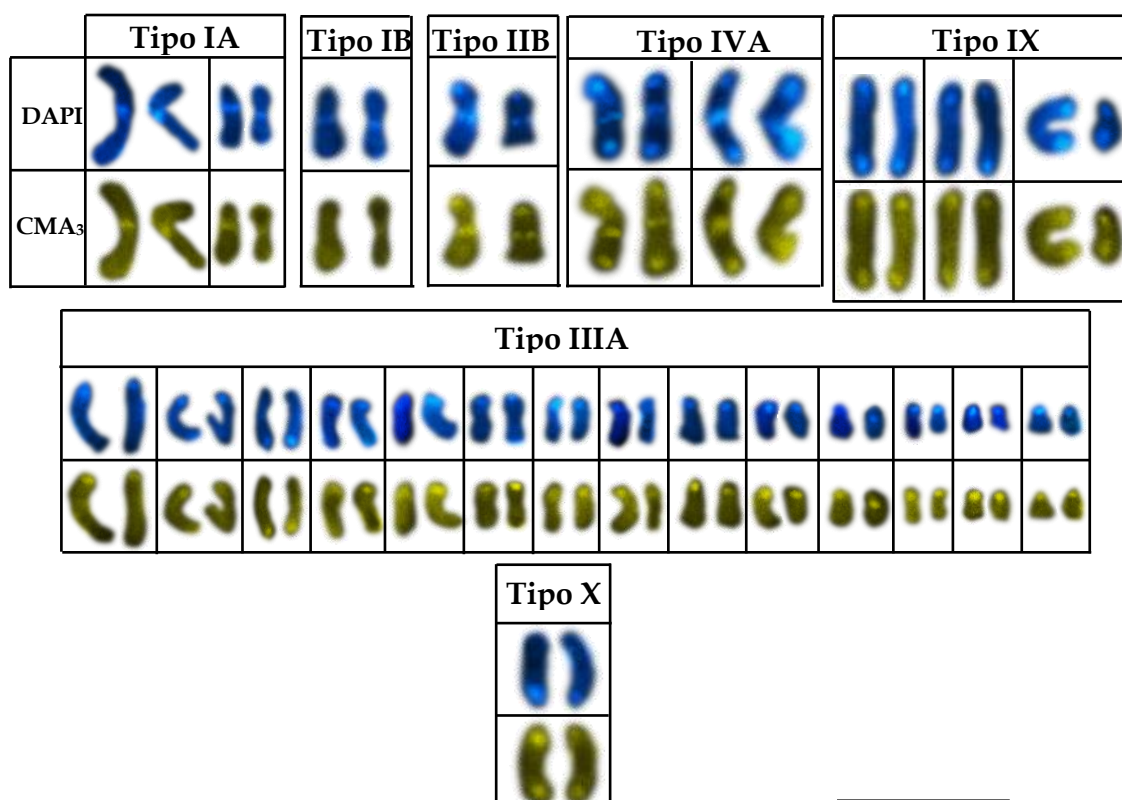
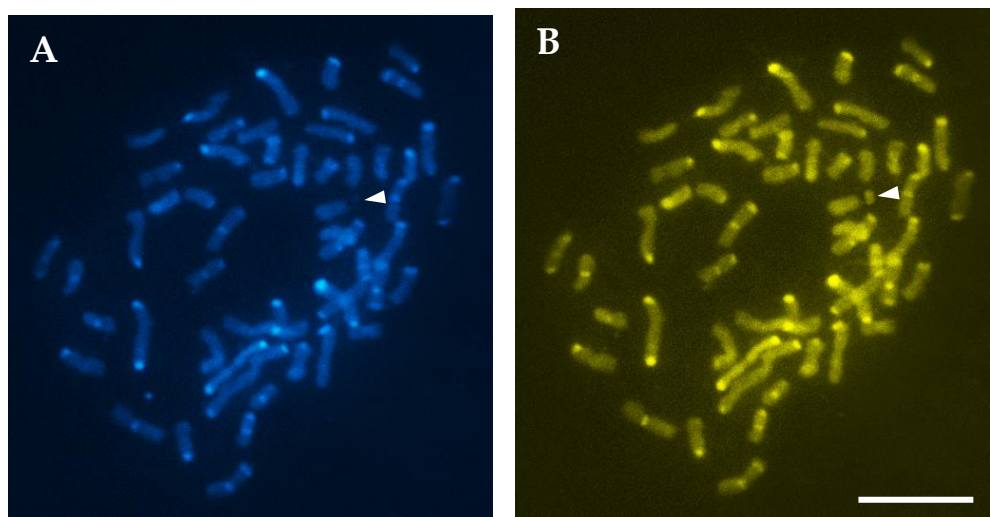
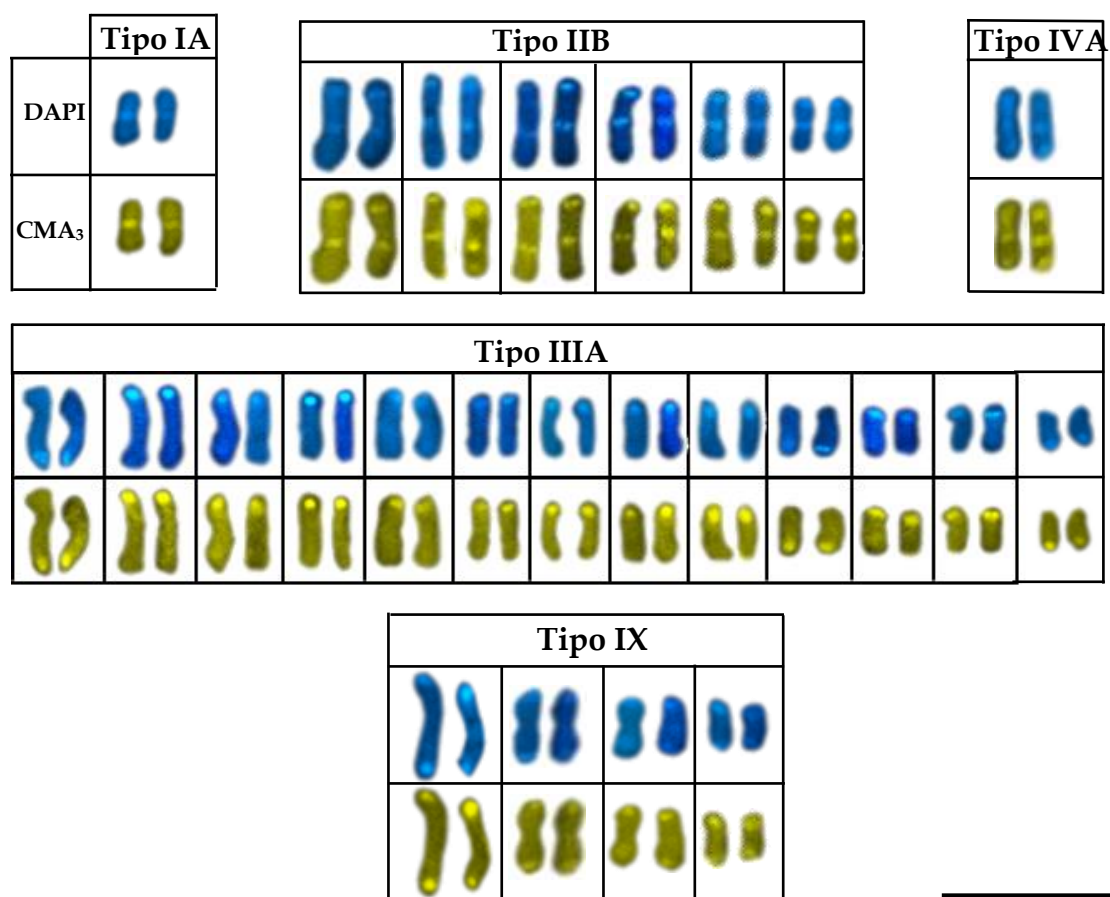


Figura 45: Cromosomas de *A. barretoii* mostrando los diferentes patrones de composición de la heterocromatina DAPI / CMA<sub>3</sub>, de acuerdo con la posición de las bandas. Tipo IA, IB, IIB, IIIA, IVA, IX y X. Barra 10 µm.



**Figura 46: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI en cromosomas mitóticos de *A. exaratus*. A. Tinción DAPI. B. Tinción CMA<sub>3</sub>. La cabeza de flecha indica el satélite CMA<sub>3</sub>+DAPI-. Barra: 10  $\mu$ m.**



**Figura 47: Cromosomas de *A. exaratus* mostrando los diferentes patrones de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, IIB, IIIA, IVA y IX. Barra 10  $\mu$ m.**

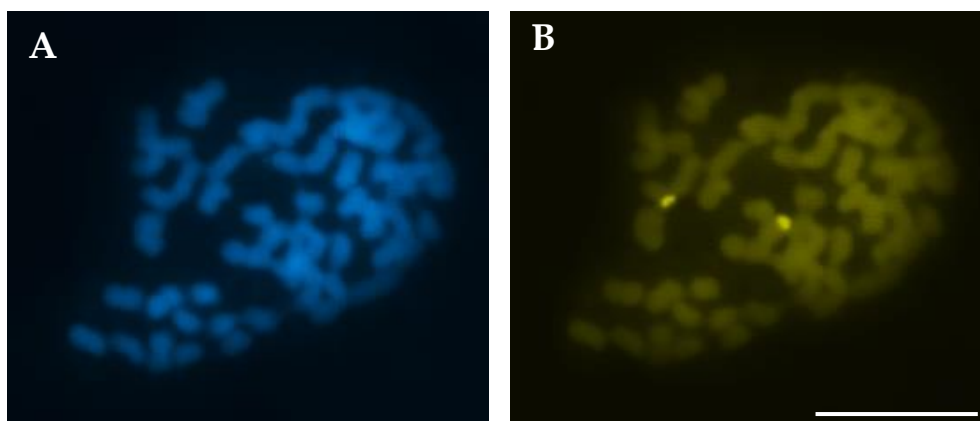


Figura 48: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI en cromosomas mitóticos de *A. glaucophyllus*. A. Tinción DAPI. B. Tinción CMA<sub>3</sub>. Barra: 10  $\mu$ m.

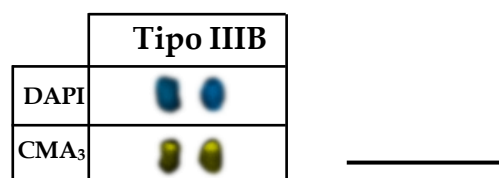
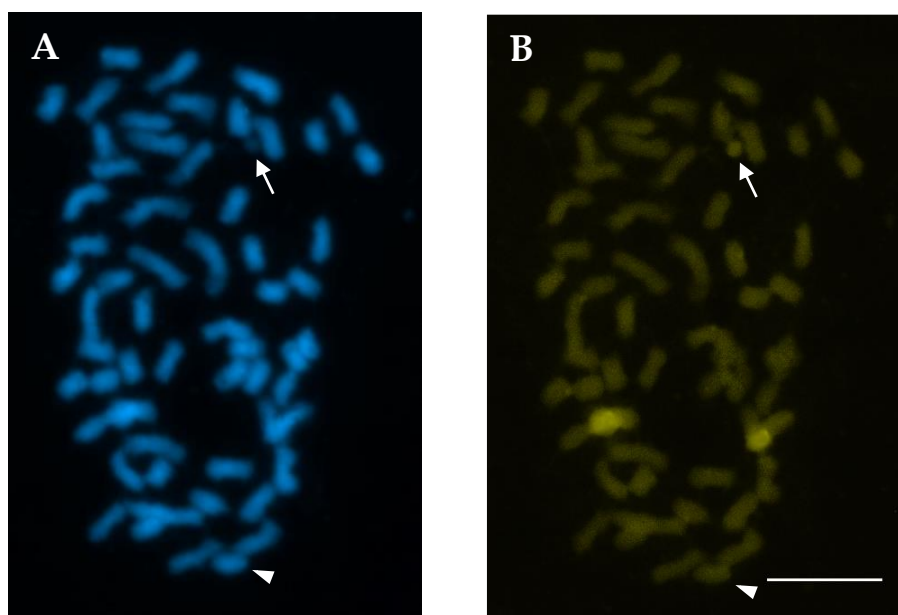
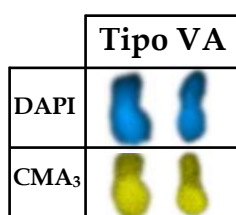


Figura 49: Cromosomas de *A. glaucophyllus* el patrón de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IIIB. Barra 10  $\mu$ m.



**Figura 50: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI en cromosomas mitóticos de *A. gerardii*. A. Tinción DAPI. B. Tinción CMA<sub>3</sub>. La flecha indica el satélite. La cabeza de flecha señala un cromosoma accesorio (B). Barra: 10  $\mu$ m.**



**Figura 51: Cromosomas de *A. gerardii* mostrando el patrón de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo VA. Barra 10  $\mu$ m.**

## Contenido de ADN

Se analizó el contenido de ADN nuclear de las siguientes especies del género *Andropogon* con diferentes niveles de ploidía: *A. gyrans*, *A. selloanus*, *A. macrothrix*, *A. gayanus*, *A. exaratus*, *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*.

Como valores de referencia del contenido de ADN (testigo), se utilizaron tres especies estándar: *Paspalum intermedium* Munro ex Morong. Accession Sch 28857 (diploide,  $2C = 1.417$  pg), *Paspalum dilatatum* spp *flavescens* Q3952 Roseng., B.R.Arrill. & Izag. (tetraploide,  $2C = 2,43$  pg) y *P. dilatatum* Chiru biotipo (hexaploide,  $2C = 3.57$  pg).

En la Tabla 9, se detallan los valores estimados para el contenido de ADN nuclear  $2C$  expresado en picogramos (pg), el contenido de ADN por genoma haploide  $Cx$  expresado en picogramos (pg), el valor estimado de  $Cx$  en megapares de bases (Mpb), el nivel de ploidía y las diferencias estadísticas obtenidas por el Test de Tuckey de las especies analizadas y las especies utilizadas como valores de referencia para cada caso.

La figura 52, muestra los histogramas que representan el contenido de ADN  $2C$  para las especies diploides analizadas por citometría de flujo.

Por material vegetal, se efectuaron tres repeticiones del contenido de ADN, y por cada análisis se midieron aproximadamente 5000 a 10000 núcleos. El contenido de ADN fue estimado comparando el pico producido por la muestra analizada con el pico producido por la muestra testigo.

El nivel de ploidía y el número cromosómico específico de cada una de las entidades a analizar eran conocidos, debido a que sus recuentos fueron previamente reportados en varias publicaciones realizadas por el grupo de investigación de *Andropogon* de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE.

Los datos obtenidos en unidades arbitrarias se convirtieron a picogramos (pg) utilizando como testigo *Paspalum intermedium* (1,417 pg) como referencia para las especies diploides; el tetraploide *P. dilatatum* spp *flavescens* Q3952 (2,43 pg) como referencia para la especie tetraploide y una de las hexaploides; y para el resto de las especies hexaploides se utilizó el hexaploide *P. dilatatum* Chiru (3.57 pg). Cada una de estas especies fue elegida como patrón de referencia, debido a que sus contenidos de ADN eran cercanos a los de las muestras a analizar.



Se realizó análisis estadístico ANOVA entre los individuos de cada nivel de ploidía y dentro de cada especie. El análisis de la varianza determinó la existencia de diferencias significativas en el contenido de ADN (2C) entre las diferentes especies entre sí. Entre *A. gyrans* (2,23 pg) y *A. selloanus* (2,24 pg) existen diferencias significativas en el contenido de ADN (2C) y a su vez ambas especies difieren significativamente con *A. macrothrix* (2,61 pg). Entre las especies diploides hay diferencia significativa con *A. gayanus* (3,31 pg), entre estas, a su vez, existen diferencias significativas con las hexaploides. Entre *A. exaratus* (5,69 pg), *A. barretoii* (6,07 pg), *A. glaucophyllus* (6,05 pg) y *A. gerardii* (6,27 pg) no se detectó diferencias significativas en el contenido de ADN (2C) entre ellas (Tabla 9).

Para relacionar el número de cromosomas de cada especie con el contenido de ADN (2C), se confeccionó un Diagrama de dispersión donde, en el eje de las abscisas, se indicó el número de cromosomas de cada entidad analizada y en el eje de las ordenadas el Valor 2C (pg) (Figura 53).

La medición del contenido de ADN por genoma básico es útil para comparar el contenido de ADN por genoma en especies con diferentes niveles de ploidía. También nos permite analizar el ADN genómico entre especies con distinto número cromosómico ( $2n=20$ ;  $2n=40$  y  $2n=60$ ).

A partir de los valores de contenido de ADN obtenidos, se calculó el valor del contenido de ADN por genoma básico (Cx) para todas las especies analizadas. El valor Cx, representa el contenido de ADN de un genoma monoploide no replicado, el cual se obtiene dividiendo el valor 2C por el nivel de ploidía, en este caso se lo dividió por 2x, 4x y 6x. Luego, utilizando el factor de conversión 978, se convirtieron los pg (picogramos) a Mpb (mega pares de bases), para obtener el tamaño del genoma en Mpb (de acuerdo con Doležal et al. (2003)). Este valor varió de 1085 Mbp (*A. gyrans*) a 1271 Mbp (*A. macrothrix*) en las especies diploides; 802 Mpb en el tetraploide (*A. gayanus*) y de 919 Mpb (*A. exaratus*) a 1017 Mbp (*A. gerardii*, *A. latrealis* y *A. hypogynus*) en las especies hexaploides (Tabla 9).

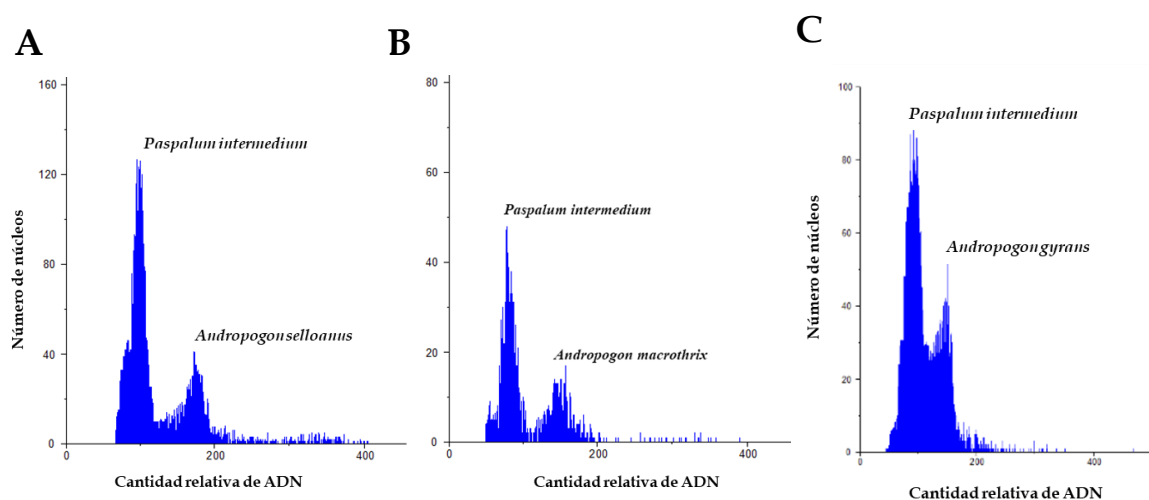
Para relacionar el número de cromosomas de cada especie con el contenido de ADN del genoma básico Cx (pg), se confeccionó un Diagrama de dispersión donde, en el eje de las abscisas, se indicó el número de cromosomas de cada entidad analizada y en el eje de las ordenadas el Valor Cx (pg) (Figura 54).



Se comparó el contenido de ADN (2C) y el contenido de ADN por genoma básico (Cx) con algunos parámetros del cariotipo. Para lo cual se confeccionaron Diagramas de dispersión en uno de los cuales se relacionó el contenido de ADN 2C (pg) con la longitud total del cariotipo ( $\mu\text{m}$ ) (Figura 55) y en otro diagrama el contenido de ADN por genoma básico Cx (pg) con la longitud media del cariotipo ( $\mu\text{m}$ ) (Figura 56).

**Tabla 9: Nivel de ploidía, contenido relativo de ADN valor 2C (pg), contenido de ADN por genoma básico Cx (pg), valor de Cx (Mbp); patrones de referencia internospertenecientes a diferentes secciones del género *Andropogon*. Referencias:** Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas de los valores promedio del contenido de ADN ( $p<0,05$ ), obtenidos por el test de Tukey. **I:** *Paspalum intermedium*; **II:** *Paspalum dilatatum* spp. *flavescens* Q3952; **III:** *P. dilatatum* Chiru biotipo. **SE:** error estándar; **pg:** picogramos; **Mpb:** mega pares de bases.

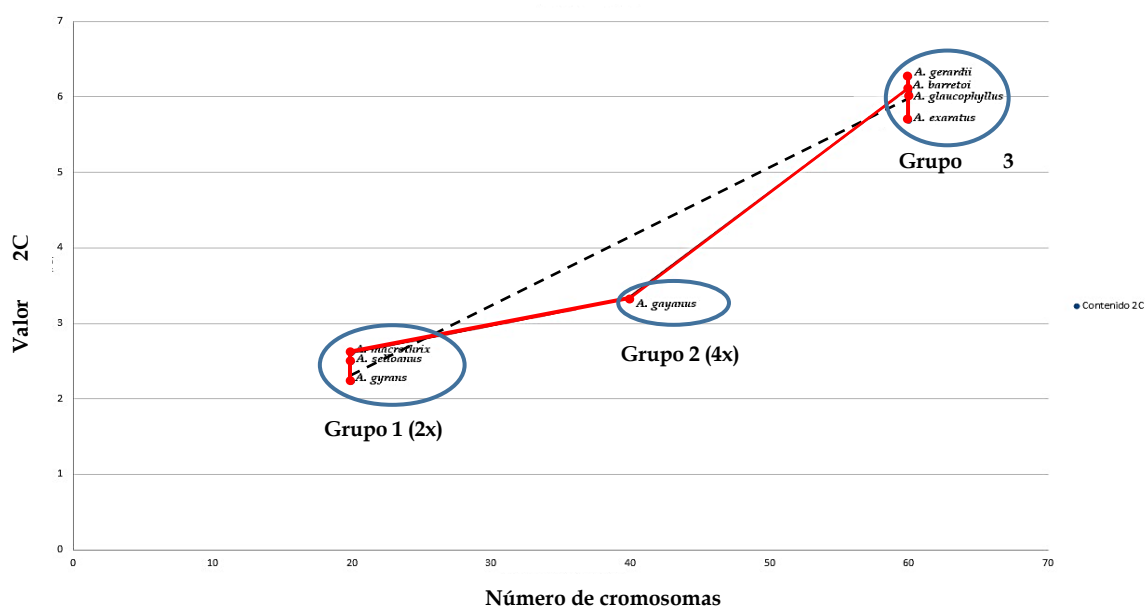
Especie	2n	2C $\bar{x}$ (pg) $\pm$ SE	Cx (pg)	Cx (Mbp)	Especie patrón	Sección
<i>A. gyrans</i>	2x	2,23 $\pm$ 0,02a	1,11	1085	I	<i>Leptopogon</i>
<i>A. selloanus</i>	2x	2,49 $\pm$ 0,02b	1,24	1212	I	<i>Leptopogon</i>
<i>A. macrothrix</i>	2x	2,61 $\pm$ 0,03c	1,30	1271	I	<i>Leptopogon</i>
<i>A. gayanus</i>	4x	3,31 $\pm$ 0,13d	0,82	802	II	<i>Notosolen</i>
<i>A. exaratus</i>	6x	5,69 $\pm$ 0,11e	0,94	919	III	<i>Notosolen</i>
<i>A. barretoii</i>	6x	6,07 $\pm$ 0,11e	1,01	987	III	<i>Notosolen</i>
<i>A. glaucophyllus</i>	6x	6,05 $\pm$ 0,11e	1,00	978	II	<i>Notosolen</i>
<i>A. gerardii</i>	6x	6,27 $\pm$ 0,11e	1,04	1017	III	<i>Andropogon</i>
<i>A. lateralis</i>	6x	6,27 $\pm$ 0,11e	1,04	1017	III	<i>Leptopogon</i>
<i>A. hypogynus</i>	6x	6,24 $\pm$ 0,11e	1,04	1017	III	<i>Leptopogon</i>
<b>ANOVA</b>				<b>(F=86,76; p-valor=&lt;0,0001)</b>		



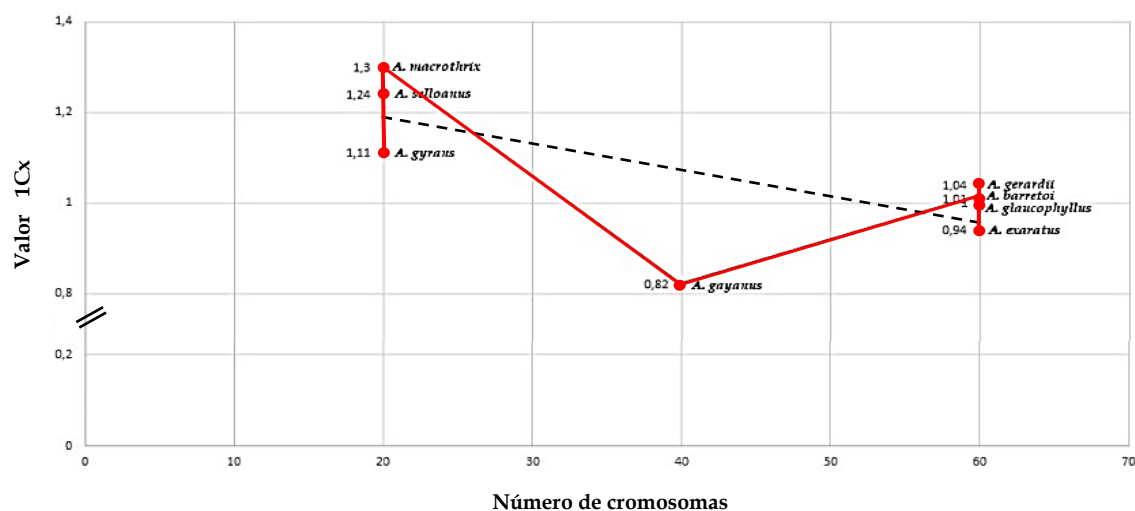
**Figura 52:** Histogramas de contenido relativo de ADN de las especies diploides de *Andropogon* analizadas, obtenidos por citometría de flujo de núcleos teñidos con PI. A. *A. selloanus*. B. *A. macrothrix*. C. *A. gyrans*. En cada histograma el pico de la izquierda representa a la especie utilizada como patrón de referencia (*Paspalum intermedium*).

**Tabla 10:** Parámetros cariotípicos utilizados en los análisis de correlación con los valores de contenido de ADN.

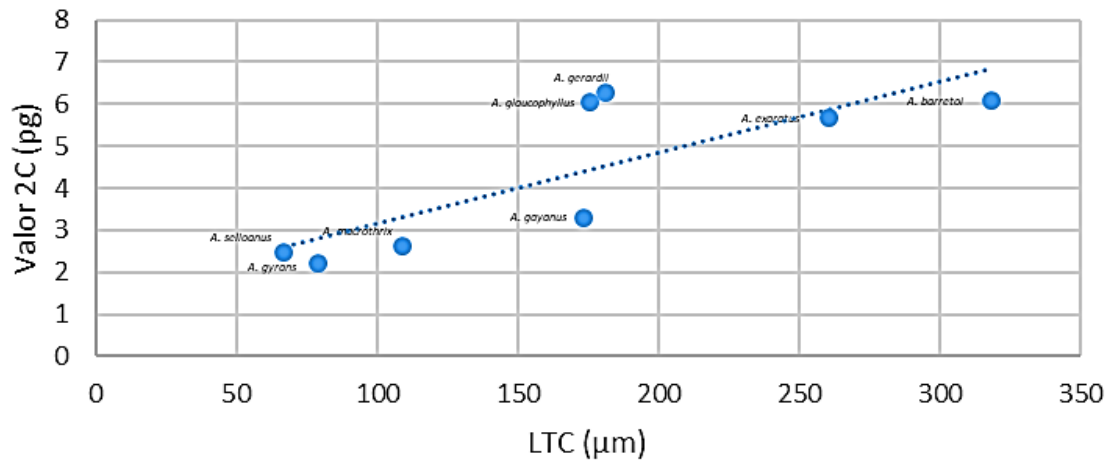
Especie	2n	LTC ( $\mu\text{m}$ )	LCM ( $\mu\text{m}$ )	2C $\bar{x}$ (pg)	Cx (pg)
<i>A. gyrans</i>	2x	75,24	3,76	2,23	1,11
<i>A. selloanus</i>	2x	64,25	3,21	2,49	1,24
<i>A. macrothrix</i>	2x	101,40	5,07	2,61	1,30
<i>A. gayanus</i>	4x	173,46	4,33	3,31	0,82
<i>A. exaratus</i>	6x	260,72	4,35	5,69	0,94
<i>A. barretoii</i>	6x	318,50	5,30	6,07	1,01
<i>A. glaucophyllus</i>	6x	175,86	2,93	6,05	1,00
<i>A. gerardii</i>	6x	181,1	3,01	6,27	1,04



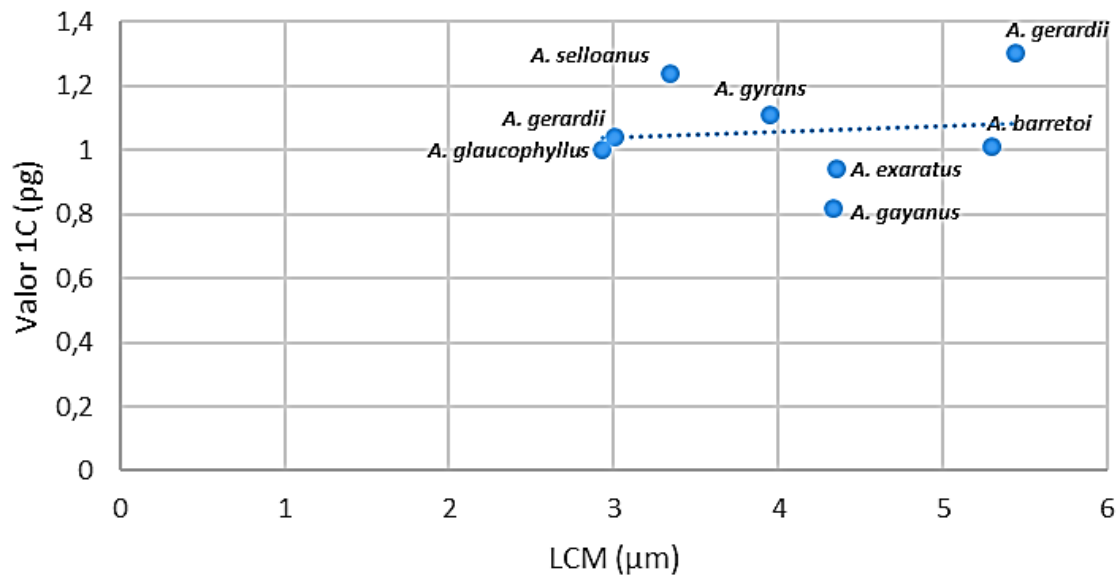
**Figura 53: Diagrama de dispersión. Relación entre el contenido relativo de ADN 2C en pg y el número de cromosomas.** La línea punteada representa la línea de tendencia. La línea roja une los puntos marcadores.



**Figura 54: Diagrama de dispersión. Relación entre el contenido de ADN en pg del genoma básico y el número de cromosomas.** La línea punteada representa la línea de tendencia. La línea roja une los puntos marcadores.



**Figura 55: Correlación entre el contenido de ADN 2C (pg) y la Longitud Total del Cariotipo (μm).** La línea punteada representa la línea de tendencia,  $r=0,80$ .



**Figura 56: Correlación entre el contenido de ADN por genoma básico en pg y la Longitud Media del Cariotipo (μm).** La línea punteada representa la línea de tendencia,  $r=0,80$ .

## Citogenética Molecular

### Mapeo cromosómico de los genes del ADNr 45S por FISH

Para detectar y mapear las zonas de ADN ribosomal en experimentos de FISH, se utilizó como sonda la secuencia ADN ribosomal 45S de *Triticum aestivum*.

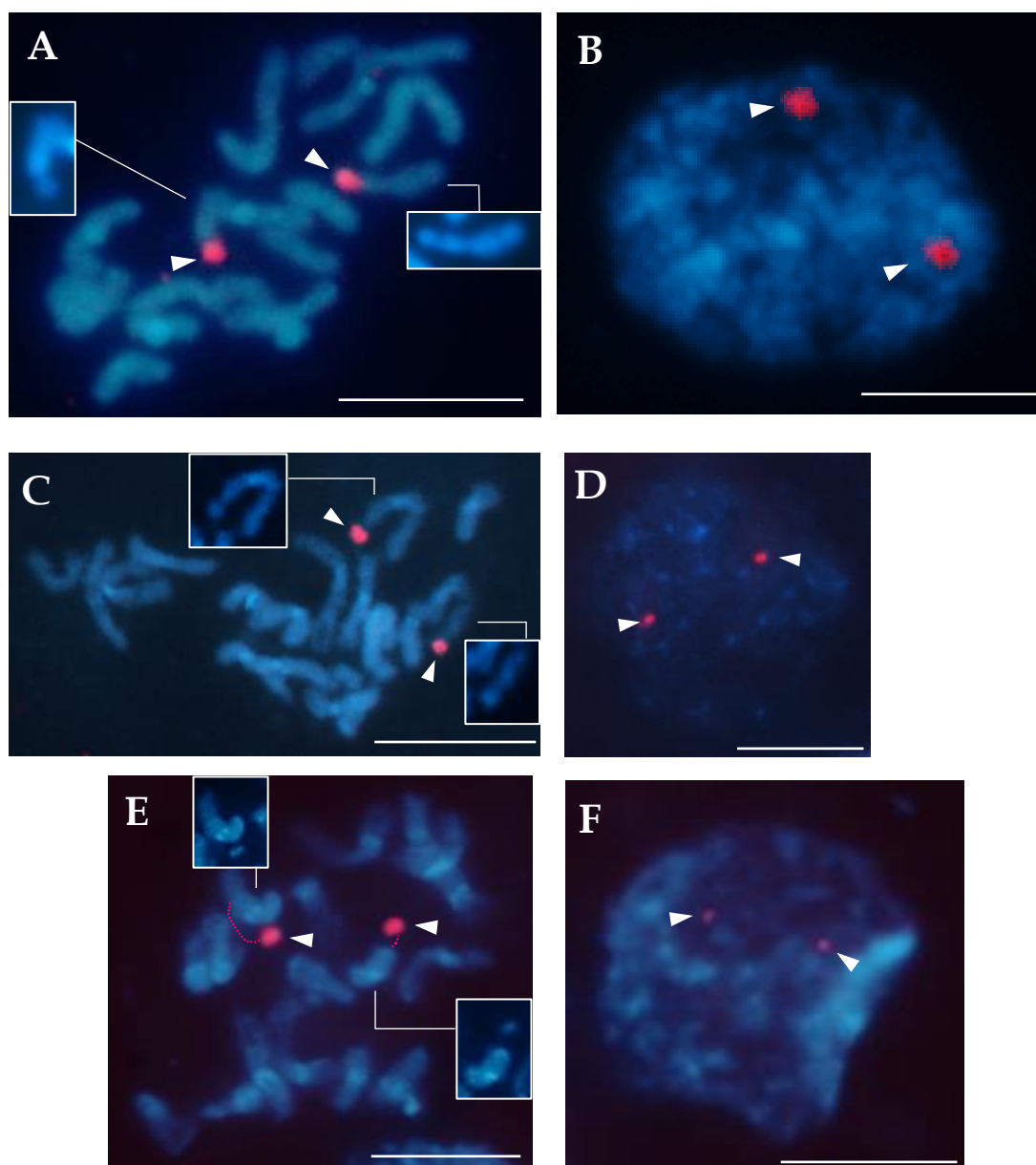
Con esta sonda marcada con biotina, se hibridó sobre cromosomas mitóticos y núcleos interfásicos de *A. selloanus*, *A. macrothrix*, *A. gyrans*.

En estas especies se observaron dos señales de hibridación ubicadas sobre los brazos cortos de cromosomas metacéntricos (Figura 57 A, C y E).

Los resultados de estos experimentos mostraron que el número, posición y tamaño de los *loci* que ocupa el gen de ADN ribosomal 45S, no difiere entre las especies diploides estudiadas. Estos *loci* se corresponden con el número de cromosomas con satélites.

En las tres especies diploides analizadas, las señales se presentan con elevada intensidad y nitidez, tanto en las células mitóticas como en los núcleos interfásicos (Figura 57 B, D y F). El tamaño de los *loci* que ocupa el gen de ADNr 45S es conservado para las tres especies, presentando un rango de 0,4  $\mu\text{m}$  – 0,45  $\mu\text{m}$ .

Para la detección de los sitios de ADNr 5S, se utilizaron las mismas condiciones de hibridación que para la detección de los sitios de ADN 45S, sin embargo, las señales que se observaron fueron débiles en todas las especies analizadas, lo que dificultó que las mismas fueran fotografiadas. Esto, quizá, se deba a que las secuencias 5S son de pequeño tamaño (poseen un menor número de repeticiones del gen ADNr 5S) y con una fluorescencia muy débil, dificultándose su observación y su permanencia en fluorescencia.



**Figura 57: Hibridación *in situ* fluorescente con sonda del gen ADNr 45S en las especies diploides analizadas de *Andropogon*. A-B:** Cromosomas mitóticos y núcleo interfásico de *A. selloanus*. **C-D:** Cromosomas mitóticos y núcleo interfásico de *A. macrothrix*. **E-F:** Cromosomas mitóticos y núcleo interfásico de *A. gyrans*. Todas las células fueron hibridadas con la secuencia del gen de ADNr 45S de *Triticum aestivum* marcada con biotina y revelada con de antibiotina (Cy3). Las cabezas de flechas indican los sitios de hibridación de la sonda. La línea roja punteada une la constricción secundaria con la porción de su respectivo brazo cromosómico. Contratinción con DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.

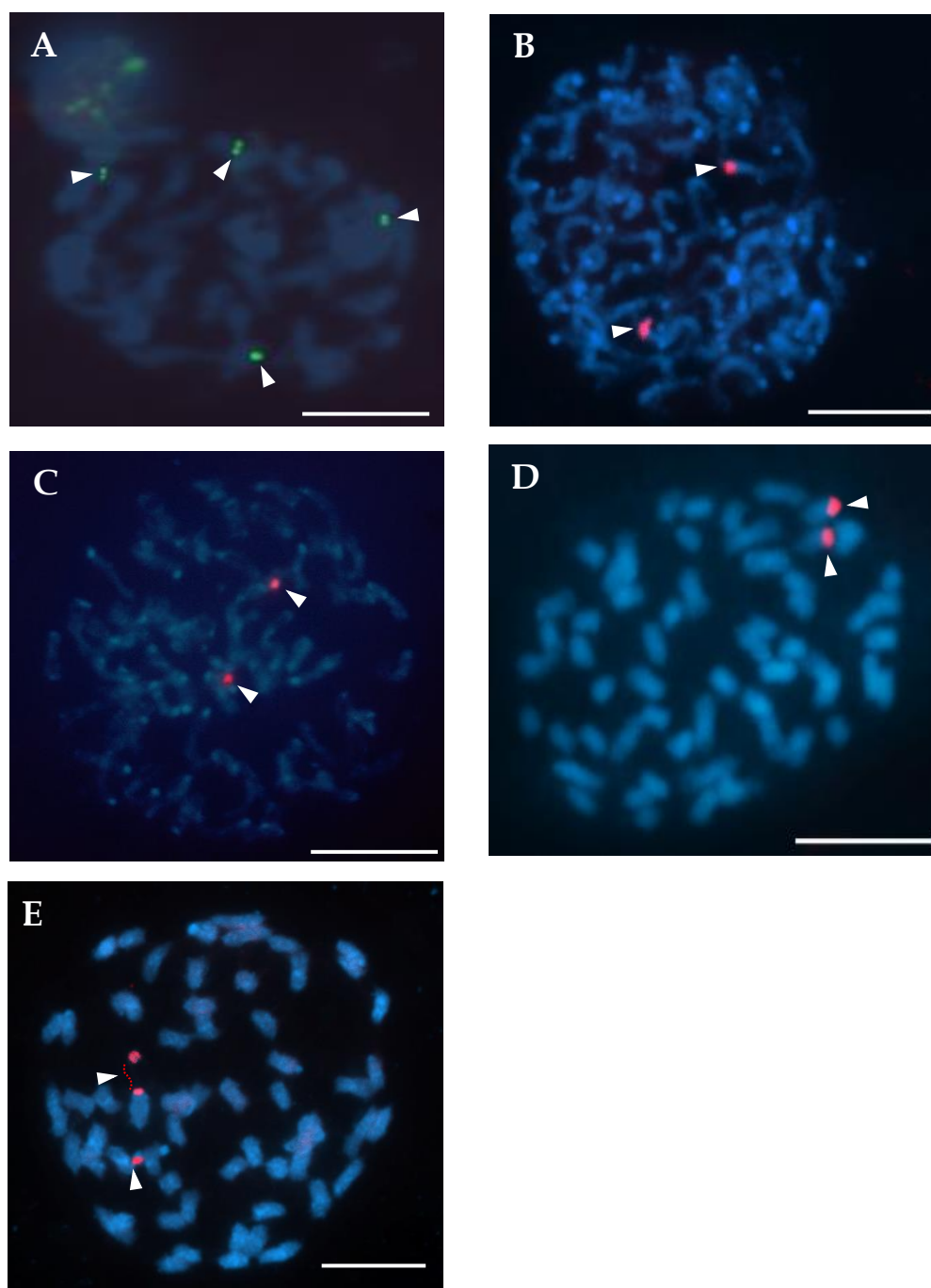
Utilizando como sonda la secuencia de ADN ribosomal 45S de *Triticum aestivum* marcada con digoxigenina, se hibridó sobre cromosomas mitóticos de *A. gayanus*, observándose cuatro señales con buena definición, un par de señales de tamaño más pequeño que las otras (0,20  $\mu\text{m}$  - 0,22  $\mu\text{m}$  - 0,35  $\mu\text{m}$  y 0,59  $\mu\text{m}$ ) (Figura 58 A).

Con la sonda marcada con biotina se hibridó sobre cromosomas mitóticos de *A. barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*. En las especies hexaploides, se observó un par de *loci* de ADNr 45S (Figura 58 B, C, D y E).

Si bien en la mayoría de estas especies, los *loci* de ADNr 45S fueron mapeados en posición terminal y siempre se observaron localizados en el brazo cromosómico corto, en la región de la constricción secundaria. En *A. gerardii*, una de las señales se localizó en la región terminal de un cromosoma y la otra señal en la región proximal de su respectivo brazo cromosómico (Figura 58 E).

La elevada intensidad de las señales y el tamaño de los *loci* de ADNr 45S fue semejante en las especies hexaploides: *A. barretoii* (0,89  $\mu\text{m}$  - 0,93  $\mu\text{m}$ ); *A. exaratus* (0,86  $\mu\text{m}$  - 1,08  $\mu\text{m}$ ); *A. glaucophyllus* (0,96  $\mu\text{m}$  - 1,04  $\mu\text{m}$ ) y *A. gerardii* (0,86  $\mu\text{m}$  - 0,89  $\mu\text{m}$ ).





**Figura 58: Hibridación *in situ* fluorescente con sonda de ADNr 45S en las especies poliploides analizadas de *Andropogon*. Cromosomas mitóticos de A: *A. gayanus*. B: *A. barretoii*. C: *A. exaratus*. D: *A. glaucophyllus*. E: *A. gerardii*. En A las células fueron hibridadas con la secuencia del gen de ADNr de 45 S de *Triticum aestivum* marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenina (FITC). En B-C-D-E las células fueron hibridadas con la secuencia del gen de ADNr 45 S de *Triticum aestivum* marcada con biotina y revelada con antibiotina (Cy3). Las flechas señalan las zonas de hibridación. La línea roja punteada une la constricción secundaria con la porción de su respectivo brazo cromosómico. Contratinción con DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.**

**Experiencias de Hibridación *in situ* genómica (GISH).****Afinidades genómicas entre especies de *Andropogon*.**

Para el estudio de las afinidades genómicas entre las especies de *Andropogon*, se diseñaron distintas experiencias mediante Hibridación *in situ* genómica total entre las especies de diferentes secciones y diferentes niveles de ploidía, que se detallan a continuación:

**Tabla 11: Diferentes combinaciones de experiencias de Hibridación *in situ* genómica realizadas entre especies de diferentes niveles de ploidía y secciones.**

Sondas diploides	Preparados cromosómicos	Sonda triploide	Preparados cromosómicos
<i>A. selloanus</i>	<i>A. gyrans</i> (2x)	<i>A. ternatus</i>	<i>A. gayanus</i> (4x)
	<i>A. ternatus</i> (3x)		
	<i>A. gayanus</i> (4x)		
	<i>A. exaratus</i> (6x)		
	<i>A. glaucophyllus</i> " "		
	<i>A. barretoii</i> " "		
	<i>A. gerardii</i> " "		
<i>A. macrothrix</i>	<i>A. selloanus</i> (2x)		
	<i>A. ternatus</i> (3x)		
	<i>A. ternatus</i> " "		
<i>A. gyrans</i>	<i>A. ternarius</i> (4x)		
	<i>A. gayanus</i> " "		
	<i>A. gerardii</i> (6x)		

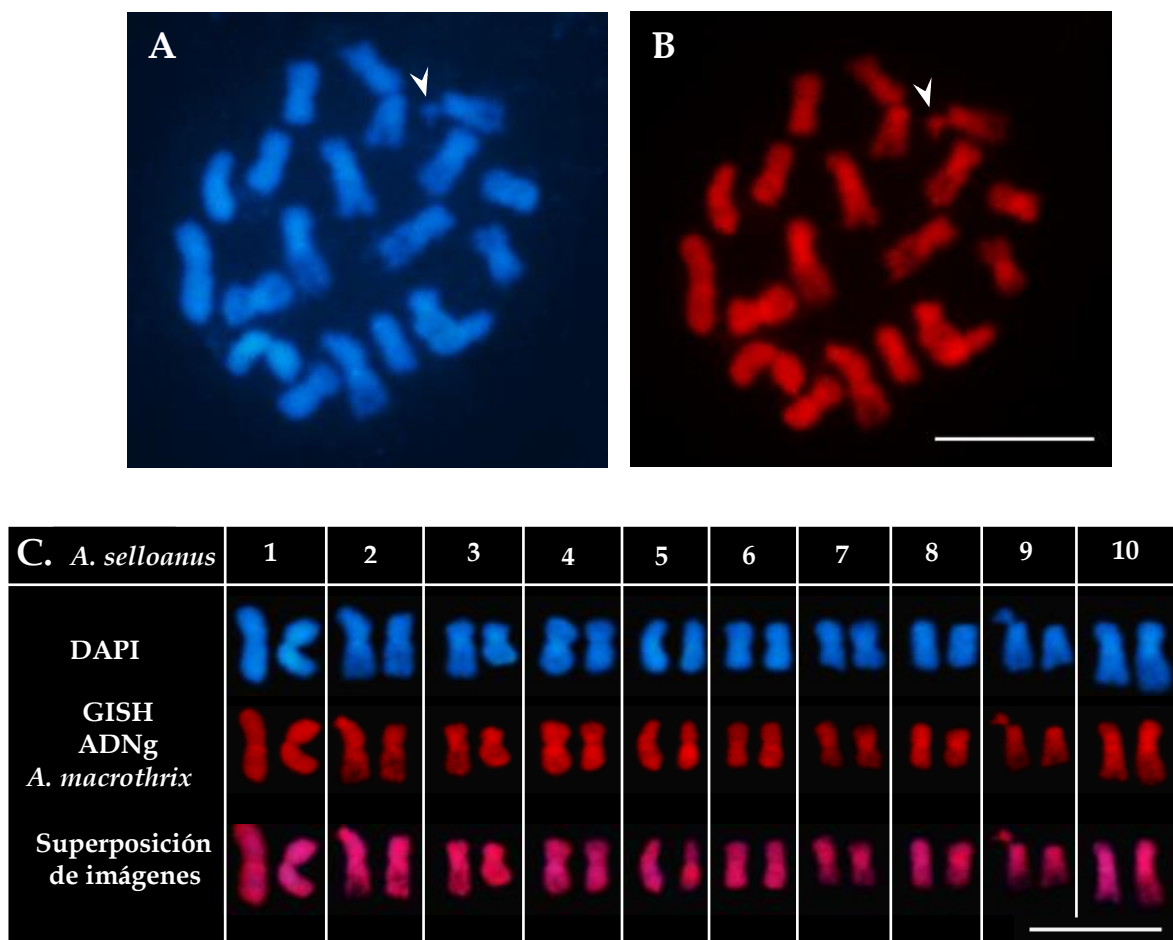
Sondas tetraploide	Preparados cromosómicos
<i>A. gayanus</i>	<i>A. ternarius</i> (4x)
	<i>A. glaucophyllus</i> (6x)
<i>A. ternarius</i>	<i>A. gerardii</i> " "

---

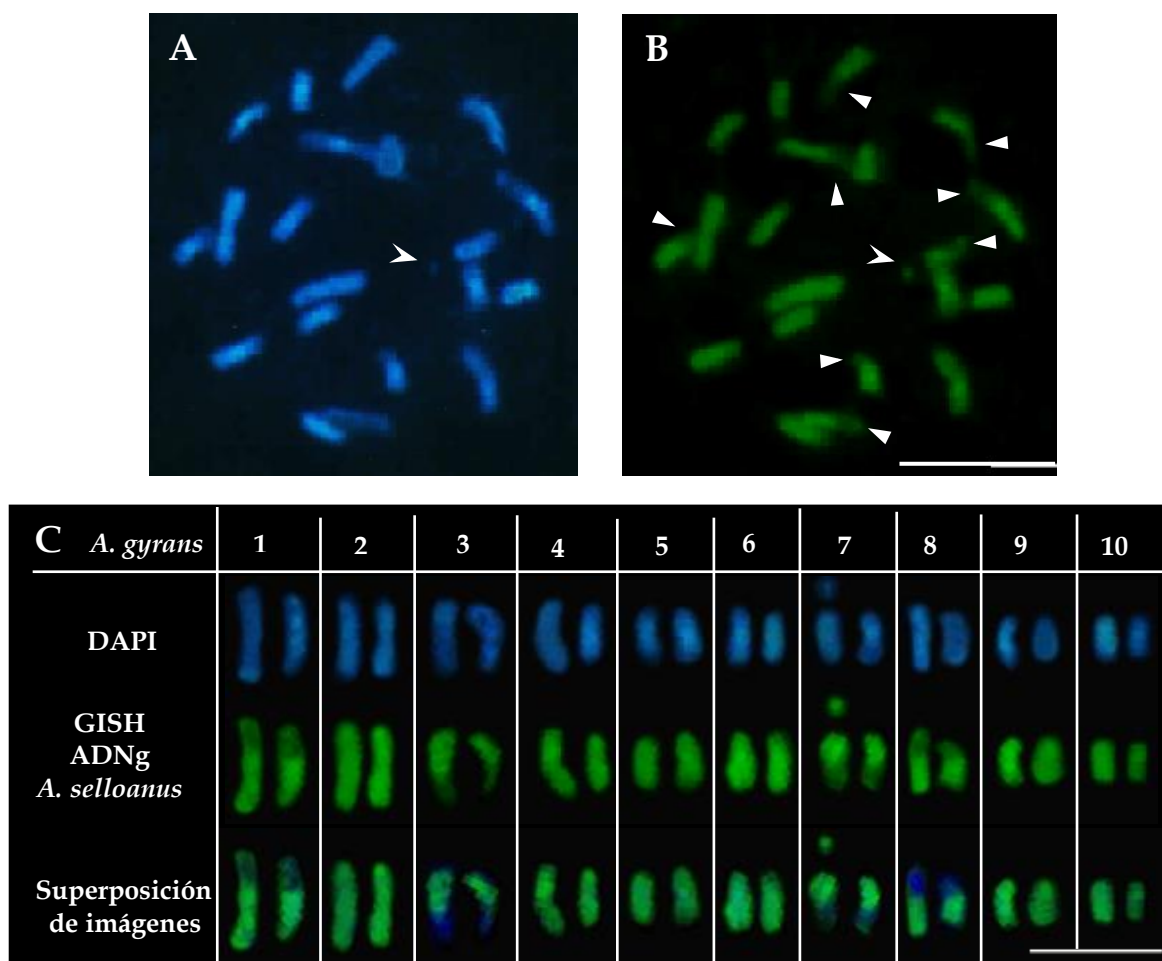
**Afinidades genómicas entre las especies diploides del género *Andropogon*, sección *Leptopogon*.**

La Hibridación *in situ* utilizando como sonda ADN<sub>g</sub> total de *Andropogon macrothrix* marcado con biotina, sobre cromosomas mitóticos de *A. selloanus* (Figura 59 B), reveló que, si bien se observó señal de hibridación en los 20 cromosomas, dos pares presentaron un patrón de hibridación uniforme en todo el largo del cromosoma (Figura 59 C, par de cromosomas 1 y 4). En el resto del complemento, el patrón de hibridación es más uniforme en uno de los brazos cromosómicos, extendiéndose a la región centromérica y a la región pericentromérica del otro brazo, siendo en este brazo, menos uniforme. En la constricción secundaria, se observó intensa señal de hibridación (Figura 59 A, B y C par de cromosomas 9).

También, se utilizó como sonda ADN<sub>g</sub> total de *A. selloanus* marcado con digoxigenina, sobre cromosomas mitóticos de *A. gyrans*, observándose que, de los 20 cromosomas, cuatro pares presentan un patrón de hibridación uniforme, en un solo brazo cromosómico siendo débil la señal en el otro brazo (Figura 60 B y C, pares cromosómicos 1, 3, 7 y 8); el resto del complemento, presentó un patrón de hibridación en bloque, uniforme a lo largo de ambos brazos. En la constricción secundaria, se observó un patrón de hibridación uniforme (Figura 60 C par cromosómico 7).



**Figura 59: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *Andropogon selloanus*. A.** Contratinción con DAPI. **B.** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. macrothrix*, marcado con biotina y detectado con Cy3. Las cabezas de flechas indican satélites. **C.** Cariograma de *A. selloanus* hibridado como muestra la columna de la izquierda. **Superposición de imágenes:** mostrando en color rosado, las regiones hibridadas. Barra 10 µm.



**Figura 60: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. gyrans*.** **A.** Contraintinción con DAPI. **B.** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. selloanus*, marcado con digoxigenina y detectado con antidigoxigenina-FITC. Las cabezas de flechas con muesca señalan satélite y las cabezas de flechas enteras indican señales de hibridación débil. **C. Cariograma** de *A. gyrans* hibridado como muestra la columna de la izquierda. **Superposición:** mostrando en verde claro, las regiones hibridadas. Barra 10  $\mu$ m.

### **Afinidades genómicas entre especies diploides y una especie triploide de la sección *Leptopogon*.**

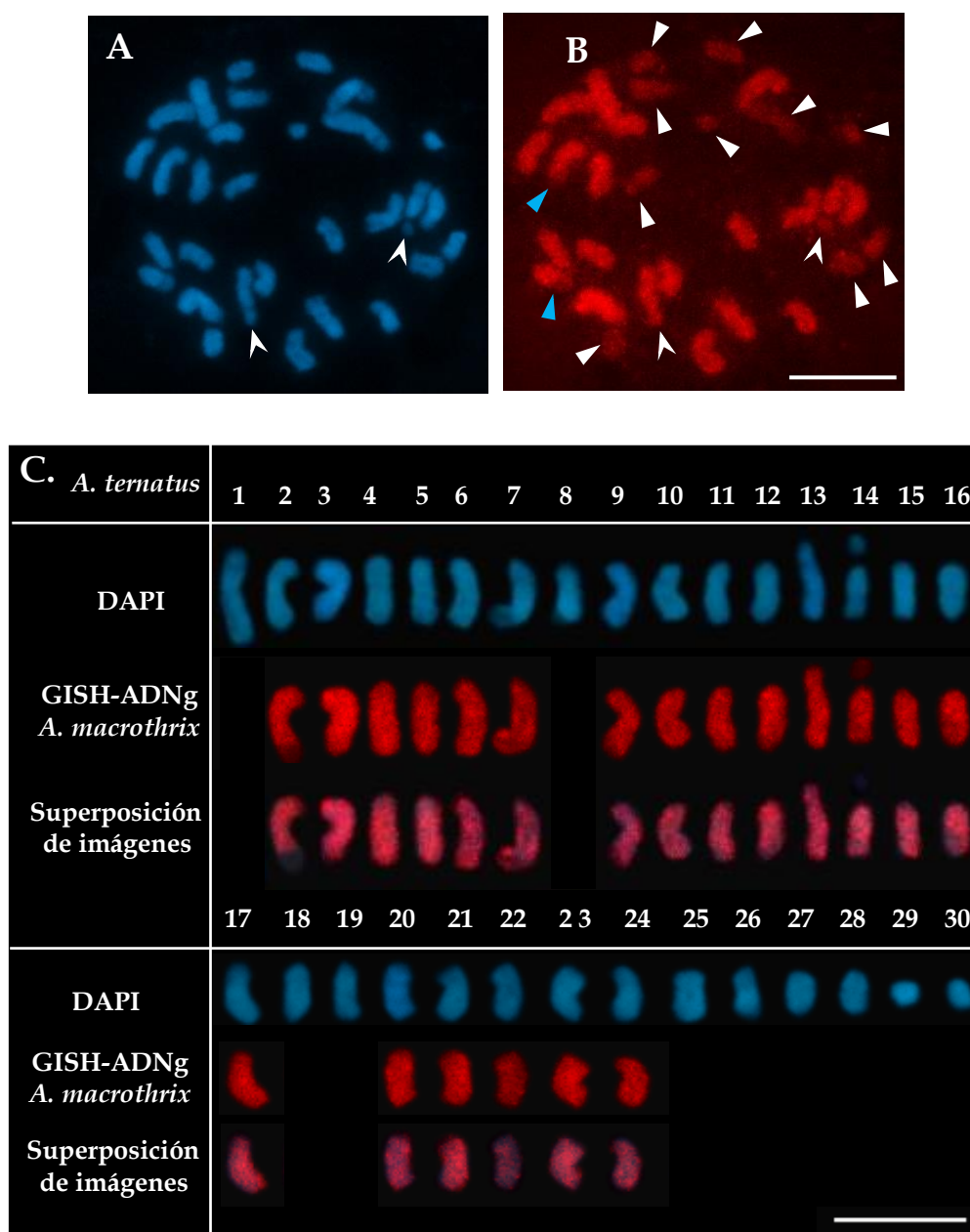
Se realizó una doble hibridación en el complemento cromosómico de *Andropogon ternatus* utilizando ADN genómico total de *A. macrothrix* marcado con biotina y de *A. gyrans* marcado con digoxigenina.

Los cromosomas de *A. ternatus*, al ser hibridados con ADNg de *A. macrothrix*, presentaron regiones de homología en al menos 20 cromosomas, manifestando un patrón de hibridación disperso y de diferentes intensidades (Figura 61 B y C). Entre ellos, se observó un par de cromosomas con patrón de hibridación en un brazo, extendiéndose hasta más de la mitad del otro brazo sin llegar al extremo (Figura 61 C, cromosoma 2 y 9), y un cromosoma con hibridación intensa en un brazo e inespecífica en el otro brazo (Figura 61 C, cromosomas 16). Si bien, al observar la Figura 61 B, pareciera que todos los cromosomas hibridan, al superponer esta imagen sobre la imagen con tinción DAPI, se observó que la sonda utilizada, encuentra regiones homólogas muy dispersas a lo largo de los cromosomas, intensificándose más en algunas de ellas. En el par de constricciones secundarias, se observó que una de ellas presenta un patrón de hibridación débil, (Figura 61 C: cromosoma 13), mientras que la otra constricción no (Figura 61 C: cromosoma 14).

Al utilizar ADNg de *A. gyrans* como sonda sobre el complemento cromosómico de *A. ternatus* (Figura 62 A, B y C), se observaron 22 cromosomas que presentan regiones homólogas. Al menos catorce cromosomas con un patrón de hibridación uniforme e intenso y en toda su longitud (Figura 62 B y C). Cuatro cromosomas, con patrón de hibridación en un brazo (Figura 62 C: cromosomas 8, 16, 21, 24); dos cromosomas con patrón de hibridación en uno de los brazos, extendiéndose hasta más de la mitad del otro brazo, pero sin llegar al extremo (Figura 62 C, cromosomas 2 y 9); un cromosoma presenta un patrón de hibridación en un brazo y en el extremo distal del otro brazo (Figura 62 C, cromosoma 6); un cromosoma con patrón de hibridación en bandas, con señal subtelomérica e intersticial en el brazo corto (Figura 62 C, cromosoma 1). En las constricciones secundarias se observó una señal de hibridación muy débil, casi imperceptible (Figura 62 C, cromosomas 13 y 14). En el resto de los cromosomas del complemento no se observó señal de hibridación.

Al superponer las imágenes de las hibridaciones con el ADNg de ambos diploides como sondas (Figura 63 A y B), se observaron cromosomas mostrando homología ya sea, en ambos brazos de los cromosomas, en solamente uno de los brazos o en segmentos de cromosomas. Sin embargo, se puede observar regiones cromosómicas de color rojo, que corresponden a secuencias de *A. macrothrix* que encontraron homología en *A. ternatus*, pero que no son homólogas con *A. gyrans*; y regiones cromosómicas de color verde con un patrón de bandas, las cuales corresponden a secuencias de *A. gyrans* que encontraron homología en *A. ternatus*. Al menos 8 cromosomas del complemento de *A. ternatus*, no presentaron homología con las sondas diploides utilizadas.

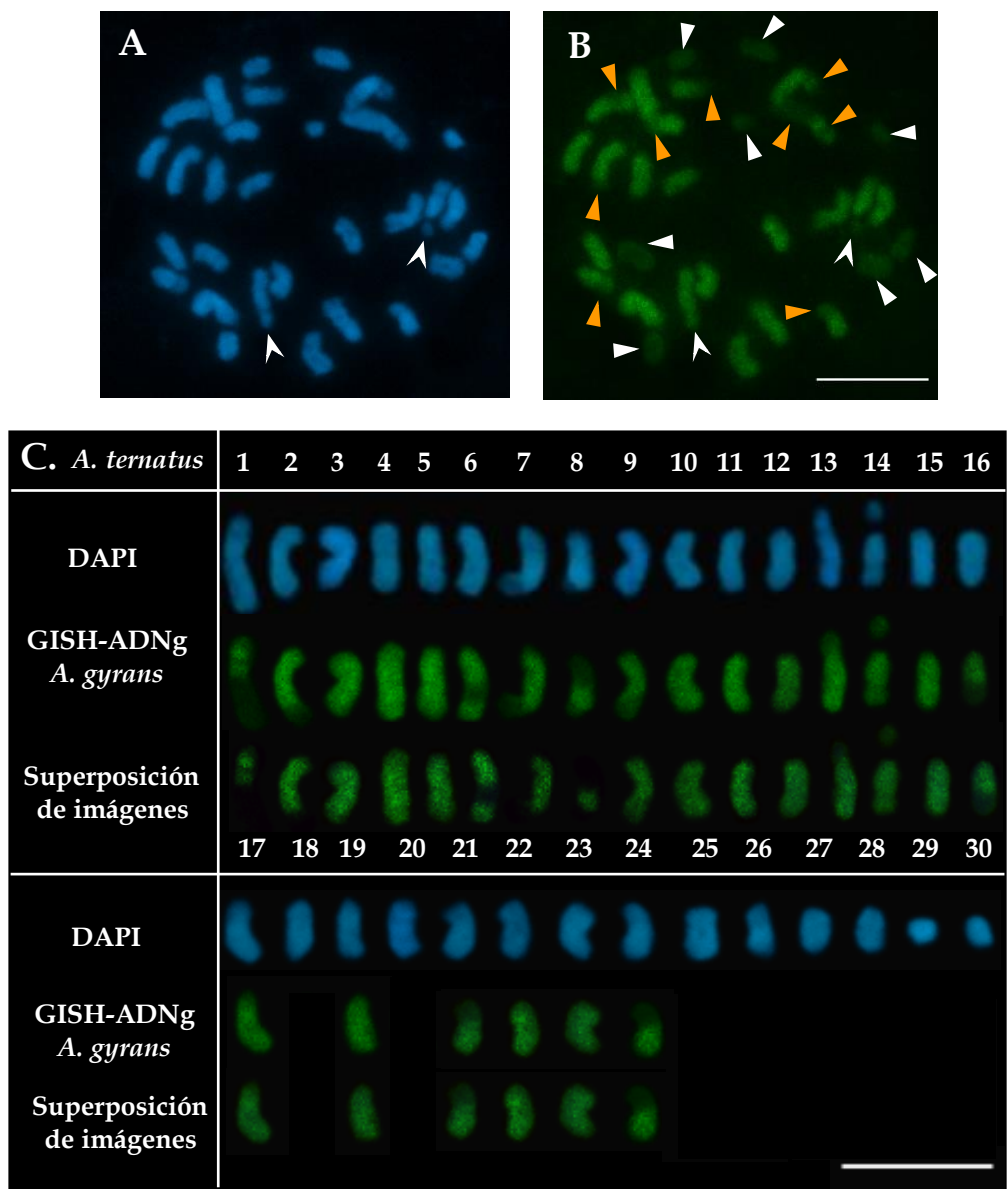
Al utilizar el ADNg de *Andropogon selloanus* como sonda, sobre el complemento cromosómico de *A. ternatus* (Figura 64 A y B), se observaron regiones de homología en, al menos 20 cromosomas. En la mayoría de estos cromosomas, las señales de hibridación coincidieron con las regiones ricas en heterocromatina. De los cromosomas con señales de hibridación, al menos diez presentaron un patrón de hibridación homogéneo y uniforme con intensa señal a lo largo del cromosoma (Figura 64 B). Otros diez cromosomas muestran señal de homología en regiones ricas en heterocromatina, presentando un patrón de hibridación en bloque en un brazo cromosómico, en regiones pericentroméricas y con forma de bandas en las regiones teloméricas. En las regiones organizadoras nucleolares, se observó intensa señal de hibridación con la sonda utilizada.



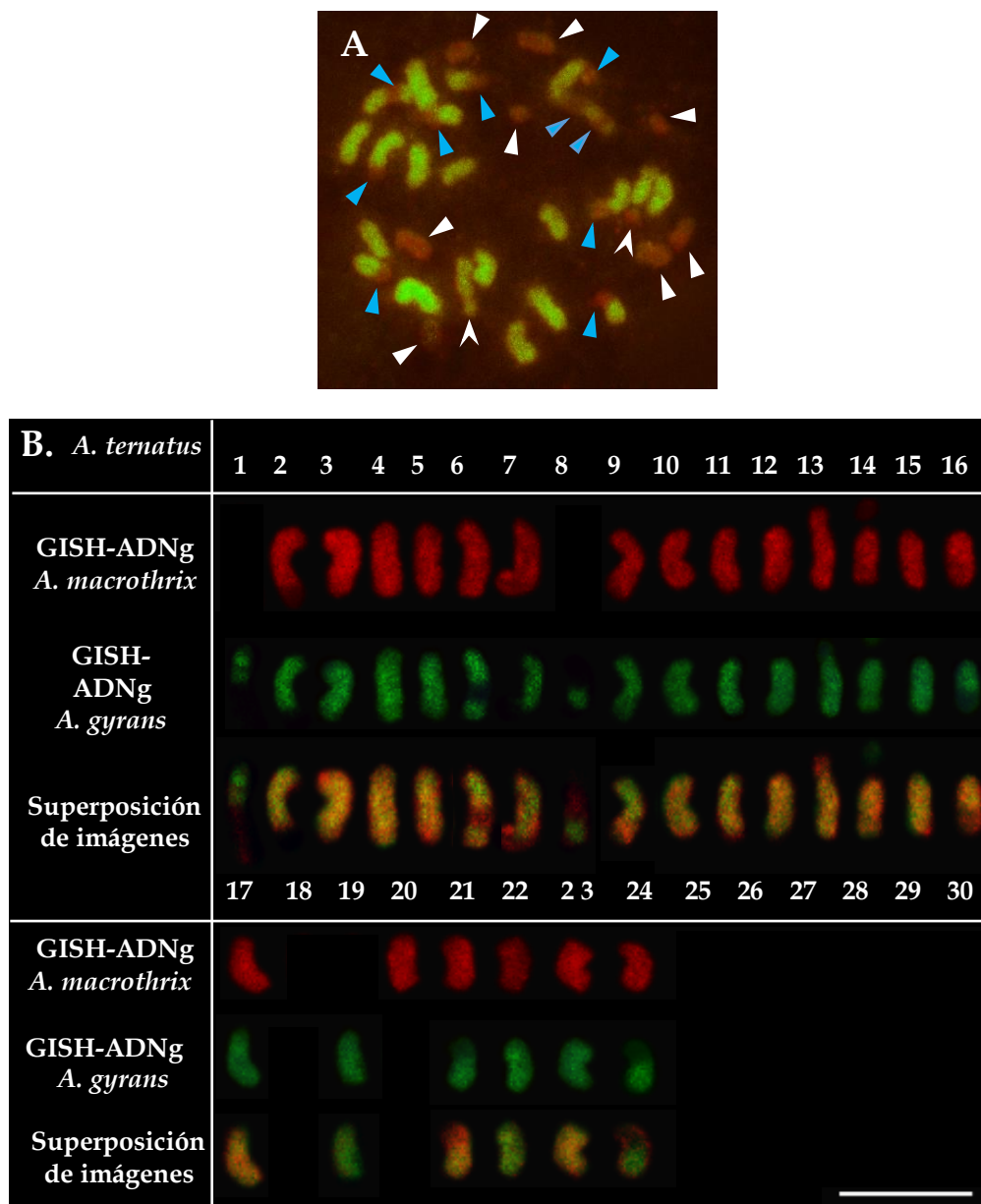
**Figura 61: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. ternatus*.**

**A:** Contraintinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. macrothrix*, marcado con biotina y detectado con Cy3. Las cabezas de flechas con muesca, indican satélites; las cabezas de flechas blancas cromosomas no hibridados con *A. macrothrix*; las cabezas de flechas celestes indican regiones cromosómicas no hibridadas. **C. Cariograma de *A. ternatus*,** hibridados como muestra la columna de la izquierda. En DAPI se observan los 30 cromosomas ordenados por tamaño de mayor a menor. En Biotina y en la superposición de imágenes, sólo se representaron los cromosomas que mostraron señales de hibridación (color rosado). Barra 10 µm.



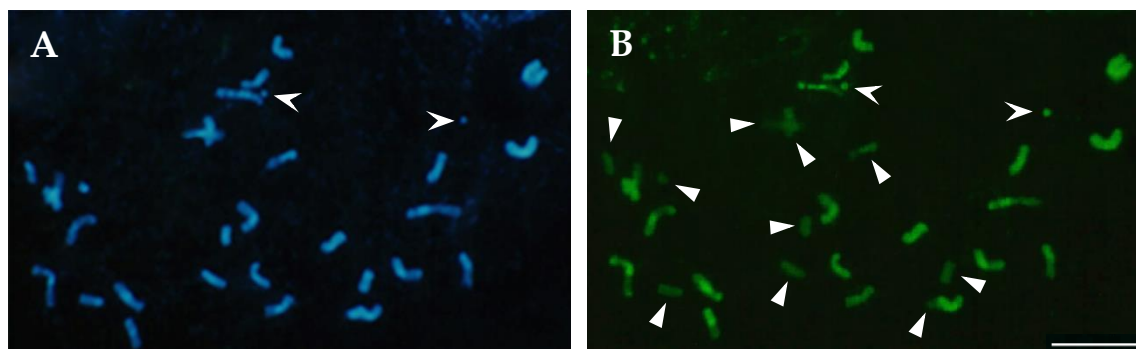


**Figura 62: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. ternatus*.**  
**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. gyrans*, marcado con digoxigenina y detectado con antidigoxigenina-FITC. Las cabezas de flechas blancas con muesca, indican satélites; las cabezas de flechas blancas enteras indican cromosomas no hibridados; las cabezas de flechas anaranjadas indican regiones cromosómicas no hibridadas.  
**C. Cariograma de *A. ternatus*** hibridados como muestra la columna de la izquierda. En DAPI se representan los 30 cromosomas ordenados por tamaño de mayor a menor. En Digoxigenina y en la superposición de imágenes, sólo se representaron los cromosomas que mostraron señales de hibridación (color verde). Barra 10  $\mu$ m.



**Figura 63: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. ternatus*.**

**A:** Doble exposición con sonda de *A. macrothrix* (biotina) y *A. gyrans* (digoxigenina): en anaranjado se observan las regiones hibridadas por ambas sondas. Las cabezas de flechas con muesca blancas indican las satélites; las cabezas de flechas celestes indican brazos y partes de cromosomas no hibridados por *A. gyrans*; las cabezas de flechas blancas cromosomas enteros no hibridados por *A. gyrans*. **B: Cariograma de *A. ternatus*.** En Biotina se representaron los cromosomas hibridados con la sonda de *A. macrothrix*; en Digoxigenina se representaron los cromosomas hibridados con la sonda de *A. gyrans*; en la superposición de imágenes, sólo se representaron los cromosomas que mostraron señales de hibridación con ambas sondas (color anaranjado). Los cromosomas se ordenaron por tamaño de mayor a menor. Barra 10 µm.



**Figuraa 64: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. ternatus*.**

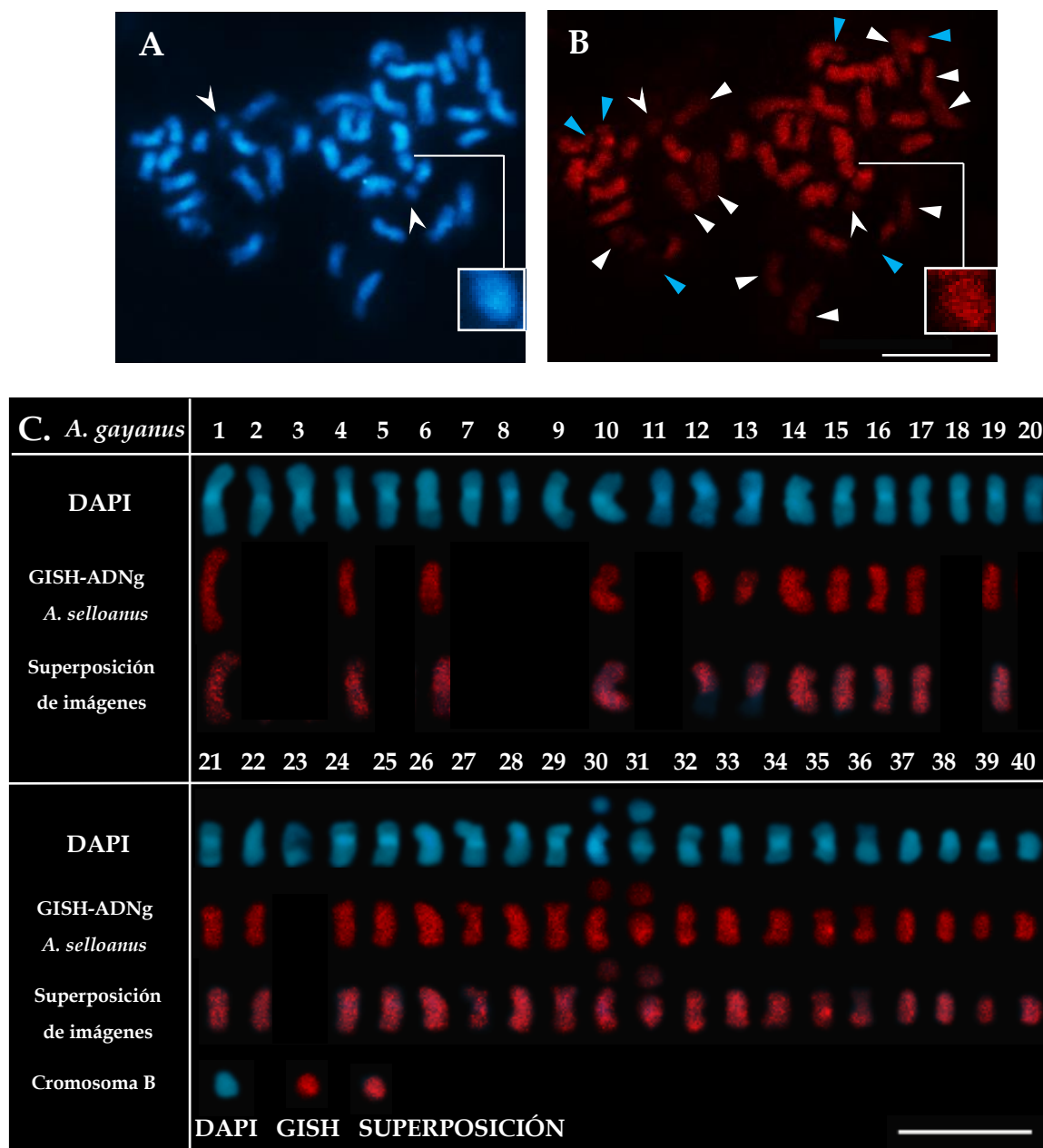
**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. selloanus*, marcado con digoxigenina y detectado con antidigoxigenina-FITC. La cabeza de flecha blanca con muesca, indica satélites; las cabezas de flechas blancas enteras, indican cromosomas no hibridados; las cabezas de flechas celestes indican segmentos o brazos de cromosomas no hibridados. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

---

**Afinidades genómicas entre especies diploides de la sección *Leptopogon* y una especie tetraploide de la sección *Notosolen*.**

La Hibridación *in situ* utilizando como sonda, ADN genómico total de *A. selloanus* marcado con biotina, sobre cromosomas mitóticos de *A. gayanus* (Figura 65 A, B y C), mostró que, al menos 10 cromosomas no presentaron señales de hibridación, revelando falta de afinidad entre estos cromosomas y la sonda utilizada. En el resto del complemento, se observó señal de hibridación en 20 cromosomas, los que mostraron un patrón de hibridación a lo largo de todo el cromosoma, aunque disperso y con diferentes intensidades (Figura 65 C, cromosomas 1, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 37, 38, 39, 40); diez cromosomas con señal de hibridación en un brazo o en una región de un brazo cromosómico, siendo en algunos casos coincidentes con regiones ricas en heterocromatina (Figura 65 C, cromosomas 4, 6, 10, 12, 13, 14, 27, 31, 35, 36).

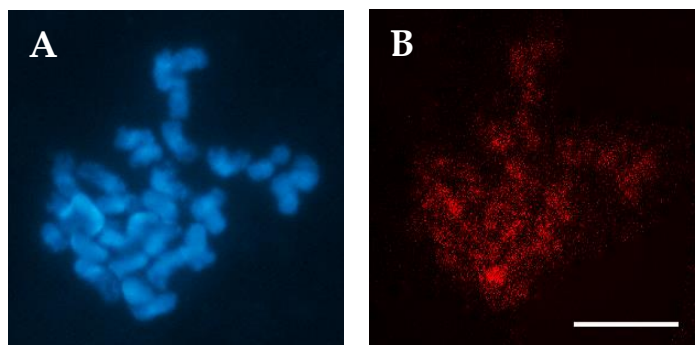
La superposición de imágenes, reveló que, el ADN genómico utilizado como sonda, encontró regiones de homología con secuencias componentes de algunos cromosomas del complemento de la especie tetraploide, presentando un patrón de hibridación poco homogéneo, de aspecto disperso a lo largo de los cromosomas, con variada intensidad, siendo las señales más intensas en ciertas regiones cromosómicas. Sin embargo, en las regiones cercanas al organizador nucleolar, la señal de hibridación fue muy débil y ausente en el par de constricciones secundarias, revelando que en estas zonas *A. gayanus*, posee menos secuencias homologas con el genoma de *A. selloanus* (Figura 65 A, B y C: cromosomas 30 y 31). El cromosoma accesorio B, presentó fuerte señal de hibridación, indicando alta afinidad entre sus secuencias componentes y el genoma de *A. selloanus*, (Figura 65 B y C).



**Figura 65: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. gayanus*.**

**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. selloanus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. Las cabezas de flechas blancas con muesca indican satélites; las cabezas de flechas blancas enteras indican cromosomas no hibridados; las cabezas de flechas celeste indican regiones cromosómicas con muy débil señal de hibridación. En detalle el cromosoma accesorio B. **C. Cariograma de *A. gayanus*** hibridados como muestra la columna de la izquierda. En DAPI se representaron los 40 cromosomas del complemento, ordenados por tamaño de mayor a menor y el cromosoma accesorio B. En Biotina, sólo se representaron los cromosomas que mostraron señales de hibridación (color rojo). **Superposición de imágenes:** mostrando en color rosado las regiones hibridadas. Barra 10 µm.

Utilizando como sonda ADN genómico total de *A. gyrans* marcado con biotina, sobre cromosomas mitóticos de *A. gyanus* (Figura 66 A y B), se observó fuerte señal de hibridación en la región rica en heterocromatina en muy pocos cromosomas del complemento. El resto de los cromosomas, no presentaron ese patrón de hibridación; en ellos la señal fue inespecífica y muy débil, lo que estaría indicando una baja afinidad entre las secuencias componentes de estos cromosomas y las del genoma de *A. gyrans*.

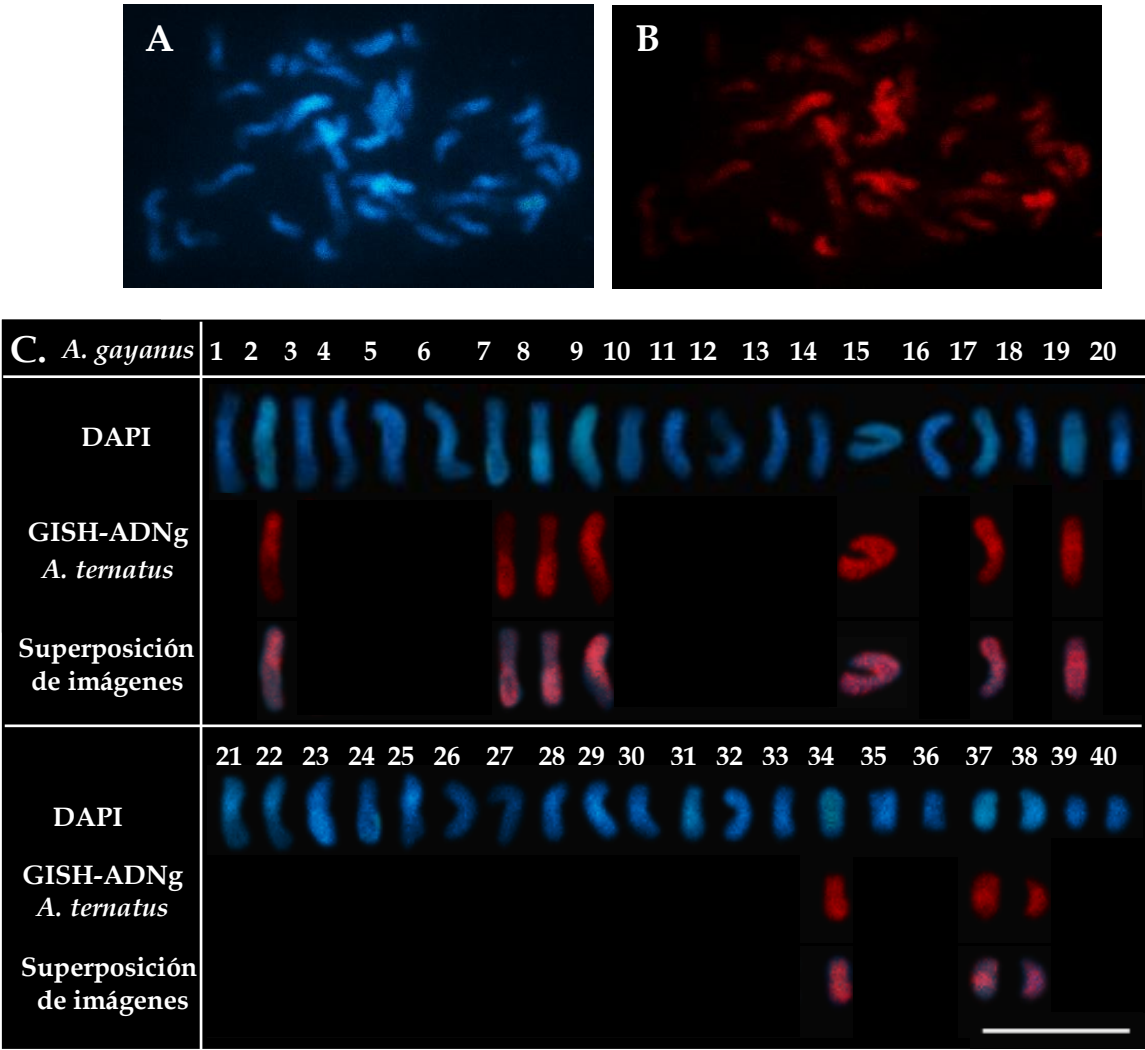


**Figura 66: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. gyanus*.**

**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. gyrans*, marcado con biotina y detectado con Cy3. Barra: 10  $\mu$ m.

Afinidades genómicas entre una especie triploide de la sección *Leptopogon* y una especie tetraploide de la sección *Notosolen*.

Al utilizar como sonda ADNg total de *Andropogon ternatus* sobre cromosomas mitóticos de *A. gayanus*, se observó un patrón de hibridación disperso e intenso en al menos 10 cromosomas. Un par de cromosomas, mostraron un patrón de hibridación de diferentes intensidades a lo largo de los mismos (Figura 67 C: cromosomas 15, 19, 34, 38); además, en seis cromosomas se observó una señal de hibridación en un solo brazo y en ciertas regiones cromosómicas, algunas de las cuales coincidieron con regiones ricas en heterocromatina (Figura 67 C: cromosomas 2, 7, 8, 9, 17, 37, 38).

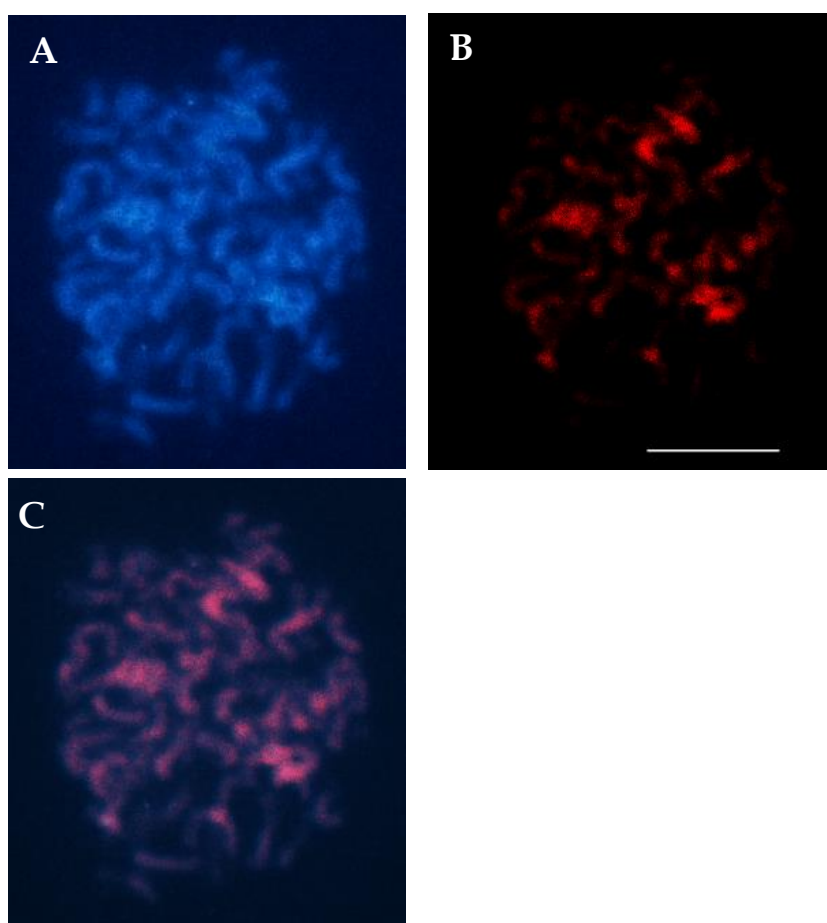


**Figura 67: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. gayanus*.**  
**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. ternatus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. **C. Cariograma de *A. gayanus*** hibridados. En DAPI se representaron los 40 cromosomas ordenados por tamaño de mayor a menor. En Biotina, sólo los cromosomas que mostraron hibridación (color rojo). **Doble exposición de imágenes:** mostrando en color rosado las regiones hibridadas. Barra 10  $\mu$ m.



**Afinidades genómicas entre una especie tetraploide de la sección *Leptopogon* y una especie tetraploide de la sección *Notosolen*.**

El complemento cromosómico de *Andropogon ternarius* al ser hibridado con ADN genómico de *A. gayanus*, presentó 6 señales de hibridación intensas, las cuales no son homogéneas en todo el largo de los cromosomas y 6 señales de menor intensidad, en regiones cromosómicas (Figura 68 A, B y C), coincidiendo algunas de estas últimas con regiones ricas en heterocromatina. En el resto del complemento de la especie tetraploide, no se observó homología con el ADN<sub>g</sub> utilizado con sonda.



**Figura 68: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. ternarius*.**

**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. gayanus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. **C. Superposición de imágenes:** mostrando en rosado, las regiones hibridadas. Barra 10  $\mu\text{m}$ .



---

**Afinidades genómicas entre una especie diploide de la sección *Leptopogon* y especies hexaploides de la sección *Notosolen*.*****Andropogon barretoii***

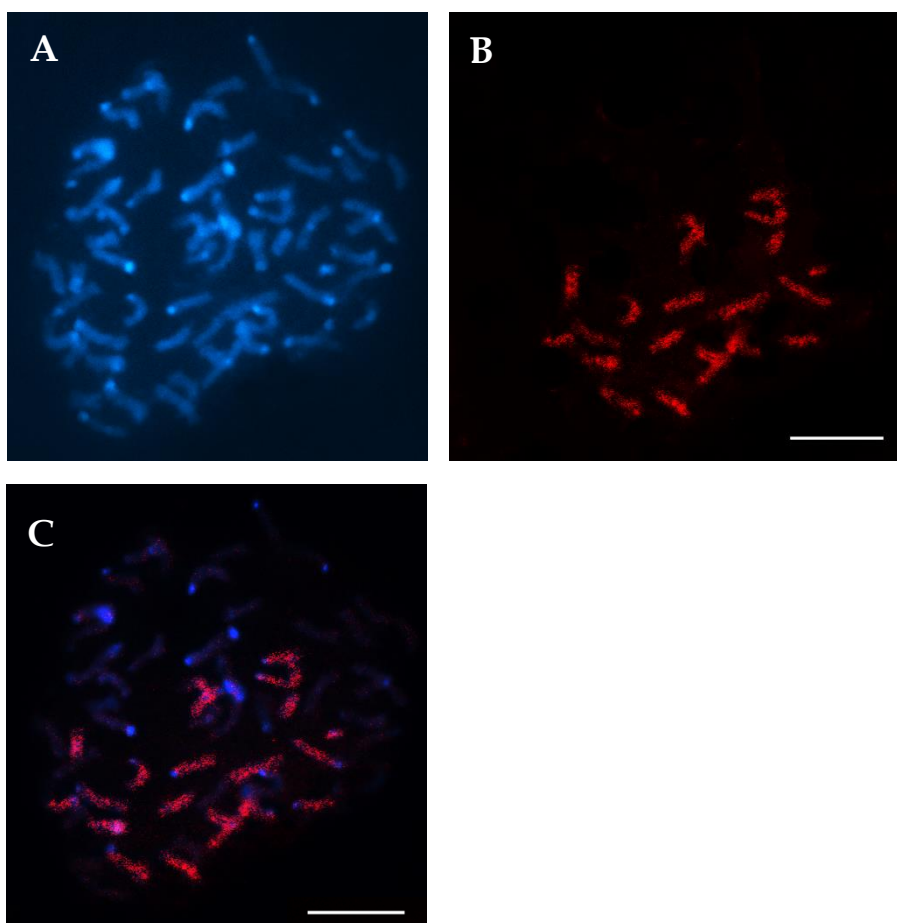
Al hibridar con ADN genómico total de *Andropogon selloanus* como sonda, marcado con biotina sobre cromosomas mitóticos de *A. barretoii*, se observó que, de los 60 cromosomas del complemento, al menos 20 cromosomas presentaron homología con la sonda utilizada, mostrando un patrón de hibridación disperso, con diferente intensidad de hibridación.

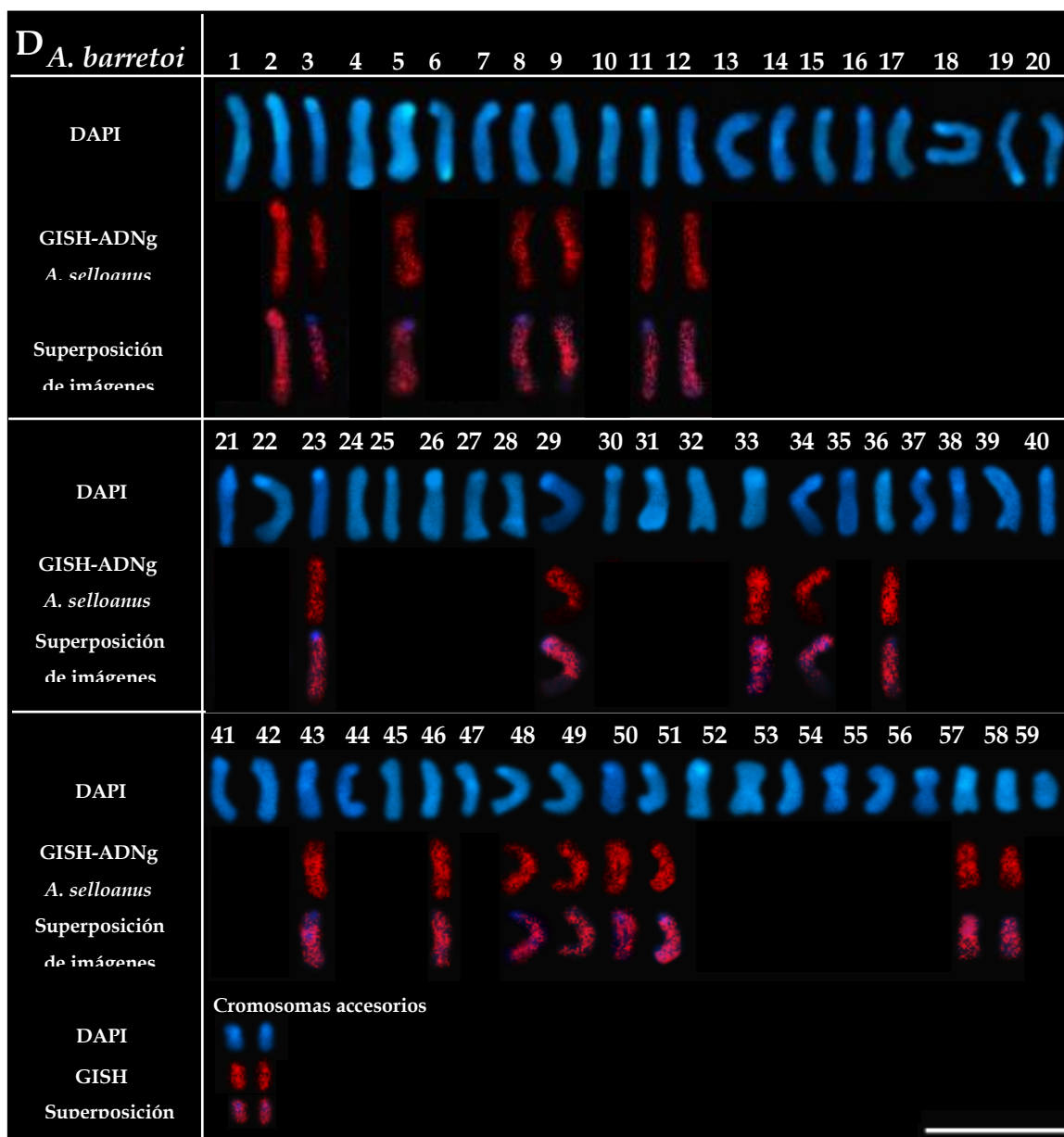
Este patrón de hibridación se observó, a lo largo de todo el cromosoma en 16 de ellos (Figura 69 B, C y D: cromosomas 2, 5, 8, 11, 12, 23, 33, 36, 43, 46, 48, 49, 50, 51, 58, 59).

En cuatro cromosomas, se observaron señales de hibridación solo en uno de sus brazos, siendo estas intensas y extendiéndose a la región pericentromérica del otro brazo (Figura 69 B, C y D: cromosoma 3, 9, 29, 34). Este patrón de hibridación estaría evidenciando, que los brazos no hibridados poseen menos secuencias homólogas con el genoma de *A. selloanus*.

La sonda utilizada, no mostró señal de hibridación en las regiones heterocromáticas DAPI+ de las regiones teloméricas de los cromosomas 3, 5, 8, 11, 23, 43, 48, 51 (Figura 69 B, C y D). El resto del complemento, no mostró señales de hibridación con la sonda utilizada, lo que estaría indicando falta de homología entre las secuencias que componen esos cromosomas y el genoma de *A. selloanus*.

Se observó que el par de cromosomas accesorios, presentó un patrón de hibridación uniforme, aunque disperso a lo largo de los cromosomas (Figura 69 B, C y D), indicando alta afinidad con la sonda utilizada.





**Figura 69: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. barretoii***

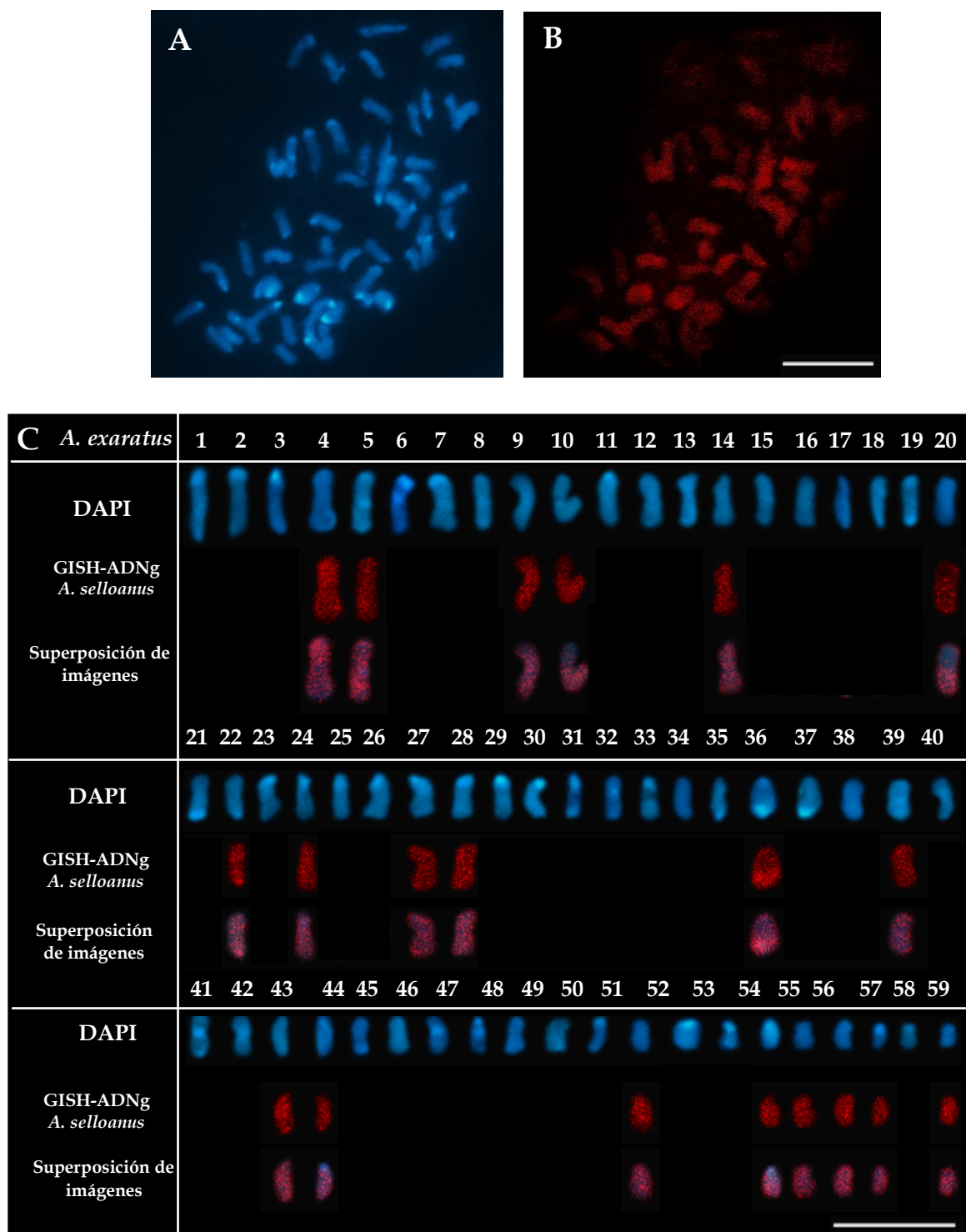
**A:** Contraintinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. selloanus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. **C. Superposición de imágenes.** **D. Cariograma de *A. barretoii*** hibridados como muestra la columna de la izquierda. En DAPI se representaron los 60 cromosomas del complemento y el par de cromosomas accesorios (Bs). En Biotina y en la superposición de imágenes, solo se representaron los cromosomas que mostraron regiones con señales de hibridación (color rosado). Los cromosomas se ordenaron por tamaño, de mayor a menor. Barra 10  $\mu$ m.

***Andropogon exaratus***

Al hibridar con la sonda de ADN genómico total de *Andropogon selloanus*, marcado con biotina, sobre cromosomas de *A. exaratus*, se observó que, de los 60 cromosomas del complemento, al menos 20 cromosomas presentaron homología con la sonda utilizada, mostrando un patrón de hibridación disperso, homogéneo y con diferente intensidad de hibridación.

Este patrón de hibridación se observó, a lo largo de ambos brazos cromosómicos en 16 cromosoma (Figura 70 B y C: cromosomas 5, 9, 14, 22, 24, 27, 28, 39, 43, 44, 52, 55, 56, 57, 58, 60) y solo en uno de los brazos cromosómicos, en cuatro cromosomas (Figura 70 B y C: cromosoma 4, 10, 20, 36).

En el cromosoma número 36, la señal de hibridación, coincide con la región rica en heterocromatina del brazo hibridado. En los cromosomas 44 y 55, la sonda utilizada no hibridó con la región heterocromática DAPI+ de la región telomérica del brazo corto (Figura 70 C). El resto de los cromosomas, mostraron señales muy débiles, lo que indicaría menor afinidad entre algunas secuencias componentes de los cromosomas de *A. exaratus* con el genoma de *A. selloanus*.



**Figura 70: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. exaratus*.**

**A:** Contratación con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. selloanus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. **C. Cariograma del complemento de *A. exaratus*.** En DAPI se observan los 60 cromosomas ordenados por tamaño de mayor a menor. En Biotina y en la superposición de imágenes, sólo se representaron los cromosomas que mostraron regiones con señales de hibridación (color rosado). Barra 10  $\mu$ m.

***Andropogon glaucophyllus***

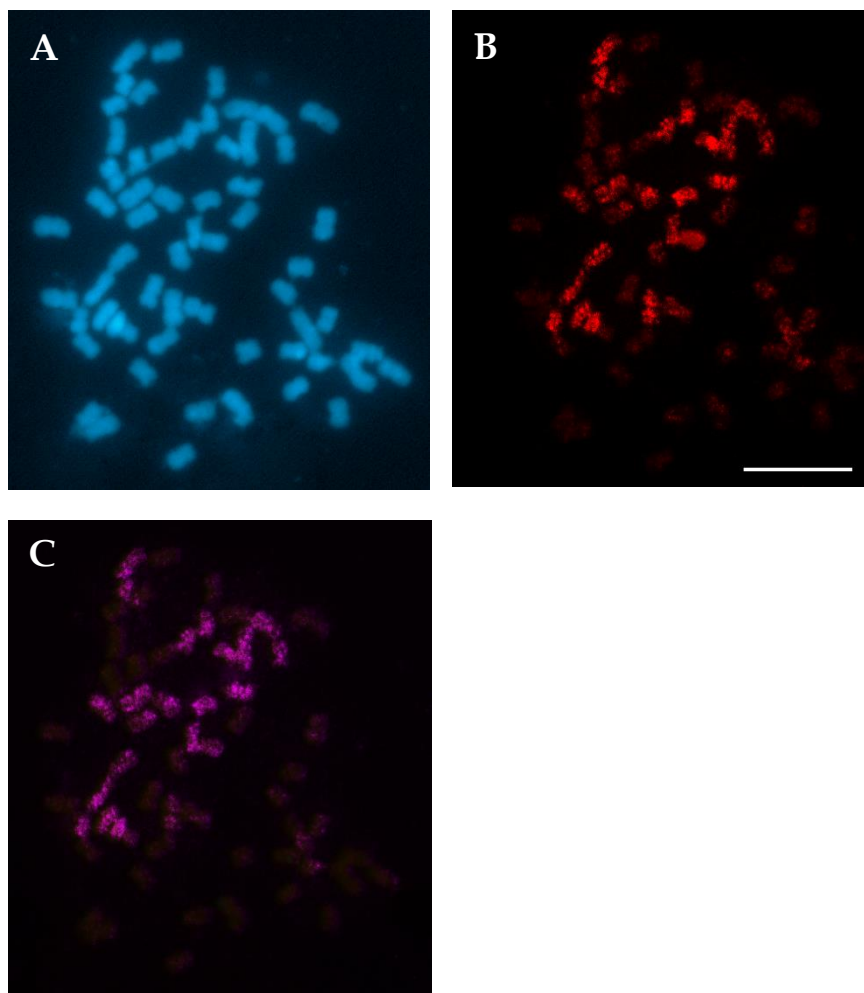
El experimento de GISH realizado sobre cromosomas de *Andropogon glaucophyllus* con ADN genómico total de *A. selloanus* marcado con biotina, reveló afinidad con la sonda utilizada en 23 cromosomas del complemento, observándose un patrón de hibridación disperso y muy poco homogéneo, con variada intensidad de hibridación, en 12 cromosomas (Figura 71 B, C y D: cromosomas 1, 7, 9, 15, 25, 35, 37, 39, 49, 52, 59, 60).

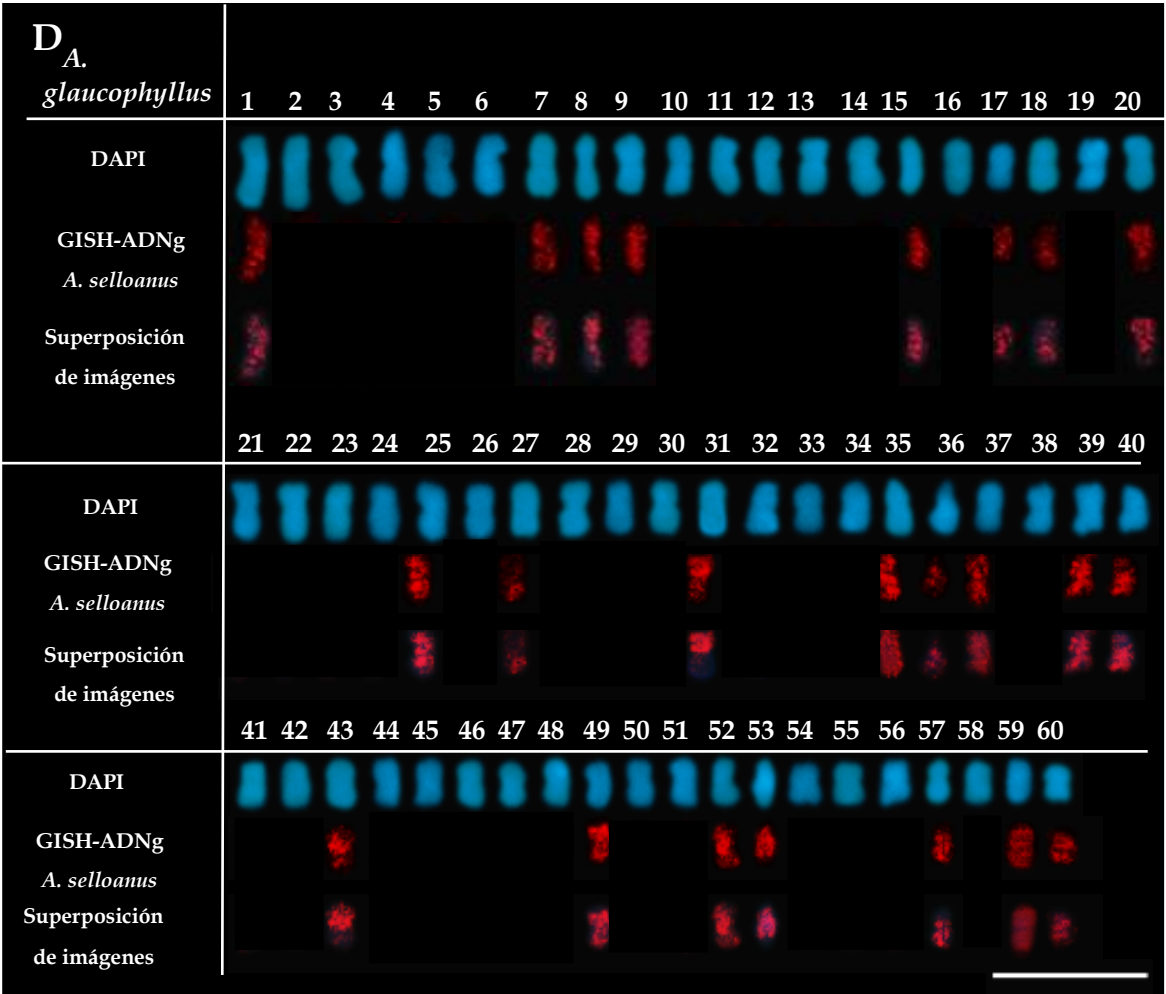
Seis cromosomas, mostraron señales de hibridación en solo un brazo cromosómico (Figura 71 B, C y D: cromosomas 20, 31, 40, 43, 53, 57) y un cromosoma con señal más intensa en un brazo e inespecífica en el otro brazo (Figura 71 D: cromosoma 8), revelando que los otros brazos que no muestran señales de hibridación o estas son inespecíficas, poseen menos secuencias homólogas con el genoma de *A. selloanus*.

También se observaron cromosomas con señal débil de hibridación y un patrón muy disperso (Figura 71 B, C y D: cromosomas 17, 18, 27, 36).

El resto del complemento de *A. glaucophyllus*, no mostró señales de hibridación, indicando muy baja afinidad con la sonda utilizada.

Cabe destacar, que los cromosomas que presentaron señales de hibridación siempre se mostraron agrupados en un sector de la célula (Figura 71 B y C).



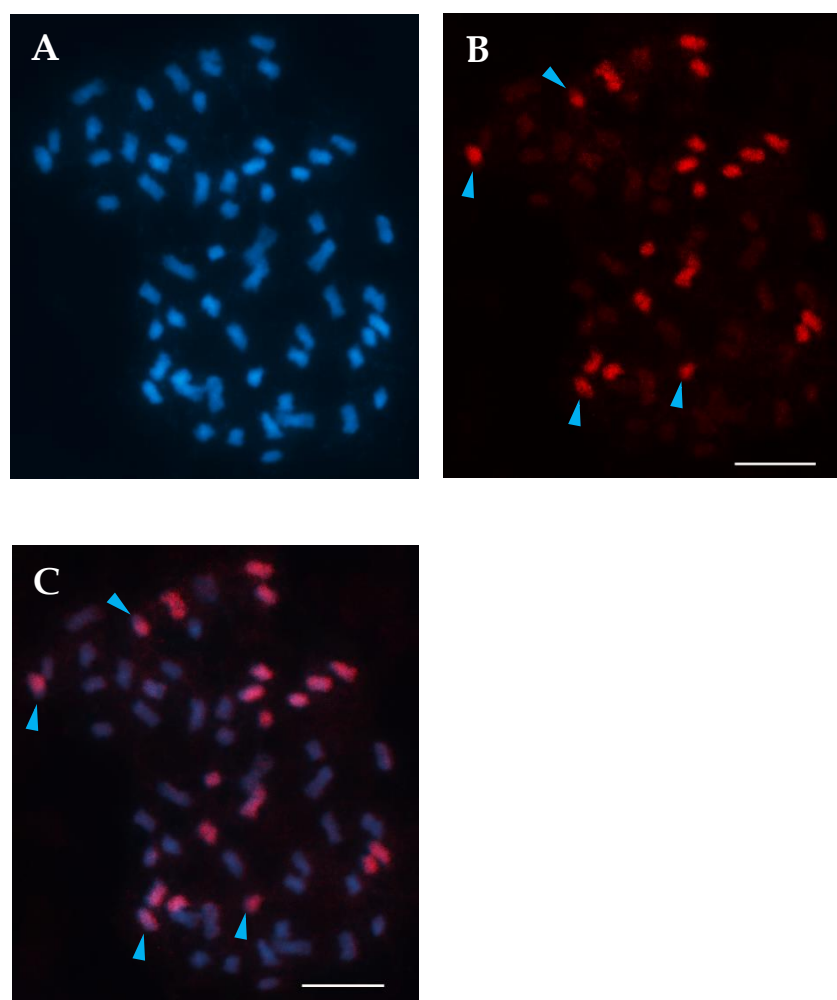


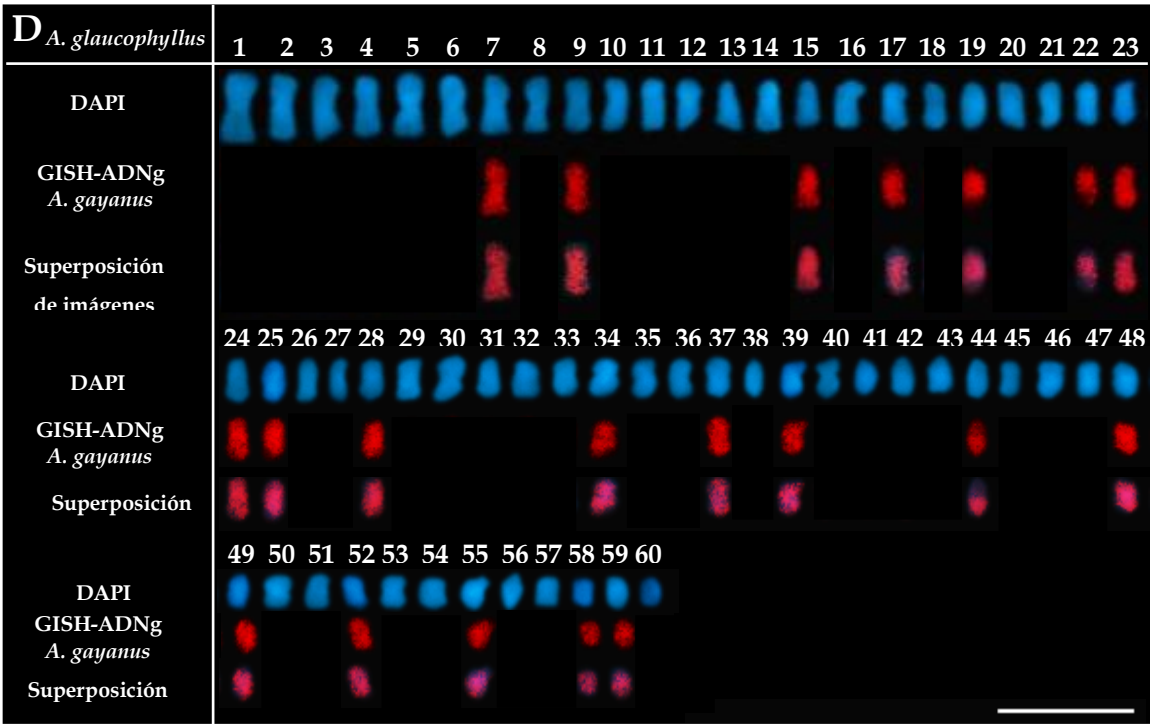
**Figura 71: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. glaucophyllus***  
**A:** Contraintinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. selloanus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. **C. Superposición de imágenes:** mostrando en color violáceo las regiones hibridadas. **D. Cariograma de *A. glaucophyllus*.** En DAPI se observan los 60 cromosomas del complemento, ordenados por tamaño de mayor a menor. En Biotina y en la superposición de imágenes, sólo se representaron los cromosomas que mostraron regiones con señales de hibridación (color rosado). Barra 10 µm.



**Afinidades genómicas entre una especie tetraploide y una especie hexaploide, ambas de la sección *Notosolen*.**

Al utilizar como sonda el ADNg de *Andropogon gayanus*, sobre cromosomas de *A. glaucophyllus*, se observó que al menos 20 cromosomas del complemento presentaron señales de hibridación, mostrando un patrón de hibridación disperso a lo largo de 16 cromosomas. Cuatro cromosomas mostraron homología con la sonda utilizada solo en uno de los brazos cromosómicos (Figura 72 B, C y D: cromosomas 19, 22, 44, 55).

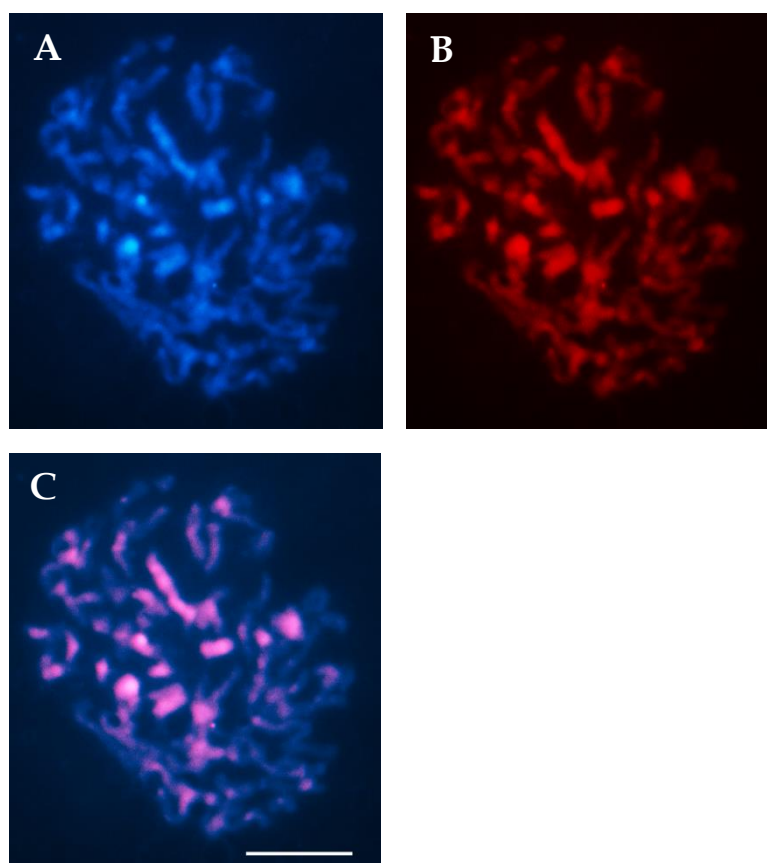




**Figura 72: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. glaucophyllus*.**  
**A:** Contraintinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. gayanus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. Las cabezas de flechas celestes indican los cromosomas con un brazo hibridado. **C. Superposición de imágenes:** mostrando en color violáceo las regiones hibridadas. Las cabezas de flechas celestes indican los cromosomas con un brazo hibridado. **D. Cariograma de *A. glaucophyllus*.** En DAPI se representaron los 60 cromosomas del complemento, ordenados por tamaño de mayor a menor. En Biotina y en la superposición de imágenes, sólo se representaron los cromosomas que mostraron regiones con señales de hibridación (color rosado). Barra 10  $\mu$ m.

**Afinidades genómicas entre una especie diploide y una especie tetraploide de la sección *Leptopogon*.**

El complemento cromosómico de *A. ternarius*, al ser hibridado con ADN genómico de *A. gyrans* marcado con biotina, presentó regiones de homología en al menos 20 cromosomas, manifestando un patrón de hibridación homogéneo a lo largo de al menos 10 cromosomas y solo en brazos y regiones cromosómicas en los 10 cromosomas restantes (Figura 73 B y C).

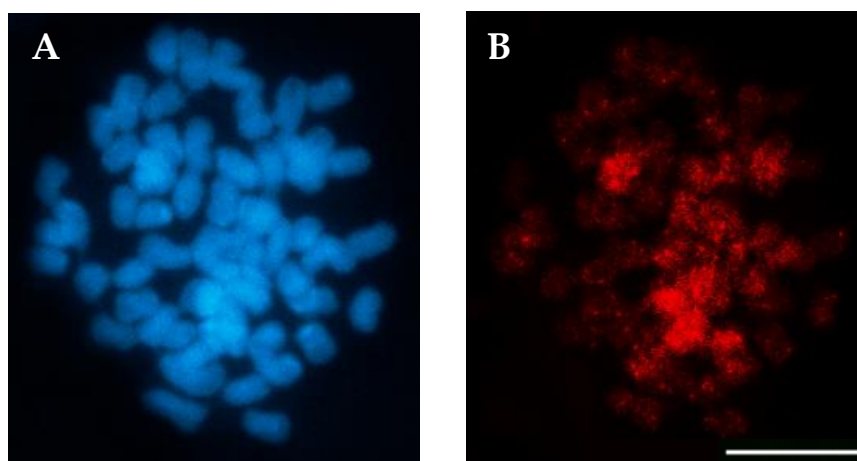


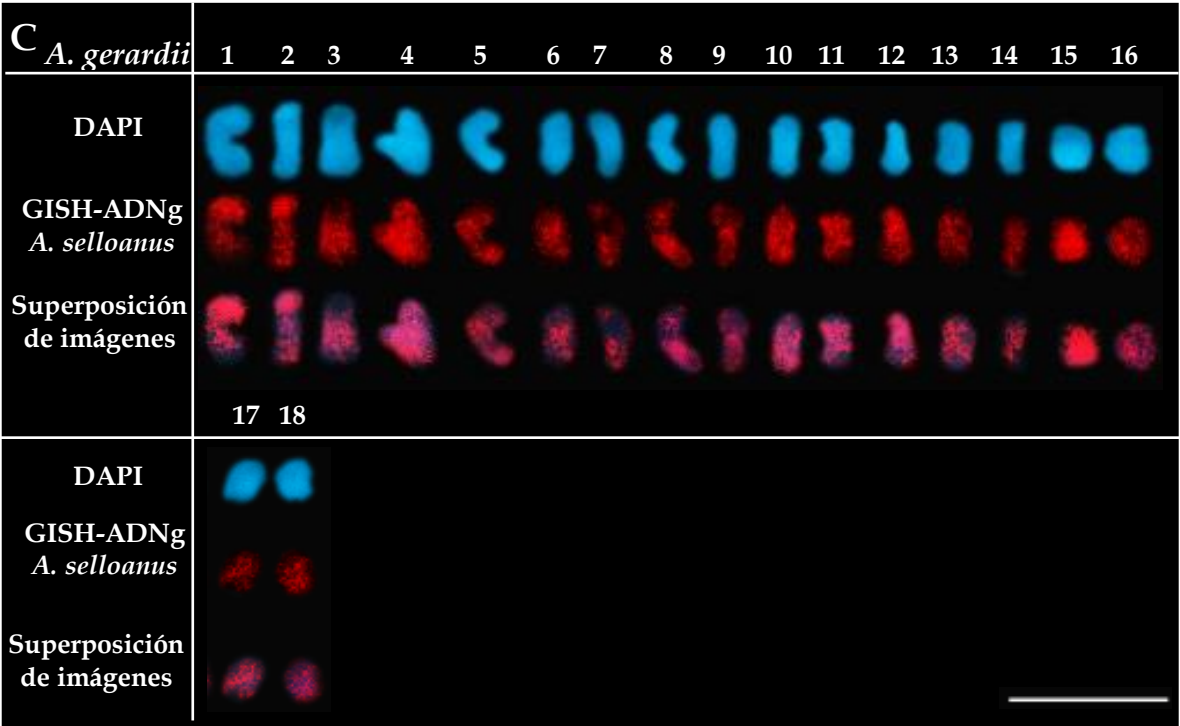
**Figura 73: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. ternarius*.**

**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. gyrans*, marcado con biotina y detectado con Cy3. **C. Superposición de imágenes:** mostrando en rosado, cromosomas y regiones cromosómicas hibridadas. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

**Afinidades genómicas entre una especie diploide de la sección *Leptopogon* y una especie hexaploide, de la sección *Andropogon*.**

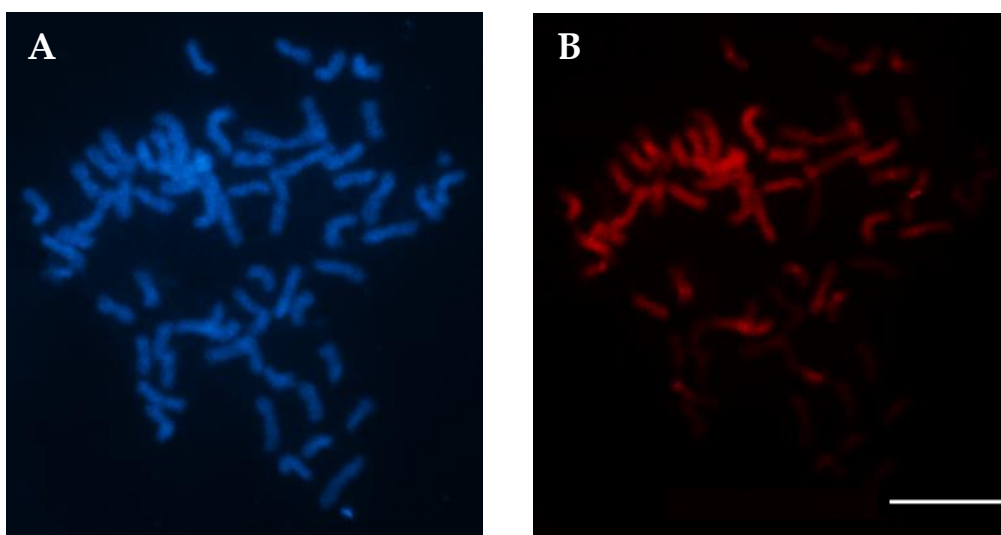
Al utilizar como sonda ADN<sub>g</sub> de *A. selloanus*, sobre cromosomas mitóticos de *A. gerardii*, se observó que al menos 18 cromosomas del complemento, presentaron un patrón de hibridación disperso y no homogéneo. Cuatro cromosomas mostraron ese patrón solo en uno de los brazos cromosómicos (Figura 74 B y C: cromosomas 3, 8, 11 y 12). En algunos cromosomas, se observó un patrón de hibridación más intenso en regiones que se corresponden con regiones ricas en heterocromatina (Figura 74 B y C: cromosomas 1, 2, 4, 5, 10 y 15).

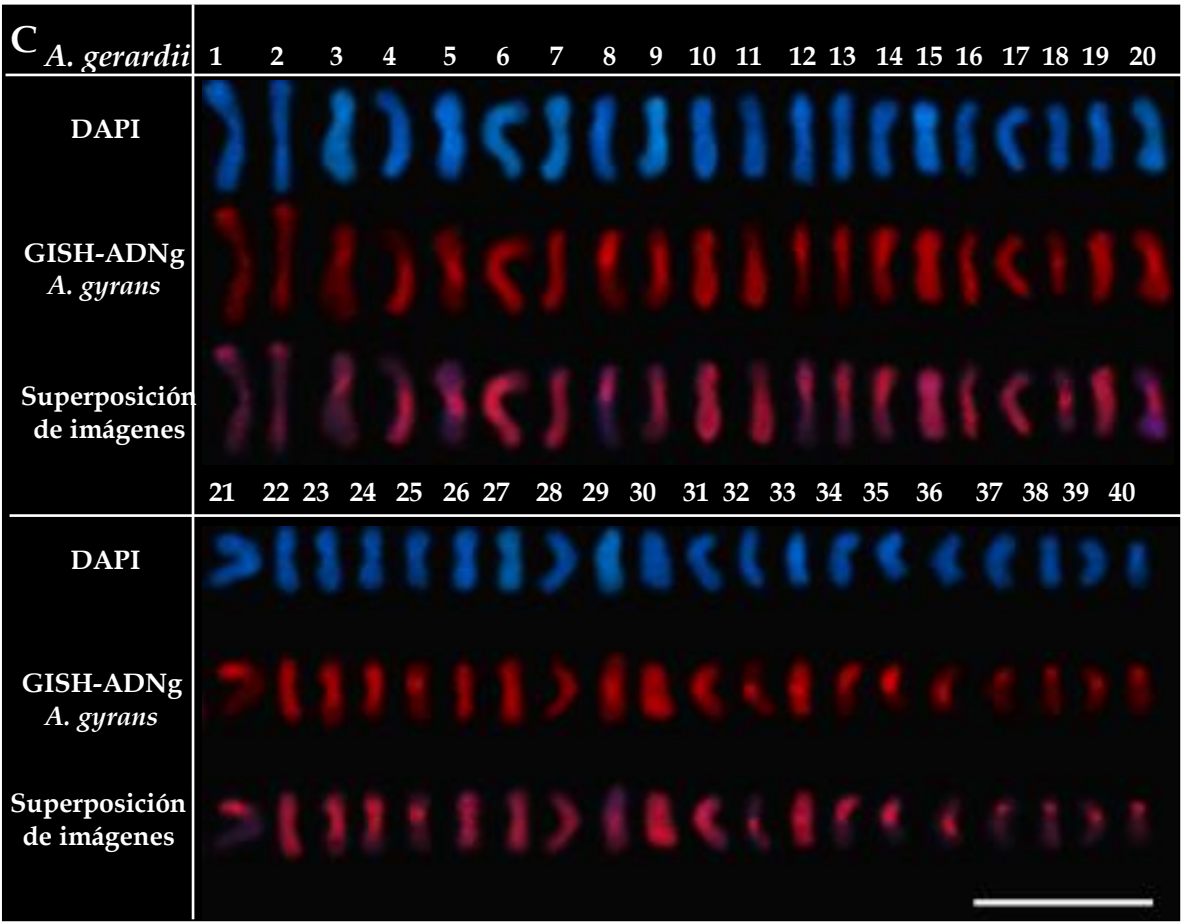




**Figura 74: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. gerardii*. A:** Contratación con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. selloanus*, marcado con biotina y detectado con Cy3. **C. Cariograma de *A. gerardii*** hibridados como muestra la columna de la izquierda. En DAPI y en la superposición de imágenes, solo se representaron aquellos cromosomas que presentaron señales de hibridación, los cuales se ordenaron por tamaño, de mayor a menor. Barra 10 µm.

Al utilizar como sonda el ADNg total de *A. gyrans* sobre le complemento cromosómico de *A. gerardii*, se observaron señales de hibridación homogéneas, fuertes a moderadas en 40 cromosomas. Este patrón hibridación, se observó en 12 cromosomas a lo largo de su longitud (Figura 75 C: cromosomas 7, 10, 15, 16, 17, 19, 22, 26, 27, 28, 30, 33); en un solo brazo cromosómico de 11 cromosomas (Figura 75 C: cromosomas 4, 8, 11, 12, 13, 14, 23, 24, 31, 34, 35); en los extremos terminales de un brazo cromosómico en 6 cromosomas, coincidiendo con regiones ricas en heterocromatinas (Figura 75 C: cromosomas 1, 2, 21, 37, 38, 40); en regiones pericentroméricas coincidiendo con regiones ricas en heterocromatina en 10 cromosomas (Figura 75 C: cromosomas 3, 5, 9, 18, 20, 25, 29, 32, 36, 39); un cromosoma con un patrón de hibridación homogéneo e intenso en todo un brazo y en parte del otro brazo cromosómico, en el cual, además, no se observa señal en la porción terminal (Figura 75 C: cromosomas 6).





**Figura 75: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. gerardii*.** A: Contratación con DAPI. B: Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. gyrans*, marcado con biotina y detectado con Cy3. C. Cromosomas de *A. gerardii* hibridados como muestra la columna de la izquierda. La superposición de imágenes muestra en color rosado las regiones hibridadas. En el cariograma, solo se muestran los cromosomas que presentaron señales de hibridación, los cuales se ordenaron por tamaño, de mayor a menor. Barra 10  $\mu$ m.

---

**Afinidades genómicas entre una especie tetraploide de la sección *Leptopogon* y una especie hexaploide, de la sección *Andropogon*.**

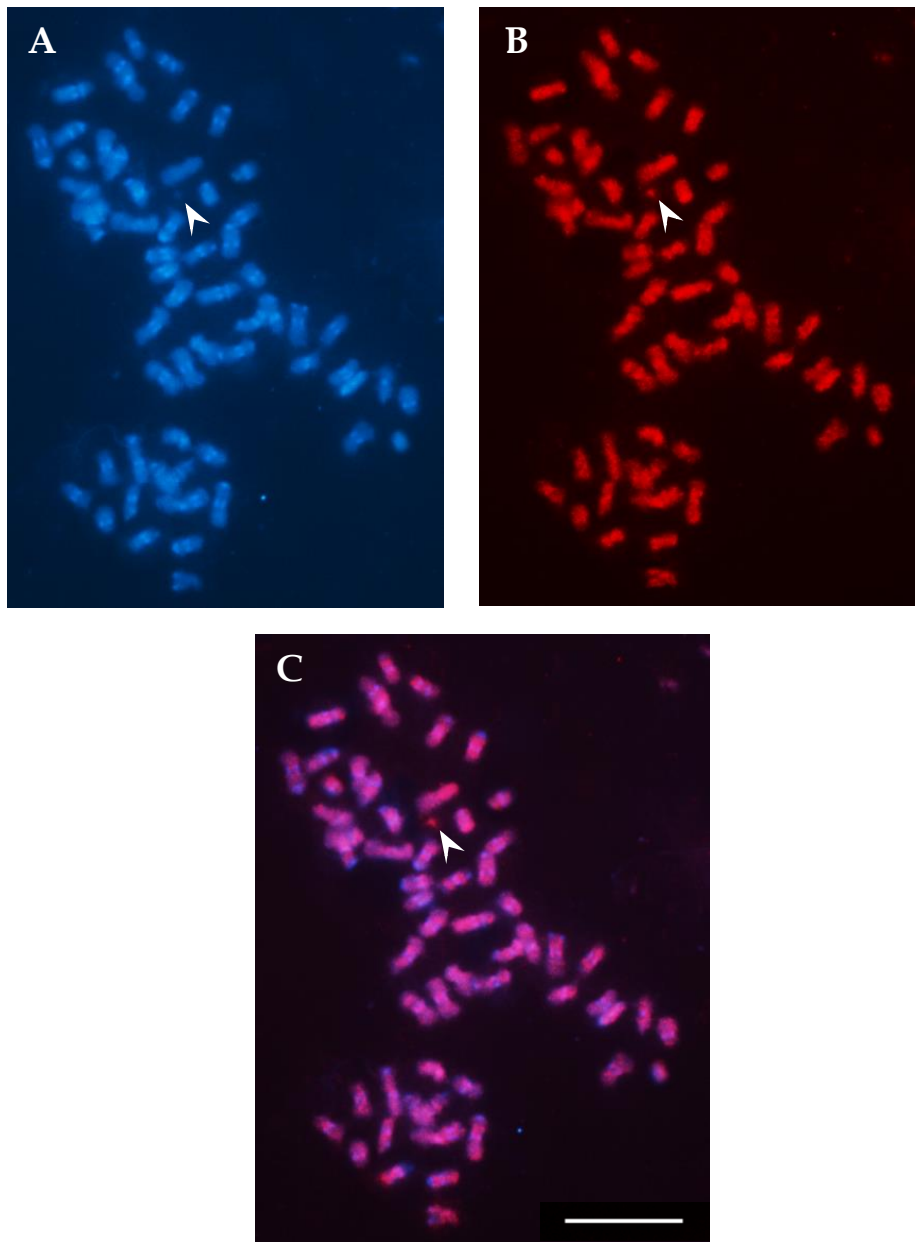
Si bien el complemento cromosómico de *Andropogon gerardii*, al ser hibridado con ADN<sub>g</sub> de *A. ternarius* marcado con biotina, mostró hibridación en todos los cromosomas, dicho patrón de hibridación, se presentó más homogéneo y uniforme en algunas regiones cromosómicas y en otras regiones más disperso y con diferentes intensidades (Figura 76 B, C y D). De los 60 cromosomas del complemento, aproximadamente 40 presentaron homología en cromosomas completos (Figura 76 B, C y D cromosomas: 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 39, 41, 42, 44, 45, 47, 50, 51, 52, 55, 57, 58, 59, 60). Sin embargo, en la mayoría de ellos, se observó que las regiones teloméricas ricas en heterocromatina y las que no presentan heterocromatina DAPI+, no hibridaron con la sonda utilizada. En el cromosoma 11 (Figura 76, D), se observó que las regiones teloméricas ricas en heterocromatina se presentaron en forma de puntos, las cuales no hibridaron, además hubo señal de hibridación con un patrón en banda en posición distal en un brazo; cabe señalar que el cromosoma 12 está roto o doblado, pero el brazo que se puede observar es muy semejante al del cromosoma 11 (Figura 76 B, C y D). Los cromosomas 13 y 14, también mostraron intensa señal de hibridación, destacándose el patrón de hibridación de banda en la región pericentromérica, coincidiendo con la misma región rica en heterocromatina. Tanto el cromosoma 59, como la constricción secundaria que posee, presentaron intensa y homogénea señal de hibridación.

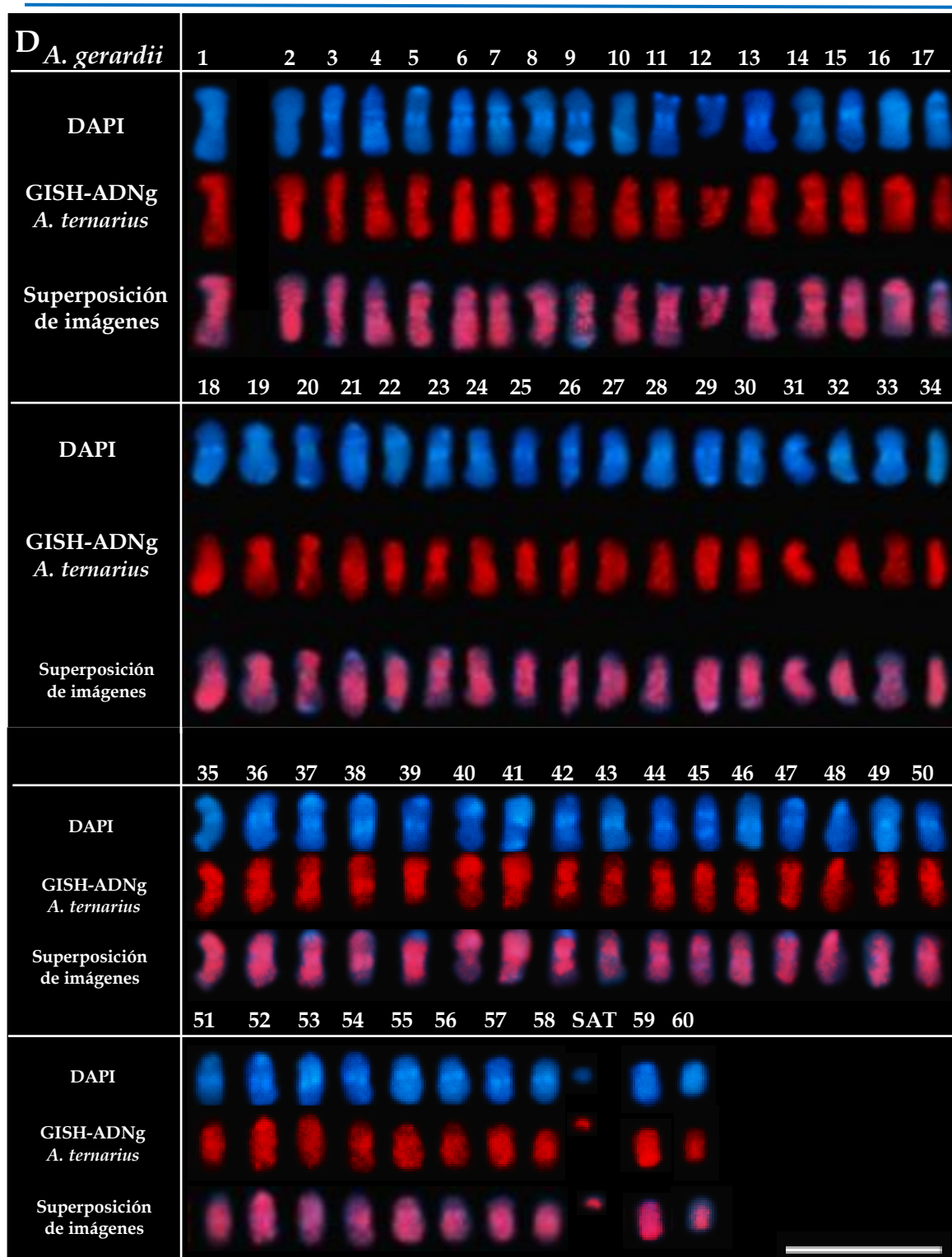
Aproximadamente 9 cromosomas presentaron señal de homología en forma de bloque, uniforme, en un brazo mientras que en el otro brazo la señal fue muy débil o inespecífica (Figura 76 B, C y D cromosomas: 1, 2, 4, 18, 19, 24, 40, 46, 56). En el cromosoma 4, además de presentar un brazo hibridado, se observó un patrón de hibridación en forma de banda proximal coincidente con una banda rica en heterocromatina y el otro brazo del cromosoma no presentó señal de hibridación.

El resto de los cromosomas, la señal de hibridación es muy débil, casi nula, inespecífica (Figura 76 B, C y D, cromosomas: 9, 16, 20, 28, 33, 38, 43, 48, 49, 53, 53), destacándose el cromosoma 38, en el cual se destaca la banda de hibridación de la



región pericentromérica hibridada coincidente con la misma región rica en heterocromatina.



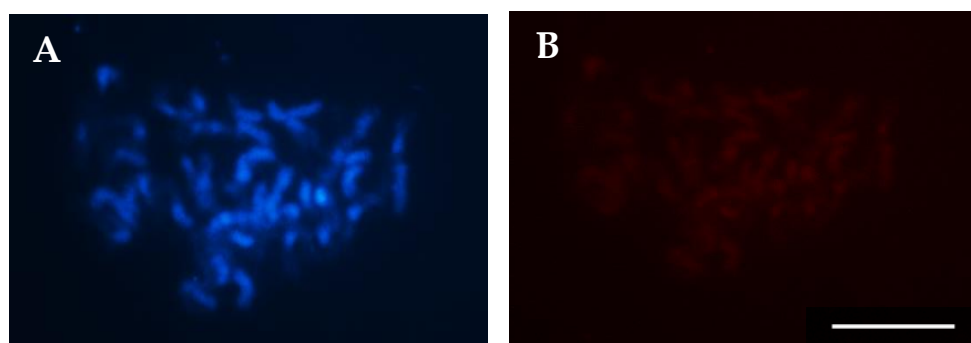


**Figura 76: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *A. gerardii*.**

**A:** Contratación con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. ternarius*, marcado con biotina y detectado con Cy3. Las cabezas de flechas con muesca indican el satélite. **C. Superposición de imágenes:** mostrando en color violáceo las regiones hibridadas y en color celeste o azul las no hibridadas. **D. Cariograma de *A. gerardii*.** En DAPI se representaron los 60 cromosomas del complemento, ordenados por tamaño de mayor a menor. En Biotina y en la superposición de imágenes, se representaron los cromosomas que mostraron regiones con señales de hibridación (color rosado). Barra 10  $\mu$ m.

**Afinidades genómicas entre una especie del género *Bothriochloa* Kuntz y el hexaploide norteamericano *A. gerardii*.**

Para analizar la hipótesis de Stebbins (1975) sobre el origen de los hexaploides en América del Norte, se utilizó la técnica de GISH, hibridando cromosomas de *Bothriochloa eurylema*, una especie Sudamericana, endémica, con  $2n = 6x = 60$ , con ADNg de *A. gerardii* marcado con biotina como sonda. Se observó completa ausencia de hibridación en todo el complemento (Figura 77 A y B).



**Figura 77: Hibridación *in situ* genómica. Cromosomas mitóticos de *B. eurylema*.**  
**A:** Contratinción con DAPI. **B:** Misma célula hibridada con ADN genómico de *A. gerardii*, marcado con biotina y detectado con Cy3. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

# DISCUSIÓN

## Citogenética Clásica

### Análisis del cariotipo

El cariotipo es el número, tamaño y morfología de los cromosomas comúnmente observados en metafase mitótica. Estas características son generalmente constantes en un grupo de individuos relacionados (especie, género). La constancia, casi absoluta, de los caracteres antes mencionados dentro de una unidad taxonómica, hace del cariotipo una herramienta útil para la caracterización de las especies tanto animales como vegetales.

Por medio del análisis del cariotipo, podemos detectar variaciones tales como el número, la forma y el tamaño de los cromosomas. Además de analizar otras características, tales como la cantidad y localización de la heterocromatina, y la localización de las regiones organizadoras nucleolares. Estas variaciones en el cariotipo pueden producirse, por rearrreglos estructurales que pueden derivar en cambios del número cromosómico o en alteraciones en su morfología.

En cuanto al número cromosómico, éste, también puede variar por poliploidía e incluso pueden surgir nuevos números básicos como consecuencia de las reestructuraciones o por la aparición de nuevos híbridos entre los poliploides con números diferentes (Poggio & Naranjo, 2004). El número básico (x), es el número menor de cromosomas necesario para que el organismo sea viable y representa el mínimo de cromosomas de una serie poliploide. Para la mayoría de los taxa del género *Andropogon*, el número cromosómico básico es  $x = 10$  (Gould, 1956, 1967; Campbell, 1983b; Stebbins, 1975; Norrmann, 1985; Davidse et al., 1986), aunque se reportaron algunas especies en el Viejo Mundo y África con  $x = 9$  y número cromosómico  $2n = 36$  (Gould, 1956) (*A. distachyus* L.);  $x = 8$  y número cromosómico  $2n = 32$  (*A. abyssinicus* Fresen.) (Gould, 1956);  $x = 7$  y número cromosómico  $2n = 14$  (*A. manii* Hook. f.) (Davidse et al., 1986).

Las especies diploides de *Andropogon* analizadas, presentan cromosomas cuya longitud cromosómica media oscila entre 3,34  $\mu\text{m}$  en *A. selloanus*, y 5,44  $\mu\text{m}$  en *A. macrothrix*, siendo *A. selloanus*, quien posee el cromosoma de menor longitud (2,05  $\mu\text{m}$ ) y *A. macrothrix* el de mayor longitud (7,80  $\mu\text{m}$ ).

Por medio del análisis de la morfología de los cariotipos, se observó que las tres entidades diploides presentan un cariotipo simétrico, constituido principalmente por cromosomas de morfología metacéntrica, dentro de los cuales, cada especie posee al menos, un par de cromosomas con satélite en el brazo corto, revelando así, un alto grado de conservación del cariotipo entre las tres especies. Considerando lo antedicho, se propone la fórmula cariotípica  $18m + 2sm$  para cada una de estas entidades.

Si bien, hasta el presente no se han registrado trabajos de otros autores en el género, en los cuales además de citar el número cromosómico se haga una descripción del cariotipo de las especies analizadas, los resultados obtenidos en la presente contribución, concuerdan con los datos reportados para el diploide *A. tectorum* Schum. & Thonn. ( $2n = 2x = 20$ ) perteneciente al complejo *A. gayanus* - *A. tectorum* ampliamente distribuido en las savannas de Guinea, Nigeria (Okoli & Olodore, 1983), el cual también posee un complemento cromosómico simétrico, constituido por cromosomas metacéntricos.

Al graficar los índices de simetría  $A_1$  y  $A_2$ , puede observarse que las especies sudamericanas *A. selloanus* y *A. macrothrix*, poseen valores similares de  $A_2$ , pero difieren en los valores de  $A_1$ . *Andropogon selloanus*, posee menor variación intracromosómica, cromosomas de menor tamaño, mayor volumen, mayor tamaño de satélite y el valor promedio del índice centromérico es mayor (Figura 8 A y B); en cambio, *A. macrothrix* muestra mayor variación intracromosómica, los cromosomas son de mayor tamaño, mayor longitud, menor volumen, los satélites presentes son microsatélites y el valor del índice centromérico es menor (Figura 9 A y B). De esta manera, ambas se mantienen alejadas de la especie norteamericana *A. gyrans*, la cual posee los valores más bajos de variación intra e inter cromosómica, mostrándose con el cariotipo más simétrico de las tres (Figura 10 A y B) y haciendo que su ubicación en el diagrama de dispersión se encuentre en el extremo inferior más bajo para este parámetro.

Coincidente con esta agrupación, cabe destacar, que, si bien las tres entidades diploides son de reproducción sexual, con flores hermafroditas y son fértiles, existe mayor similitud morfológica y de hábitos entre las sudamericanas. En América del Sur, las dos especies diploides, junto con *A. leucostachyus* H.B.K., forman un grupo discreto de pequeñas plantas, principalmente ruderales y morfológicamente parecidas. En el sur

de Sudamérica, *A. selloanus* crece en diferentes hábitats, pudiendo desarrollarse en campos naturales o con suelos alterados, formando poblaciones pequeñas y bien distribuidas o formando matas aisladas; *A. macrothrix* vive en suelos bajos y con alta humedad (Flora Argentina, 2012). En grandes áreas de Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay, ambas sudamericanas, viven en simpatría donde la hibridación natural es posible, aunque en bajo grado (Galdeano & Norrmann, 2000). Debido a esta cercanía estos autores, encontraron un individuo con características morfológicas intermedias entre ambas entidades, creciendo entre la población de *A. selloanus*, el cual dominaba una densa zona a ambos lados de la carretera y de *A. macrothrix* quien crecía exclusivamente en pequeñas áreas bajas de los mismos lugares.

Por otro lado, *A. gyrans*, cuyo centro de diversidad se encuentra en la llanura costera del sureste de los Estados Unidos (Campbell 1983), es uno de los miembros de un grupo norteamericano estrechamente interrelacionado, monofilético, denominado “Complejo *Andropogon virginicus*” (Campbell 1983), el cual posee, a diferencia de las sudamericanas, flores cleistogamas.

Las especies poliploides analizadas de *Andropogon*, presentan cromosomas cuya longitud cromosómica media oscila de 2,93  $\mu\text{m}$  en *A. glaucophyllus* a 5,30  $\mu\text{m}$  en *A. barretoii*. Por medio del análisis de la morfología de los cariotipos, se observó que estas especies presentan cariotipos simétricos.

En las Figuras 28, B; 29, B; 30, B; se observa que los cariotipos de estas especies hexaploides, son diferentes por el tamaño y volumen de los cromosomas y por el tipo, tamaño y ubicación de los satélites. Todos los cariotipos están constituidos en su mayoría por cromosomas metacéntricos, siendo *A. exaratus* la única especie que no posee cromosomas telocéntricos y *A. glaucophyllus* es la única especie que no posee cromosomas submetacéntricos ni cromosomas Bs. Estas dos especies, presentan satélites en cromosomas metacéntricos, pero en pares diferentes; en cambio, *A. barretoii*, se destaca por poseer un par de satélites en cromosomas submetacéntricos, además de estar constituido su cariotipo, por cromosomas de morfología metacéntrica, submetacéntrica, telocéntrica y cromosomas Bs.

El cariotipo de *A. gayanus*, sería el más simétrico, presenta el menor valor de longitud total del cariotipo, valores muy bajos de variación inter e intracromosómica, además de dos pares de cromosomas metacéntricos con satélites, de los cuales un par

con satélite de mayor tamaño. Para esta *A. gayanus*, se propone la fórmula cariotípica: 40 m + cromosomas B. Los cromosomas accesorios se observaron con frecuencia, hasta 2 cromosomas B. Este resultado coincide con la observación de Singh (1965), quien registró la presencia de 2 a 4 cromosomas B en citotipos diploides y tetraploides de esta especie.

Para cada una de estas especies se propone una fórmula cariotípica, las mismas se resumen en la Tabla 5.

Todas las especies analizadas, presentan satélites localizados en el brazo corto de los cromosomas. Estos resultados podrían confirmar una generalidad observada en los complementos cromosómicos de diferentes especies vegetales, donde el 86 % de las constricciones secundarias se localizan preferentemente en los brazos cortos (Lima De Faria, 1976; Lim et al. 2001).

Al graficar los índices de simetría  $A_1$  y  $A_2$ , puede observarse que las especies hexaploides presentan valores semejantes de  $A_2$  y una mayor variación intercromosómica que la especie tetraploide, la cual muestra un valor de  $A_1$  semejante al hexaploide *A. barretoi*, pero con una variación intercromosómica muchísimo menor.

Al analizar los índices de asimetría entre los hexaploides, se observó que *A. exaratus*, muestra la mayor variación intra e intercromosómica. Esto puede deberse a que su complemento, está constituido por cromosomas más largos y menos voluminosos.

Entre *A. barretoi* y *A. glaucophyllus*, no hay mucha diferencia entre los valores de  $A_1$  y  $A_2$ , siendo esta última especie la que menores valores presenta entre estos hexaploides. Quizá debido a que posee cromosomas de menor tamaño, menor longitud total del complemento cromosómico y mayor cantidad de cromosomas metacéntricos.

*Andropogon gayanus*, presenta un índice  $A_1$  similar al de *A. barretoi*, coincidiendo también en el valor del índice centromérico promedio, sin embargo, *A. gayanus* posee la menor variación intercromosómica de las especies analizadas. Estos resultados podrían deberse a que posee cromosomas más cortos, un mayor número de satélites y al tipo y tamaño de los mismos. En el diagrama de dispersión (Figura 26) se observa que las especies hexaploides, forman un grupo bien definido, mientras que el tetraploide se mantiene alejado de ese grupo.

Coincidente con esta agrupación, cabe destacar, que las entidades hexaploides analizadas tiene origen sudamericano, y su distribución es bien restringida a áreas que



no son simpátricas. *Andropogon barretoii* habita determinados tipos de suelos de la Depresión Central de Río Grande Do Sul, desde el E de Santa María hasta Taquarí. Si bien los lugares de ocurrencia son escasos, forma densas poblaciones cerca de los ríos Yacuí, Pardo y Taquarí (Norrman & Quarin, 2001). *Andropogon exaratus* habita zonas bajas y pantanosas o anegadizas del NE de Paraguay, Argentina y Brasil (Norrman, 1985; Flora Argentina, 2012). *Andropogon glaucophyllus* habita cerros graníticos cercanos al mar y planicies cuaternarias atlánticas del sur de Brasil y Uruguay, prefiriendo suelos de buen drenaje. En Brasil se distribuye en el litoral de los estados de Río Grande do Sul y Santa Catarina, en suelos arenosos de las planicies próximas al mar, formando pequeñas y densas poblaciones (Norrman, 1999). Las tres hexaploides son de reproducción sexual, comportándose como alógamas por autoincompatibilidad, debido a la presencia de un sistema de autoincompatibilidad polen-pistilo (Norrman & Quarin, 1991; Norrmann, 1999; Norrmann & Scarel, 2000), de floración estival, antesis matutina que ocurre entre las 4:00 y las 8:00 hs de la mañana (Norrman & Quarin, 1991; Norrmann, 1999).

En cambio, *A. gayanus* es una especie nativa del continente africano, es el componente principal de la mayor parte de las sabanas de África Tropical del sur de Sahara. Florece en los meses de abril a junio, pudiendo prolongarse la floración y florecer durante todo el año (Zanin, 2001). De reproducción sexual, la antesis es matutina que ocurre entre las 06: 00 y las 14:00 hs (Foster, 1962).

### **Comportamiento meiótico de los cromosomas de las especies diploides**

El comportamiento de los cromosomas en meiosis de las especies diploides sudamericanas, *A. selloanus*, *A. macrothrix*, *A. leucostachyus*, éste último considerado una especie hermana muy cercana a *A. selloanus*, fue bien estudiado por Norrmann (1985). El autor observó, que sus cromosomas se asocian en meiosis formando generalmente 10 cromosomas bivalentes (II) y, además en Prometáfase I de *A. macrothrix*, se observó formación de 2 cromosomas univalentes (I), quizá debido a la disyunción precoz de un par bivalente. Siendo la segregación, en Anafase I, generalmente normal.

Cabe destacar, también, el comportamiento de los cromosomas en meiosis de *A. ternatus* (Spreng.) Nees ( $2n = 3x = 30$ ), una especie triploide. Los autores Norrmann,

(1985); Norrmann & Quarin, (1987); John, (1990) la consideran una especie diploide, con un complemento adicional de cromosomas y una fórmula genómica SST. El proceso de meiosis ocurre de la misma manera, tanto de las células madre de la megásporas (CMM), como en las células madre del polen (CMP). Los cromosomas se asocian formando bivalentes y univalentes, y en Anafase I los bivalentes segregan normalmente, mientras que los univalentes permanecen rezagados en la placa ecuatorial de la célula. Los 10 univalentes rezagados, constituyen un tercer núcleo, el cual está incluido en la célula hija micropilar. Después de la primera división de la CMM, la célula hija binucleada ubicada hacia la micrópila se deteriora mientras que la célula hija uninucleada ubicada hacia la chalaza se divide para formar dos megásporas, la que se encuentra en el polo chalazal permanece como una megáspora funcional mientras que la otra degenera. Luego, la megáspora funcional, a través de tres divisiones mitóticas sucesivas, da lugar a un saco embrionario octonucleado. Como resultado de estos procesos, en la primera división meiótica, se forma un núcleo con 10 cromosomas uninucleados (10S) y un núcleo con 20 cromosomas (10S, 10T). Luego de la segunda división meiótica, se forman dos tipos de microsporas, las que llevan núcleos con 10 cromosomas (S) y las que llevan núcleos con 20 cromosomas (ST). La célula huevo que lleva el juego de 10 cromosomas al fecundarse con el núcleo espermático que lleva los 20 cromosomas, mantienen el número triploide.

### **Comportamiento meiótico de los cromosomas de las especies poliploides**

Hasta el presente no se han registrado trabajos de otros autores, sobre el análisis del comportamiento de los cromosomas en meiosis del tetraploide *A. gayanus* ( $n=20$ ), presentándose por primera vez en este trabajo. El análisis de Diacinesis, mostró la formación de 20 II y si bien en mitosis se identificaron 1-2 cromosomas Bs, estos no fueron identificados en células en división meiótica.

En todas las especies hexaploides, se observó en Diacinesis, que los cromosomas se apareaban formando 30 II con la existencia de un número variable de bivalentes (2-3) asociados al nucléolo; tanto en *A. barretoii* como en *A. exaratus* se observaron cromosomas accesorios Bs, en número variable (2 a 6). Si bien entre ellos, no se observaron apareamientos, en algunas células se los identificó débilmente apareados,

o bien permaneciendo cercanos y formando asociaciones secundarias. En las células analizadas no se observó la formación de configuraciones multivalentes.

En Metafase I, quizá la única anormalidad observada, fue la falta de sincronización entre los bivalentes. Si bien, en todas las especies hexaploides analizadas, todos los cromosomas formaron bivalentes durante la Diacinesis, al llegar a la Metafase I y ubicarse en la placa ecuatorial de la célula, se observaron cromosomas univalentes fuera de dicha placa posiblemente debido a una disyunción precoz. En *A. exaratus*, los cromosomas observados fuera de la placa ecuatorial de la célula, se comportaron como univalentes y por su morfología se identificaron como cromosomas Bs; en *A. barretoii* se observaron fuera de la placa ecuatorial cromosomas Bs y cromosomas univalentes debido a la disyunción precoz y/o desinapsis temprana de algunos bivalentes. En *A. glaucophyllus*, no se observaron ni cromosomas Bs, ni cromosomas alejados de la placa ecuatorial. La segregación en Anafase I fue normal.

No obstante, Norrmann (1985), estudió la meiosis en *A. exaratus* (N-38, N-100, N-101, N-102) y observó en Diacinesis, la formación de 30 II y ocasionalmente la formación de 28 II + 1 IV, siendo también la segregación normal en Anafase I, a pesar de la presencia de configuraciones cuatrivalentes. En las entidades N-101 y N-102, también observó la presencia de 2 cromosomas Bs, los cuales se apareaban formando 1 II abierto en el 75 % de las células analizadas, permaneciendo separados y comportándose como univalentes en el 25 % restante. En Metafase I, estos univalentes se mostraron fuera y alejados de la placa ecuatorial.

Norrmann y Scarel (2000), analizaron la meiosis de *A. barretoii* en cuya Diacinesis, también observaron la presencia de 30 II y cromosomas Bs, los cuales se asociaban laxamente o permanecían separados comportándose como univalentes. Tanto en esta especie como en *A. glaucophyllus*, la segregación fue regular dando como resultado gametas balanceadas.

Una especie con reproducción sexual es fértil si posee un comportamiento meiótico regular, con apareamiento entre cromosomas homólogos, el cual se refleja en la formación de asociaciones bivalentes (II) en meiosis (Profase I). Ello determina la existencia de una buena segregación y formación de gametos balanceados y fértiles. El análisis del comportamiento meiótico en las especies mediante técnicas de tinción

clásicas, puede aportar datos muy valiosos para evaluar el grado de apareamiento y la homología que existe entre sus cromosomas.

### **Bandeos C / DAPI**

Los resultados obtenidos para esta Tesis, constituyen los primeros registros de análisis de la distribución de la Heterocromatina constitutiva para las especies diploides aquí analizadas. Los patrones observados, se presentaron en forma homomórfica, siendo constantes en todas las células analizadas de cada individuo.

Si bien el patrón de distribución de la heterocromatina, es muy semejante entre estas especies, existe variación en cuanto a la posición y número de las bandas presentes en cada cromosoma. Las tres especies diploides, comparten solo un patrón de distribución de la heterocromatina, el Tipo IA, además, cada especie presenta un patrón propio. Según Guerra (2000), la localización preferencial de la heterocromatina en la región centromérica de todos, o casi todos, los cromosomas de los cariotipos, es un patrón común para las especies con cromosomas pequeños. Tanto *A. selloanus* como *A. macrothrix*, presentan el mismo número de bandas heterocromáticas C+, pero distribuidas en tres y cuatro patrones respectivamente. En cambio, en *A. gyrans*, solo se observaron dos tipos diferentes de patrones.

Cabe destacar que, también se observaron algunas diferencias con respecto a la forma en que se presenta la heterocromatina. Si bien las bandas con posición terminal presentan la misma forma, las bandas intersticiales mostraron aspectos diferentes en *A. selloanus* y *A. macrothrix*. Algunas se observaron como bandas delgadas y otras como pequeños puntos. Las bandas con posición centromérica, también se presentaron con diferentes aspectos, observándose en posición lateralizada en la mayoría de los cromosomas. Este aspecto, se observó no sólo en las tres especies diploides analizadas, sino también en las especies poliploides del género.

El mayor contenido de heterocromatina (26,25 %), fue observado en *A. selloanus* quien posee mayor número de heterocromatina en posición terminal que *A. macrothrix*. En cambio, en *A. gyrans*, se observó un menor número de bandas, las cuales representan el 16,19 % de la longitud total del cariotipo. El bajo contenido de heterocromatina presente en *A. gyrans*, podría deberse a la ausencia de bandas en

posición terminal, las cuales están presentes en las otras dos especies y al menor tamaño de las bandas presentes.

### **Bandeos CMA<sub>3</sub>/ DAPI**

Los resultados obtenidos, constituyen los primeros registros de análisis de la constitución de la heterocromatina en las especies diploides aquí analizadas.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, se pueden establecer en general, siete patrones diferentes de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub>/DAPI, alguno de los cuales presenta alguna variación dentro del mismo patrón. Los patrones observados, se presentaron en forma homomórfica, siendo constantes en todas las células analizadas de cada individuo.

Las tres especies diploides presentan cuatro tipos diferentes de patrones de composición de la heterocromatina, sin embargo, *A. selloanus* y *A. macrothrix*, comparten solo uno de esos patrones, el Tipo IA, y *A. macrothrix* y *A. gyrans* también comparten solo uno, el Tipo VA, los otros patrones son propios de cada especie.

El cariotipo de *Andropogon selloanus*, se caracteriza por presentar el mayor número de bandas de heterocromatina ricas en secuencias de AT y GC, tanto en posición centromérica, las cuales son de mayor tamaño que las observadas en las otras especies diploides analizadas, como presentándose como grandes bloques abarcando uno o ambos brazos cromosómicos, formando brazos y cromosomas heterocromáticos. Además, se observó el menor número de bandas heterocromáticas en posición terminal constituidas por secuencias ricas en AT y GC. Cabe destacar la presencia de un par de cromosomas metacéntricos completamente heterocromáticos, lo que sugiere la presencia del mismo tipo de composición de la heterocromatina a lo largo de todo el cromosoma.

El cariotipo de *A. macrothrix*, presenta cuatro patrones diferentes de composición de la heterocromatina, que se observaron en los cromosomas metacéntricos. Tal patrón de bandas es predominantemente centromérico y terminal, compuesto de pequeñas secuencias ricas en AT y en GC. A diferencia de *A. selloanus*, posee cuatro pares de cromosomas en los cuales no se observaron bandas heterocromáticas. En cambio, *A. gyrans*, exhibe bandas heterocromáticas en todos los cromosomas del complemento excepto en un par. A diferencia de las otras especies diploides, las bandas de

heterocromatina de posición centromérica, están constituida por secuencias ricas en AT y las terminales son ricas en GC.

El análisis de los diferentes patrones de distribución y composición de la heterocromatina, nos mostró que su distribución no es al azar, sino que está ubicada de manera preferencial. Por ejemplo, la heterocromatina asociada a las regiones NOR, mostró una distribución muy marcada a nivel de las regiones teloméricas en los cromosomas con satélites. Es muy frecuente que, en las especies diploides, este tipo de heterocromatina se evidencien positivamente, por técnicas de tinción diferencial: bandas C y fluorocromos con alta afinidad por las secuencias ricas en GC. Esto sugiere que, en estas especies, la composición de la heterocromatina de las regiones organizadoras nucleolares (NORs) y los sitios de ARN ribosomales, están asociados a heterocromatina rica en GC, siendo esta una regla en los vegetales (Schweizer, 1976).

Esta distribución, ubicada preferentemente en regiones cromosómicas, es uno de los aspectos que sugiere que la heterocromatina tiene un significado funcional y evolutivo, que no necesariamente debe ser el mismo para todas las especies, existiendo tendencias o patrones preferenciales para diferentes genomas y cariotipos (Guerra 2000).

Estas técnicas de bandas C + y DAPI/CMA<sub>3</sub>, son una herramienta muy útil para estudios comparativos de genomas y para el análisis de evolución y relaciones filogenéticas entre especies.

### **Bandeos C / DAPI para los poliploides**

Los resultados obtenidos, constituyen los primeros registros de análisis de la distribución de la Heterocromatina constitutiva para las especies poliploides aquí analizadas.

Si bien el patrón de distribución de la heterocromatina, es muy semejante entre estas especies, existen variaciones en cuanto a la posición y número de las bandas presentes en cada cromosoma.

En la especie tetraploide *A. gayanus*, se observó heterocromatina en posición pericentromérica, con aspecto puntiforme hacia un lado y con aspecto de delgada banda hacia el otro lado de la región centromérica. Esta distribución de la heterocromatina también se observó en el diploide *A. selloanus* y con alguna variación

en *A. macrothrix*. El patrón Tipo IIB, presente en *A. gayanus*, también se observó en los hexaploides y en las especies diploides sudamericanas *A. selloanus* y *A. macrothrix*. Con respecto al número de bandas de heterocromatina en posición terminal, se observó el menor número (4) en el tetraploide, mientras que las hexaploides sudamericanas presentaron 30-40 bandas y la especie norteamericana *A. gerardii* 65 bandas.

También en estas especies se observaron algunas diferencias con respecto a la forma en que se presenta la heterocromatina. Las bandas con posición centromérica, se observaron con diferentes aspectos, siendo que en la mayoría de los cromosomas no aparecen con forma de bandas horizontales, sino adoptando una disposición vertical. Este aspecto, también se observó en las tres especies diploides analizadas. Las bandas con posición terminal presentaron el mismo tamaño y forma puntiforme, y las bandas pericentroméricas mostraron aspectos diferentes. Algunas se observaron como bandas delgadas y otras como pequeños puntos.

Se observó que las tres especies hexaploides de la sección *Notosolen* son muy semejantes en el contenido de heterocromatina; sin embargo, presentan mucha diferencia con *A. gayanus*. El bajo contenido de heterocromatina presente en *A. gayanus*, podría deberse a que contiene menor número de cromosomas, menor número de bandas y a la ausencia de bandas en posición terminal, las cuales están presentes y son numerosas en las otras especies.

Todas las especies hexaploides comparten los patrones Tipo IA, IIB y IIIB. Además, comparten con la especie tetraploide el patrón Tipo IA el cual está presente en todas las especies diploides. La heterocromatina centromérica está presente en la mayoría los cromosomas de los complementos poliploides analizados. De acuerdo con estos resultados, se podría inferir que los patrones observados coinciden con los que se describieron para las especies diploides, siendo el patrón de distribución de las regiones heterocromáticas muy semejante entre estas especies. Estos datos sugerirían que las especies diploides *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans*, previamente estudiadas, estarían involucradas en el origen de estos poliploides.

---

**Bandeos CMA<sub>3</sub> / DAPI**

Los resultados obtenidos, constituyen los primeros registros de análisis de la constitución de la heterocromatina en las especies poliploides aquí analizadas.

Las mismas, mostraron un patrón de composición de las regiones heterocromáticas, altamente variable en cuanto a número y localización de las mismas. Los patrones observados, fueron constantes en todas las células analizadas de cada individuo, siendo cada cariotipo, homomórfico para cada patrón.

El cariotipo de *Andropogon gayanus*, se caracteriza por presentar el mayor número de bandas heterocromáticas ricas en secuencias de AT y GC, en posición centromérica, puntiformes, de tamaño semejante a las observadas en las otras especies analizadas. La presencia del cromosoma B se puso de manifiesto con tinción CMA<sub>3</sub>, la cual reveló un brazo heterocromático constituido de secuencias ricas en GC.

Los cariotipos analizados de las especies hexaploides, en general, mostraron un mayor número de bandas heterocromáticas en posición terminal, constituidas por secuencias ricas en AT y GC, de aspecto puntiforme, brillantes. El tamaño de las mismas fue constante en las diferentes especies y se ubicaron preferentemente en los brazos cromosómicos cortos. También se observó heterocromatina en posición centromérica ricas en AT y GC y otras solo ricas en AT, con forma variada, algunas se mostraron como bandas y otras de aspecto puntiforme, de tamaño uniforme e intensas. De todas las especies hexaploides analizadas, *A. exaratus* y *A. barretoii* mostraron la mayor cantidad de bandas heterocromáticas terminales y centroméricas constituidas por secuencias ricas en AT y GC y *A. glaucophyllus* solo mostró 2 bandas heterocromáticas terminales constituidas por secuencias ricas en GC, las cuales se observaron en un par de cromosomas metacéntricos, el resto de los cromosomas del complemento no presentaron bandas heterocromáticas.

La mayor variación en patrones de composición de la heterocromatina, se observó en *A. barretoii* (Tipo IA, IB, IIB, IIIA, IVA, IX y X), quien comparte con *A. exaratus* cuatro de esos patrones (Tipo IA, IIB, IIIA, IVA, IX) y con *A. gayanus* el patrón Tipo IA. Cabe destacar que, *A. gayanus* además, muestra el patrón Tipo IVC que es una variación del patrón presente en las dos especies antes mencionadas. En cambio, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*, presentaron cada una solo un patrón de composición de la heterocromatina,



siendo el patrón de la especie sudamericana Tipo IIIB, una variación del patrón presente en los hexaploides sudamericanos, y el de la especie norteamericana, Tipo VA fue observado en el diploide norteamericano *A. gyrans*.

En estas especies, al igual que en las especies diploides analizadas, los satélites presentaron heterocromatina CMA<sub>3</sub>+. La heterocromatina asociada a las regiones NOR, mostró una distribución muy marcada a nivel de las regiones teloméricas en los cromosomas con satélites. Siendo muy frecuente que, tanto en las especies diploides como en los poliploides, este tipo de heterocromatina se evidencie positivamente, por técnicas de tinción diferencial, bandas C y por fluorocromos con alta afinidad por las secuencias ricas en GC. Esto sugiere que, en estas especies poliploides, la composición de la heterocromatina de las regiones organizadoras nucleolares (NORs) y los sitios de ARN ribosomales, están asociados a heterocromatina rica en GC.

### **Contenido de ADN y niveles de ploidía**

Los contenidos de ADN evidenciaron que las Angiospermas poseen un amplio rango de tamaños de genoma, variando entre 0,1 pg en la especie *Fragaria viridis* a 127,4 pg en *Frittilaria assyriaca* (Bennett y Leitch, 2005). Según Gaut (2002) el grado de variación del contenido de ADN por genoma básico es considerable dentro de las gramíneas, siendo esta diferencia de 36 veces, entre los valores C más bajos y más altos en especies diploides.

El contenido de ADN (2C) en *A. selloanus*, *A. macrothrix*, *A. gyrans*, *A. gayanus*, *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* es explorado por primera vez en esta tesis.

Entre las especies analizadas del género, se detectaron diferencias significativas en el contenido de ADN (2C) entre las especies diploides, entre diploides y tetraploides, y entre estas con las hexaploides. Sin embargo, no se detectó diferencias significativas entre las especies hexaploides entre sí.

Las especies *A. macrothrix* y *A. selloanus* son las que mayor contenido de ADN poseen (Tabla 9). Dentro de este grupo, *A. gyrans*, posee el menor contenido de ADN y el menor contenido por genoma básico. Se detectó diferencia significativa entre las especies diploides y tetraploides y entre el tetraploide y el grupo de las especies hexaploides. No detectándose diferencias significativas entre las especies hexaploides analizadas.

Al relacionar el número de cromosomas con el contenido de ADN 2C (pg), se observó la formación de tres grupos de entidades bien diferenciados, el grupo 1 incluye a las entidades diploides *A. gyrans*, *A. selloanus* y *A. macrothrix* (2C = 2,23; 2,49; 2,61 pg); el grupo 2 contiene al taxa tetrapoide *A. gayanus* (2C = 3,31 pg); y el grupo 3 contiene a los hexaploides *A. exaratus*, *A. glaucophyllus*, *A. barretoii* y *A. gerardii* (2C = 5,6; 6,05; 6,07 y 6,27 pg). Esta formación, muestra un aumento del valor 2C en relación al aumento del nivel de ploidía, lo cual se puede observar en la línea de tendencia (Figura 53).

Los aumentos en el tamaño del genoma surgen predominantemente a través de la poliploidía y la amplificación del ADN repetitivo no codificante, especialmente los retrotransposones (Bennetzen et al. 2005). De acuerdo con lo propuesto por Leitch y Bennett (2004) y Bennett y Leitch (2005), se espera que las especies poliploides tengan valores 2C más altos que sus progenitores diploides. De esta manera, al aumentar el nivel de ploidía, existe un aumento directamente proporcional del contenido de ADN.

Al relacionar el número cromosómico con el contenido de ADN por genoma básico C (pg), se observó que las especies poliploides *A. gayanus*, *A. gerardii*, *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. exaratus*, poseen un valor C más bajo que las entidades diploides analizadas (Tabla 9). El contenido de ADN por genoma básico (C), tanto en los diploides como en los poliploides analizados en esta tesis, varían desde 0,82 pg (*A. gayanus*) a 1,30 pg (*A. macrothrix*), lo cual, de acuerdo con Knight (2005), ubica a estas especies en el rango en el que se encuentra la mayor parte de la Angiospermas. Este autor, exploró la distribución del tamaño del genoma en 3493 angiospermas, notando que alrededor de 3000 especies tienen valores inferiores a 5 pg. Los contenidos de ADN por genoma básico, obtenidos en las especies del género *Andropogon* analizadas, constituyen nuevos datos que apoyan lo propuesto por este autor.

Bennett, Cox y Leitch (1997), con el desarrollo de la primera base electrónica de datos, investigaron cómo cambia el contenido de ADN después de la ploidía. Bennett, Hanson y Leitch (1998) y Bennett, Bhandol y Leitch (2000) observaron que el contenido de ADN por genoma básico disminuía al aumentar los niveles de ploidia en las especies estudiadas (Bennett y Leitch, 2003; Hanson et al. 2001a, b; Hanson et al. 2003; Leitch y Hanson, 2002; Kellogg y Bennetzen, 2004).

En las especies de *Andropogon* analizadas, se observó que el contenido de ADN por genoma básico (C) no aumentó en proporción con el aumento de la ploidía, por el contrario, el tamaño por genoma básico tendió a disminuir al aumentar la ploidía (Figura 54). Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Leitch y Bennett (2004), quienes señalaron que el contenido de ADN por genoma básico, no aumenta en forma proporcional al aumentar la ploidía, tendiendo a disminuir al aumentar ésta. Este análisis sugiere fuertemente que hubo pérdida de ADN durante la estabilización de los poliploides.

En las especies poliploides *A. gayanus*, *A. gerardii*, *A. barretoii*, *A. glaucophyllus* y *A. exaratus*, se observó que los valores C son más bajos que los de las especies diploides, sugiriendo que, en la evolución de estos poliploides, se produjo algún mecanismo de pérdidas de secuencias repetidas de ADN. La especie tetraploide *A. gayanus*, presentó un valor marcadamente inferior, incluso al de las especies hexaploides. Esta significativa disminución del contenido de ADN por genoma básico podría deberse a que, en la estabilización del tetraploide, se produjo una mayor pérdida de secuencias repetidas de ADN que en el caso de los hexaploides. En la formación de estos hexaploides, donde si bien hubo ocurrencia de mecanismos responsables de la pérdida de ADN que pudieron haberse originado después de la poliploidización, ésta pérdida no fue tan marcada.

Las especies hexaploides, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. barretoii*, no mostraron diferencias significativas en el contenido de ADN, sin embargo, en *A. exaratus*, se detectó menor contenido de ADN 2C y C que en las otras dos especies (Tabla 9).

Es importante destacar, que, si bien las características morfológicas y los estudios cromosómicos en híbridos interespecíficos señalan que existe una estrecha cercanía filogenética entre las tres especies, la de mayor parecido morfológico con *A. barretoii* se considera que es *A. glaucophyllus* (Norrman y Quarín, 2001; Nagahama y Norrmann, 2012), entre las cuales se observaron valores muy semejantes de contenido de ADN 2C y C. Pese a esto, poseen diferencias en parámetros citogenéticos como el cariotipo y la distribución de la composición de la heterocromatina, las cuales son evidencias citológicas que se presentan en esta tesis, y que sustentarían la validez de mantener a *A. barretoii* y *A. glaucophyllus* como entidades independientes.

También es interesante destacar que, si bien la especie hexaploide *A. gerardii* presenta el contenido de ADN por genoma básico más alto (C = 1,04 pg), ese valor es

ligeramente menor al del diploide *A. gyrans* ( $C = 1,11$  pg). Ambas especies son de origen norteamericano, y la existencia de cierto grado de afinidad entre ellas, ha sido demostrado mediante la técnica de Hibridación *in situ* Genómica total, realizada para esta tesis (Hidalgo, et al. en prensa; Norrmann (no publicado), resultados que sugieren que el diploide *A. gyrans* podría ser una de las especies involucradas en el origen poliploide de *A. gerardii*.

Para comparar las tendencias, también se analizó el contenido de ADN 2C y C en otras especies hexaploides del género: *A. lateralis* y *A. hypogynus* (Tabla 9). Las mismas son de origen sudamericano y mostraron valores 2C y C muy similares entre sí y con el hexaploide *A. gerardii*.

Es bien sabido que existe una variación significativa en el contenido de ADN nuclear, o tamaño del genoma, dentro de las plantas y en los eucariotas en general, variando el tamaño del genoma incluso en especies muy relacionadas entre sí (Knight et al., 2005).

Existen muchos ejemplos en la literatura, donde se asocia a la poliploidía con la disminución del tamaño del genoma, en términos de contenido de ADN por genoma básico. En los vegetales, gran parte de esta reducción del tamaño del genoma, conocido como “Genome Downsizing”, parecería responder a mecanismos para la reducción del tamaño del genoma como procesos de diploidización genética y citogenética (Soltis et al. 2003; Kellogg y Bennetzen 2004; Leitch y Bennett 2004; Feldman y Levy 2005; Ma y Gustafson 2006; Leitch y Leitch 2013), a la activación de transposones, selección frente a elementos transponibles (Wright y Schoen, 1999; Morgan, 2001). Estudios moleculares recientes en varios otros poliploides, incluidos los pastos (*Triticum* y *Aegilops*), han informado que pueden producirse cambios genómicos extensos a nivel molecular, incluida la eliminación rápida y no aleatoria de secuencias específicas de ADN, después de la formación de los poliploides (Ozkan et al. 2001; Shaked et al. 2001; Liu y Wendel 2002), recombinación homóloga desigual y la recombinación ilegítima (Leitch y Bennett, 2004), la pérdida de genes duplicados, de secuencias de ADN no codificado, también podrían estar involucrados en la reducción del tamaño del genoma (Bennetzen et al. 2005; Leitch y Leitch 2013), incluso hasta la pérdida de segmentos cromosómicos después de la formación de poliploides. Dichos estudios proporcionan más evidencia de que la reducción del tamaño del genoma puede ser un fenómeno generalizado de considerable importancia biológica (Leitch y Bennett 2004).

Se ha sugerido que tales cambios pueden ser una adaptación necesaria para la formación y estabilización de genomas poliploides (Ozkan et al., 2003; Leitch y Bennett 2005)

### **Contenido de ADN y cariotipo**

Las características del cariotipo que se registran más comúnmente para el análisis evolutivo comparativo son el número y tamaño de los cromosomas, la posición y el tipo de constricciones primarias y secundarias, la simetría del cariotipo y el tamaño del genoma, entre otros (Poggio et al., 2014). Las variaciones en el tamaño del genoma pueden correlacionarse con los parámetros del cariotipo, pudiendo afectar a todo el complemento cromosómico o a solamente un conjunto de cromosomas.

Las especies diploides y poliploides analizadas presentan un cariotipo simétrico, constituido principalmente por cromosomas de morfología metacéntrica, dentro de los cuales, cada especie posee al menos, un par de cromosomas con satélite en el brazo corto, revelando un alto grado de conservación del cariotipo. Sin embargo, las entidades diploides, mostraron diferencias significativas respecto al valor del contenido de ADN 2C.

Poggio y col. (2007), informaron que la constancia del cariotipo es producto de cambios en el contenido de ADN que ocurren en el complemento cromosómico completo, y que el incremento de ADN en los cromosomas largos y cortos varía de forma independiente, afirmando que los cambios evolutivos en el contenido de ADN son proporcionales a la longitud del cromosoma, manteniendo la uniformidad del cariotipo. Según estos autores, en las especies diploides con mayor contenido de ADN, los cromosomas cortos agregan cantidades iguales de ADN a ambos brazos, manteniendo su morfología metacéntrica, mientras que los cromosomas largos agregan ADN solo al brazo corto, aumentando la simetría cromosómica.

Sin embargo, si bien las especies poliploides también presentaron cariotipos simétricos, solo se detectó diferencias significativas entre la especie tetraploide con las entidades hexaploides, pero no entre estas últimas.

La correlación entre el contenido de ADN y algunos parámetros del cariotipo (Tabla 10), registró que existe una alta correlación positiva directa entre el incremento del tamaño del genoma (2C) y la longitud total del cariotipo (LTC) y entre el contenido de

ADN por genoma básico (C) y la longitud media del cariotipo (LMC), las cuales están representadas en los diagramas de correlación (Figura 55 y Figura 56).

### Contenido de ADN y heterocromatina

La heterocromatina podría ser un componente adicional del genoma, como es habitual en muchas plantas, pudiendo existir una correlación entre la longitud del cariotipo, el número y la longitud de las bandas C, la cantidad de heterocromatina y el contenido de ADN nuclear. En general, los cambios en el contenido de DNA, están relacionados con ganancias o pérdidas de heterocromatina constitutiva, la cual comprende a la mayoría del ADN altamente repetido (Price, 1988 a, b; Flavel, 1986; Furuta y Nishikawa, 1991).

Se realizaron estudios para determinar si las diferencias en el contenido de ADN de las especies analizadas tienen relación con las diferencias en la presencia de heterocromatina.

Al comparar mediante la técnica de bandeo C, a las especies diploides analizadas, se observaron que las mismas presentaron bandas heterocromáticas de posición centromérica en todos los cromosomas del complemento, además de algunas terminales y muy pocas intersticiales (Figuras 13, 15 y 17 A y B). Sin embargo, se detectaron diferentes contenidos de heterocromatina y una correlación opuesta entre ellas. *Andropogon macrothrix* posee cariotipo de mayor longitud, el mayor contenido de ADN 2C, pero solo un 2% menos en el contenido de heterocromatina que *A. selloanus*. Por otro lado, *A. selloanus*, con el mayor contenido de heterocromatina y sólo 0,12 pg menos en contenido de ADN 2C que *A. macrothrix* presenta la menor longitud de cariotipo de las tres especies. *Andropogon gyrans*, la especie con más bajo contenido de heterocromatina y de ADN 2C, posee mayor longitud de cariotipo que *A. selloanus*.

Si bien, el bajo contenido de heterocromatina en *A. gyrans*, podría deberse a que contiene el menor número de bandas heterocromáticas en general, y estas son de menor tamaño comparadas con las de las otras dos especies diploides.

En el caso de las entidades hexaploides, si bien sus contenidos de ADN 2C son mayores que las especies diploides, solo mostraron un contenido mayor de heterocromatina con respecto al diploide norteamericano *A. gyrans*; y menor contenido de heterocromatina que los diploides sudamericanos. Comparando a las tres

entidades, sus contenidos de ADN 2C y la cantidad de heterocromatina entre ellas es muy semejante, sin embargo *A. glaucophyllus* tiene menor cantidad de heterocromatina, pero mayor número de bandas heterocromáticas que *A. barretoii* el cual tiene mayor contenido de heterocromatina y menor número de bandas. Esta disminución en el contenido de heterocromatina de *A. glaucophyllus*, podría deberse a que presenta bandas de menor tamaño comparada con las de las otras especies hexaploides.

La especie tetraploide *A. gyanus*, presenta la menor cantidad heterocromatina comparada con las especies poliploides aquí analizadas, lo cual podría deberse a su menor número de cromosomas y menor número de bandas, incluso su contenido es mucho menor que el de las especies diploides.

La relación entre el contenido de ADN y el porcentaje de heterocromatina ha sido analizada en poblaciones de maíz de Estados Unidos por Rayburn et al. (1985) y en el género *Zea* (Tito et al. 1991). Estos autores encontraron una asociación positiva entre el contenido de ADN y la heterocromatina en el género *Zea*. Sin embargo, Tito et al. (1991), consideran que la asociación es con el tamaño de las bandas (porcentaje de heterocromatina) más que con el número de bandas C presentes.

Existe una tendencia en la cual se podría pensar que, al disminuir el número de bandas heterocromáticas, disminuye la heterocromatina y por consiguiente el contenido de ADN.

Posiblemente, existen secuencias de ADN repetidas dispersas en el genoma, diferentes a las secuencias de las regiones heterocromáticas que no son detectadas por las técnicas de bandeo utilizadas y que podrían estar involucradas en la variación del contenido de ADN, debido a la pérdida de heterocromatina.

Por ejemplo, en maíz y otras especies del género, la variación en el número y tamaño de las bandas heterocromáticas contribuye a las diferencias en el contenido de ADN (Laurie y Bennett, 1985; Rayburn et al., 1985; Tito, Poggio y Naranjo, 1991). Sin embargo, las secuencias repetitivas dispersas por todo el genoma también contribuyen a la variación del tamaño del genoma (Flavell, 1982, 1986).

Cabe destacar que las dos especies con menor contenido de heterocromatina, tienen diferentes orígenes geográficos: *A. gyrans* es de origen norteamericano y *A. gyanus* es de origen africano, con lo cual el menor valor que presentan respecto al

contenido de heterocromatina comparado con el de las otras especies sudamericanas, quizá podría deberse a diferencias geográficas.

Existen evidencias que relacionan el contenido de ADN y la distribución geográfica en varias especies vegetales (Grime y Mowforth, 1982; Bennett, 1987; Price, 1988a; Poggio y Naranjo, 1990), observándose correlaciones significativas entre la variación intraespecífica en la cantidad de ADN y la latitud y altitud en especies cultivadas y no cultivadas (Bennett, 1987). Todos estos informes sugieren que, en las plantas superiores, el tamaño del genoma podría ser predecible, adaptativo y de importancia evolutiva.

De acuerdo con Tito et al. (1991), quizá la variación en el contenido de heterocromatina observada en las especies hexaploides de *Andropogon*, responda a la diferencia de tamaño de las bandas heterocromáticas más que al número de bandas; y el menor contenido de heterocromatina en el diploide norteamericano y el tetraploide africano, responda a sus diferentes orígenes y distribución geográfica. En general, podemos encontrar diferentes tipos de correlaciones ya sea entre diferencias geográficas, diferencias de altitudes y latitudes, correlaciones positivas o negativas, pero en la mayoría de los casos, el significado adaptativo de la variación en el contenido de heterocromatina dentro de los grupos de plantas superiores aún permanece como un gran interrogante.



### Detección del número y distribución de zonas de ADNr mediante FISH.

Una de las aplicaciones de la técnica de FISH es la obtención de un mapa físico, funcional estructural del genoma, utilizando secuencias de distinto origen como sonda.

El empleo de esta técnica, permitió caracterizar en esta tesis por primera vez, el número, la ubicación y el tamaño de los sitios ribosomales de ADNr 45S en las especies de *Andropogon* analizadas.

La sonda ADN ribosomal 45S, se corresponde con las regiones NOR activas pudiendo detectar, además, otras regiones que podrían estar silenciadas o no expresarse como organizadores nucleolares. En las especies diploides, el análisis de secuencias de ADNr 45S reveló, en las tres especies un par de *loci* de ADNr 45S localizados en los extremos distales de los brazos cortos de dos cromosomas metacéntricos mostrando una alta homomorfía en el patrón FISH de cromosomas homólogos.

En las especies *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans*, se observó que estos *loci* están altamente conservados con la presencia de un importante bloque heterocromático. Tanto el número como la posición de los sitios de ADNr 45S revelados por FISH, se corresponden con el número de cromosomas con satélites observado y con las bandas C+/DAPI y CMA+/DAPI- presentes en la región distal de las constricciones secundarias observadas en los cariotipos de estas especies. Las señales se pudieron observar con igual intensidad en todas las especies, el menor o mayor grado de intensidad está relacionado con el menor o mayor número de copias de las secuencias repetidas de ADNr de un sitio particular (Leitch y Heslop- Harrison 1992, Moscone et al. 1999).

En la especie tetraploide *A. gayanus*, se observaron cuatro señales de hibridación, donde tanto el número como la posición de los sitios de ADNr 45S revelados por FISH, se corresponden con el número de cromosomas con satélites observados y con las bandas C+/DAPI y CMA+/DAPI- presentes en la región distal de las constricciones secundarias observadas en el cariotipo de esta especie.

En las especies hexaploides *A. barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*, se observaron dos señales de hibridación. Según los números de *loci* de ADNr 45S detectado, si bien estos coinciden con el número de cromosomas con satélites y con las bandas C+/DAPI y CMA+/DAPI- presentes en la región distal de las constricciones secundarias observadas en sus cariotipos, estos resultados podrían estar indicando la

pérdida de esas secuencias durante la formación del híbrido que dio lugar a estos alopoliploides. Podría haber ocurrido, que mediante un mecanismo epigenético de metilación, se silenciaron los organizadores nucleolares de una de las dos especies involucradas en la formación del híbrido. Al no ser funcionales debido al silenciamiento, esas secuencias que se encontraban en los sitios de ADN ribosomales de los cromosomas con satélites, pudieron perderse o encontrarse en forma compactada en el cromosoma, por lo cual no fueron detectadas en las experiencias de FISH.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Norrmann et al. (2004), quienes hibridaron con la sonda *pTa71* cromosomas mitóticos del hexaploide sudamericano *A. lateralis*, observando también la presencia de dos *loci* de ADNr (18S.25S), infiriendo que existieron pérdidas de secuencias de ADNr desde la estabilización de los poliploides. Esto concuerda con muchos otros estudios que han informado pérdida de secuencias de ADNr en poliploides (Wendel, 2000).

### **Detección de afinidades genómicas inferidas mediante GISH**

Para resolver las relaciones genómicas entre especies del género *Andropogon*, se realizaron estudios previos, los cuales mediante cruzamientos interespecíficos controlados, lograron con éxito, la obtención de híbridos entre especies diploides (Galdeano y Norrmann, 2000), entre especies diploides y triploides (Norrmann y Quarin 1987), entre especies hexaploides (Peters y Newell, 1961; Norrmann et al., 1997; Norrmann, 1999) y entre hexaploides con enneaploide y aneuploides (Norrmann et al. 1997; Norrmann y Keeler 2003). Las afinidades genómicas propuestas entre las especies del género, han sido inferidas en base al análisis del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis y al apareamiento entre los mismos en aquellos híbridos obtenidos, por lo que la homología inferida hace referencia al comportamiento de los cromosomas, pero no a la información de secuencias a nivel de ADN.

Durante varias décadas, el progreso en la citogenética vegetal, se vio inhibido por la falta de técnicas para la identificación rutinaria de genomas y cromosomas de diferentes orígenes parentales o ancestrales en preparaciones cromosómicas. La mayoría de las angiospermas son poliploides y muchos miles de especies son alopoliploides con genomas ancestrales de dos o más especies. Por ejemplo, *Triticum aestivum* es un alohexaploide donde en su formación están involucrados 3 genomas.

Hubiera sido imposible identificar los diferentes genomas que lo conforman utilizando solamente tinción clásica y poder observar su distribución espacial (Bennett, 1995).

Sin embargo, con el desarrollo de la citogenética molecular, a finales de la década de 1960, Pardue y Gall (1969), desarrollaron una técnica que permitía la localización de moléculas híbridas ADN-ADN en preparaciones citológicas (Heslop-Harrison, 1992). Por esta época, se utilizaba marcación radioactiva de ADN, comenzando su aplicación en vegetales, a fines de la década del '80 debido a la gran disponibilidad de secuencias clonadas que pudieron utilizarse como sonda. Así, se desarrollaron herramientas más eficientes, orientadas al estudio de los cromosomas de forma refinada. Estas herramientas permitieron la identificación de secuencias y regiones en el cromosoma que no se pudieron analizar se a través de la citogenética convencional, garantizando así resultados más fiables, haciéndolos útiles en diferentes enfoques (Bennett, 1995).

La citogenética molecular ha dado lugar a grandes avances en nuestra comprensión de la evolución, la genética y las alteraciones cariotípicas en especies vegetales (Brammer et al., 2007). Esta técnica permite identificar secuencias de ADN en cromosomas mitóticos o meióticos, en núcleos en interfase y en fibras de cromatina extendidas (Brasileiro-Vidal y Guerra, 2002), permitiendo inferencias sobre las probables alteraciones cromosómicas que ocurrieron en un taxón durante el período evolutivo (Silva y Souza, 2013).

Schwarzacher et al. (1989), modificaron con éxito el protocolo de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), para desarrollar una nueva técnica citogenética llamada hibridación *in situ* genómica (GISH) (Markova y Vyskot, 2009). La Hibridación *in situ* genómica, es una técnica molecular que, en la actualidad, permite que el ADN genómico total (ADNg) de una especie parental, se hibride mediante una reacción simultánea o posterior a los cromosomas de un híbrido, permitiendo discriminar los genomas parentales. Su desarrollo fue un sueño hecho realidad (Bennett, 1995).

Fue utilizada por primera vez, en un estudio de organización de genomas parentales en un híbrido intergenérico *Hordeum x Secale*. Durante dos décadas, se ha convertido en una poderosa herramienta para analizar híbridos interespecíficos e intergenéricos y especies alopoliploides, así como líneas de introgresión, adición y sustitución. Además, la posibilidad de emplear sistemas modernos de marcación y detección no radioactivos

y de utilizar ADN genómico total como sonda, impulsaron el uso de esta técnica, que, sin lugar a duda, complementa los resultados obtenidos por la Citogenética clásica.

La eficacia de este método se basa en gran medida en secuencias repetitivas dispersas específicas del genoma. Estas secuencias, son un componente destacado de los genomas nucleares de las plantas (Bennetzen, 1998), pudiendo compartirse entre especies estrechamente relacionadas, permitiendo así, diferenciar los cromosomas de las especies relacionadas (Schwarzacher et al., 1989).

Actualmente, existen numerosos trabajos que ejemplifican la aplicación de las técnicas de ISH, estudios sistemáticos, filogenéticos, evolutivos, de mejoramiento y biotecnológicos, aportado enormemente al conocimiento de la estructura, función, organización y evolución de genes y genomas (Leitch et al., 1990; Bennett y Bennett, 1992; Hinnisdaels et al., 1992; Kenton et al., 1993; Jacobsen et al., 1995; Leggett y Markland, 1995; Benavente et al., 1996 y 1998; Bejarano et al., 1996; Garriga-Calderé et al., 1997; Schubert et al., 1998; Poggio et al., 1999 a y b, Poggio et al., 2000 a y b; Ali Mohammed et al., 2000; Cao et al., 2000; Fedak et al., 2000; Raina y Rani, 2001; Gonzalez et al, 2004).

La técnica de GISH ha sido empleada para revelar homologías específicas, por lo que ha resultado de gran utilidad para identificar la procedencia de los genomas presentes en aloploidoides, razón por la cual fue empleada para resolver relaciones genómicas en algunas especies del género *Andropogon*.

### **Afinidades genómicas entre especies diploides de la sección *Leptopogon***

Para comparar la homología propuesta entre las especies diploides del género, se realizó un experimento de hibridación *in situ* utilizando como sonda ADNg total de *A. macrothrix*, sobre cromosomas mitóticos de *A. selloanus*. Si bien se observó señal de hibridación en todos los cromosomas del complemento de *A. selloanus*, en un par de cromosomas se evidenció un patrón de hibridación más intenso y homogéneo a lo largo de todo el cromosoma, revelando una alta homología entre los genomas de esos cromosomas, incluida la región organizadora nucleolar. En el resto de los cromosomas, el patrón de hibridación es menos uniforme e intenso en uno de los brazos, lo cual podría deberse a diferencias en la condensación de los cromosomas al momento de realizar las preparaciones cromosómicas (Figura 59 B y C). Cabe destacar que, estudios

citogenéticos previos fueron realizados por Norrmann y Galdeano (2000), en híbridos naturales ( $2n=2x=20$ ) registrados entre estas dos especies y en híbridos interespecíficos ( $2n=2x=20$ ) obtenidos del cruzamiento controlado entre ambas especies.

Estos autores analizaron el comportamiento de los cromosomas en meiosis tanto de los híbridos naturales como de los híbridos controlados. La configuración más frecuentemente observada en el 76% de las células estudiadas, en metafase I de los híbridos controlados fue de 7 II (7,3 bivalentes en promedio) y 1 VI (0,76 hexavalente en promedio), y en el resto de las células las configuraciones observadas fueron de 8 II + 1 IV (0,2 tetravalentes en promedio). En los híbridos naturales, en el 94% de las células estudiadas se observaron 7 II + 1VI; y en el 6 % de las células 8 II + 1 IV (7,06 bivalentes, 0,06 tetravalentes y 0,94 hexavalentes en promedio). El alto grado de apareamiento de cromosomas como bivalente durante la meiosis, estaría indicando homología entre los genomas de ambas especies. Sin embargo, la frecuente formación de una asociación hexavalente podría sugerir una translocación heterocigota recíproca que involucra tres pares de cromosomas (Norrmann y Galdeano, 2000).

Norrmann y Quarin (1987), propusieron la fórmula genómica SS, para *A. selloanus*, donde S estaría representando al genoma de *A. selloanus*. Norrmann y Galdeano (2000), al observar la frecuente formación de bivalentes durante la meiosis analizada en los híbridos entre las especies *A. selloanus* y *A. macrothrix*, infirieron en la existencia de homología entre los genomas de ambas entidades, sugiriendo que ambas comparten un genoma básico, el genoma S, el cual estaría involucrado en el origen de ambas especies. Estos autores propusieron para *A. macrothrix*, la fórmula genómica  $S_m S_m$ ; sin embargo, la formación de hexavalentes en los híbridos, sugieren, además, diferencias estructurales entre ambos genomas.

Norrmann et al. (2004), por medio de una experiencia de GISH, hibridaron cromosomas mitóticos de *A. selloanus* (SS) con ADNg de *A. macrothrix* ( $S_m S_m$ ) observando un patrón de hibridación uniforme en todos los cromosomas del complemento, resultados que estarían concordando con los datos aportados para esta tesis.

Para completar el análisis de las relaciones entre los genomas de las especies diploides, se utilizó como sonda ADNg total de *A. selloanus*, sobre cromosomas mitóticos de *A. gyrans*, observándose hibridación en todos los cromosomas del

complemento (Figura 60 A, B y C). Si bien la mayoría de los cromosomas presentaron alta homología entre los genomas de estas especies, cuatro pares presentan un patrón de hibridación en bloque siendo éste uniforme en un solo brazo cromosómico. Esto estaría sugiriendo que en *A. selloanus* existen secuencias que no se encuentran en el genoma de *A. gyrans*. Sin embargo, también se observó que la región organizadora nucleolar de *A. gyrans*, presentó un patrón de hibridación uniforme e intenso (Figura 60 B y C), lo que infiere que estas regiones cromosómicas presentan secuencias de ADN repetido que se encuentran también en el genoma de *A. selloanus*.

Norrmann et al. (2004), por medio de una experiencia de GISH, hibridaron cromosomas meióticos de *A. selloanus* (SS) con ADNg de *A. gyrans*, observando un patrón de hibridación uniforme y homogéneo en todas las asociaciones bivalentes observadas. Cuando estos autores, realizaron el experimento recíproco, utilizando ADN genómico de *A. selloanus* para hibridar cromosomas mitóticos de *A. gyrans* obtuvieron similares resultados.

Todos estos datos concuerdan con los datos aportados para esta tesis sugiriendo que *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans* podrían constituir un grupo homogéneo que comparten un genoma básico, existiendo mayor afinidad genómica entre los diploides sudamericanos. Considerando que el genoma "S" originalmente definido para *A. selloanus*, estaría involucrado en la formación del diploide *A. gyrans*, se propone para éste la fórmula genómica  $S_gS_g$ , teniendo en cuenta que, de acuerdo con los patrones de hibridación observados entre *A. selloanus* y *A. gyrans*, existirían divergencias genómicas entre ambos quizá producto de reestructuraciones cromosómicas.

### **Afinidades genómicas entre especies diploides y una especie triploide de la sección *Leptopogon***

La sonda de ADN genómico total de *A. selloanus* fue empleada para analizar la homología con *A. ternatus*. Mediante esta experiencia, se observaron señales de hibridación en al menos veinte cromosomas de *A. ternatus* (Figura 64 A y B), pero solo diez presentaron un patrón de hibridación intenso y uniforme a lo largo de los cromosomas, incluida la región organizadora nucleolar observada en un par de cromosomas. Este resultado, estaría sugiriendo, la existencia de alta homología entre estos cromosomas y el genoma utilizado como sonda. Los otros diez cromosomas, presentaron un patrón de hibridación menos uniforme, en bloque en un brazo cromosómico, en regiones centroméricas y un patrón en bandas en las regiones teloméricas. Esto podría estar indicando que, en estos cromosomas, existen secuencias de ADN repetido que presentan cierta homología con el genoma de *A. selloanus*, además de divergencias genómicas. Además, se observaron 10 cromosomas que no hibridaron con la sonda utilizada.

Norrmann (1985), al analizar la meiosis de *A. ternatus*, observó un comportamiento muy particular de sus cromosomas. Tanto en Diacinesis como en Metafase I, los cromosomas se asocian formando 10 II + 10 I. El autor, observó la presencia de dos cromosomas muy pequeños, los cuales se comportaban como univalentes. En Anafase I, los bivalentes segregan normalmente, migrando 10 cromosomas a cada polo de la célula, mientras que los 10 univalentes permanecen rezagados formando luego, un núcleo que siempre está incluido en una célula hija. En Profase II, observó la formación de dos células hijas de diferentes tamaños (díadas), una célula uninucleada conteniendo 10 cromosomas y la otra binucleada, donde cada núcleo contiene 10 cromosomas. La segunda división meiótica es normal en la célula hija uninucleada, formándose al final de la meiosis dos microsporas cada una con un núcleo de 10 cromosomas. En la célula binucleada, los cromosomas de ambos núcleos se asocian a las fibras de un huso común y en Anafase II, 20 cromátidas segregan a cada polo. Al final de la meiosis, quedan formadas dos tipos de microsporas: dos con 10 cromosomas y dos con 20 cromosomas.

Norrmann y Quarin (1987), analizaron el proceso de Megasporogénesis en este triploide. Estos autores describieron que, durante la primera división meiótica, en la célula madre de la megáspora, la célula hija micropilar contiene dos núcleos, cada uno

con 10 cromosomas, mientras que la célula hija chalazal contiene un núcleo con 10 cromosomas, luego la segunda división meiótica da lugar a dos megásporas. La célula hija binucleada ubicada hacia la micrópila, comienza a deteriorarse mientras que, la célula hija uninucleada ubicada hacia la chalaza, se divide de manera equitativa para formar dos megásporas, siendo la megáspora funcional la que está ubicada hacia la chalaza. Como es habitual en las gramíneas de reproducción sexual, la megáspora funcional, a través de tres divisiones mitóticas sucesivas, da lugar a un saco embrionario de ocho núcleos, etapa muy corta porque las antípodas proliferan para formar una masa de 8 a 12 células. Como resultado de todos estos procesos, el óvulo siempre tiene un núcleo con 10 cromosomas y los 10 cromosomas que quedaron como univalentes durante la primera división meiótica quedan excluidos.

Norrmann y Quarin (1987), realizaron estudios citogenéticos en híbridos interespecíficos obtenidos mediante cruzamientos controlados entre *A. selloanus* x *A. ternatus* como polinizador; observando que las plántulas de la F1, presentaron características morfológicas intermedias entre los progenitores, además de la presencia de espiguillas aristadas, característica del progenitor masculino, *A. ternatus*. El híbrido F1  $2n = 30$  cromosomas, resultó una planta más vigorosa que cualquiera de sus padres. Al analizar la meiosis, se observó que los cromosomas se aparearon formando  $10 \text{ II} + 10 \text{ I}$ . Quizá, los 10 univalentes pertenecen al genoma de *A. ternatus*, los cuales no se aparean entre sí ni con el resto del complemento, los dos pequeños cromosomas también aparecen en el híbrido como univalentes. En Anafase I, la segregación de los bivalentes tiene lugar en forma regular; los univalentes permanecen rezagados, pero no logran formar un tercer núcleo como en el progenitor paterno. En Telofase I, el comportamiento más común de los univalentes fue la formación de micronúcleos, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en las células hijas. En la Anafase II hay presencia de cromosomas rezagados y micronúcleos en la Telofase I. De acuerdo con los resultados obtenidos, estos autores propusieron, para *A. ternatus*, la fórmula genómica SST, donde el apareamiento de 20 cromosomas formando bivalentes tanto en *A. ternatus* como en los híbridos F1, estarían indicando homología entre uno de los genomas de *A. ternatus* (S) con el genoma de *A. selloanus* (S); y el comportamiento como univalentes de 10 cromosomas podría indicar la presencia de otro genoma involucrado en la formación del triploide, el genoma T (de *ternatus*).



Los resultados de esta tesis, con experimentos de GISH estarían validando, los estudios citogenéticos previamente realizados por Norrmann (1985) y Normann y Quarin (1987), sugiriendo que una forma del genoma "S" del diploide sudamericano *A. selloanus*, estaría involucrado en la formación del triploide *A. ternatus*, en cuya formación, además, habría participado otro genoma, el genoma T.

Se analizó la homología entre *A. ternatus* (SST) con el diploide sudamericano *A. macrothrix* (SmSm) (Figura 61 B y C) y el diploide norteamericano *A. gyrans* (SgSg) (Figura 62 B y C), para lo cual se realizó una doble hibridación. Si bien ambos diploides, *A. macrothrix* y *A. gyrans*, comparten el genoma "S" y se observan señales de homología en al menos 20 cromosomas de *A. ternatus* (Figura 63 A y B), mediante la hibridación *in situ* se pudo observar cromosomas enteros con un patrón de hibridación en bloque hibridados con ambas sondas, como así también, cromosomas donde la homología con ambas sondas solo coincidió en un brazo, pero no en el otro. También se observó que el genoma de *A. macrothrix* no encontró homología en algunos cromosomas de *A. ternatus*, donde secuencias de ADN repetido del genoma de *A. gyrans* hibridaron mostrando un patrón de hibridación en bandas en regiones cromosómicas, en forma de pequeños bloques e incluso un cromosoma entero. Hubo concordancia en aquellos cromosomas que no hibridaron con ninguna de las sondas. El patrón de hibridación observado al utilizar ambas sondas, podría estar indicando la existencia de alguna divergencia de las secuencias de ADN repetido, de modo que algunos cromosomas o regiones cromosómicas de *A. ternatus*, ya no hibridan con las sondas del genoma "S" utilizadas.

No obstante, estos resultados sugieren, que en la formación del triploide sudamericano *A. ternatus*, ha participado alguna forma del genoma "S", quizá presente en los diploides estudiados, lo cual implica la existencia de una estrecha relación con los diploides sudamericanos. Norrmann y Quarin (1987), obtuvieron híbridos interespecíficos por medio de cruzamientos controlados entre el diploide *A. selloanus* y *A. ternatus*. La presencia de cromosomas de *A. ternatus* parcialmente hibridados, podrían indicar la ocurrencia de importantes divergencias genómicas debido a reordenamientos cromosómicos. Esto concuerda con Soltis & Soltis (1999) quienes postularon que la reorganización intra e intergenómica es un evento frecuente en especies poliploides.

**Afinidades genómicas entre especies diploide de la sección *Leptopogon* y una especie tetraploide de la sección *Notosolen*.**

Considerando que el genoma “S”, de *Andropogon selloanus*, podría ser uno de los genomas involucrados en la formación de algunos poliploides del género, se utilizó el ADN genómico total de esta especie como sonda para analizar la existencia de homología con el genoma del tetraploide africano *A. gayanus* (Figura 65 B y C).

En esta experiencia de hibridación, se observó que la mitad del complemento cromosómico de *A. gayanus*, mostró un patrón de hibridación en toda la longitud de los cromosomas, aunque poco homogéneo y de aspecto disperso, con variada intensidad y señales más intensas ubicadas en ciertas regiones cromosómicas. Sin embargo, en las regiones cercanas al organizador nucleolar, la señal de hibridación fue muy débil, prácticamente ausente en el par de satélites, revelando que *A. gayanus*, en estas regiones, no presenta homología a nivel de secuencias de ADN repetido con el genoma de *A. selloanus* (Figura 65 C), contrario a lo que se observó al utilizar esta sonda para hibridar los taxones diploides y el triploide. El cromosoma accesorio B, hibridó con fuerte señal, indicando afinidad entre sus secuencias componentes y el genoma de *A. selloanus* (Figura 65 B y C). También se observaron regiones divergentes entre *A. gayanus* y *A. selloanus*, en al menos 10 cromosomas observándose señales de hibridación poco homogéneas y de aspecto disperso en brazos, partes de brazos y regiones cromosómicas.

*Andropogon gayanus* es una especie nativa, componente principal de la mayor parte de las sabanas de África Tropical del sur de Sahara (Bowden, 1964b), introducida en América del Sur, según datos de 1942, cuando fue introducida en Brasil desde Transvaal (Otero, 1961). Al analizar el comportamiento de los cromosomas en meiosis en *A. gayanus*, se observó la formación de 20 II, y dentro de estas configuraciones, se observó la disyunción precoz de algunos bivalentes (Figura 31 A). Estos resultados, podrían estar indicando que hay apareamiento entre cromosomas homólogos (10 II de un mismo genoma ( $S_{\text{gayanus}}S_{\text{gayanus}}$ ) o de genomas muy parecidos) y el apareamiento de cromosomas homeólogos (10 II de genomas poco afine  $S_1S_1$ , con rearrreglos del genoma S). Esto podría deberse a la existencia de una importante divergencia entre los genomas de estos taxones, lo que se evidenció por la falta de hibridación de al menos 10

cromosomas del complemento tetraploide con el genoma de *A. selloanus*, además de la detección, en aquellos cromosomas hibridados, de un patrón de hibridación poco homogéneo y disperso con la sonda utilizada.

Al analizar la homología entre *A. gayanus* y el diploide *A. gyrans*, se observó un patrón de hibridación intenso en muy pocos cromosomas, pero inespecífico y muy débil en el resto del complemento tetraploide (Figura 66 B). Esto podría estar indicando, una baja afinidad entre los genomas de estas especies. Cabe señalar que, el análisis de la afinidad genómica entre estas especies, se realizó teniendo en cuenta que, si bien *A. gyrans* pertenece a un grupo cerrado de especies estrechamente interrelacionadas, denominado “Complejo *A. virginicus*” (Campbell, 1982a, 1983b), cuyo centro de diversidad es la llanura costera atlántica (Coastal Plain) del sudeste de Estados Unidos, el genoma de esta especie comparte secuencias de ADN repetido con el genoma de los diploides sudamericanas *A. selloanus* y *A. macrothrix* (Norrman et al. 2004; Hidalgo et. al, 2019).

Foster (1962), encontró indicios de hibridación natural entre los diploides *A. gayanus* var. *tridentatus* y *A. tectorum* Schum. y Thonn., una especie estrechamente relacionada con *A. gayanus* (Keeler-Grein y Rainer Schultze-Kraft, 1989) con quien forma el “Complejo *A. gayanus*-*A. tectorum*” ampliamente distribuido en las savannas de Guinea, Nigeria (Okoli & Olodore, 1983). Estos taxones diploides presentan un cariotipo con un patrón muy semejante al de los diploides americanos aquí analizados (Okoli & Olodore, 1983). Por lo que sería importante poder analizar mediante la técnica de GISH, si existe homología entre los genomas de los diploides nigerianos con el genoma de *A. gayanus* y con los genomas de los diploides americanos.

#### **Afinidades genómicas entre una especie triploide de la sección *Leptopogon* y una especie tetraploide de la sección *Notosolen*.**

Al utilizar como sonda ADN<sub>g</sub> total del triploide sudamericana *A. ternatus* (cuyo genoma comparte secuencias de ADN repetido con el genoma de los diploides sudamericanos), sobre cromosomas mitóticos de *A. gayanus*, también se observó la existencia de una importante divergencia entre los genomas de estos taxones, lo que se manifestó por ausencia de hibridación en treinta cromosomas del complemento

tetraploide y por el patrón de hibridación poco homogéneo y disperso en aquellos cromosomas hibridados (Figura 67 C).

**Afinidades genómicas entre una especie tetraploide de la sección *Leptopogon* y una especie tetraploide de la sección *Notosolen*.**

*Andropogon ternarius*, es una especie nativa de todo el sureste de los Estados Unidos, dominante en la sabana alrededor de la frontera entre Texas y Luisiana hasta el Medio Oeste y el noreste hasta Nueva Jersey y Delaware. El complemento cromosómico de *A. ternarius* al ser hibridado con ADNg de *A. gayanus* mostró falta de homología en la mayoría de sus cromosomas y un patrón de hibridación intenso, aunque no homogéneo a lo largo pocos cromosomas (Figura 68 B y C).

**Afinidades genómicas entre una especie diploide de la sección *Leptopogon* y especies hexaploides de la sección *Notosolen*.**

Al utilizar como sonda el ADN genómico total de *A. selloanus*, para hibridar sobre cromosomas mitóticos de *A. barretoi*, se observó homología con la sonda utilizada en al menos 20 cromosomas, aunque con un patrón de hibridación disperso, con variada intensidad. De estos cromosomas, la mayoría presentó hibridación a lo largo del cromosoma, a excepción de las regiones teloméricas heterocromáticas DAPI+, las cuales no mostraron señales de hibridación (Figura 69 B, C y D). Esto podría estar indicando que, si bien se observa cierto grado de homología entre ambos genomas, la ausencia de hibridación en las regiones heterocromáticas DAPI+, podría deberse a que las secuencias de ADN altamente repetido de *A. selloanus* no están presentes en el genoma de *A. barretoi*. De acuerdo con los resultados obtenidos, el par de cromosomas accesorios B, también mostraron alta afinidad con la sonda utilizada. Es importante señalar que, la presencia de dos pares de cromosomas con un patrón de hibridación en un brazo cromosómico, que además se extiende hacia la región pericentromérica del otro brazo, estaría evidenciando la ocurrencia de reordenamientos intergenómicos.

En todas las células estudiadas, se observó una distribución particular de los cromosomas con señales de hibridación, que parecen agruparse en un sector de las células (Figura 69 B y C). Este fenómeno fue observado por Heslop-Harrison (1992) y Kosina & Heslop-Harrison (1996) al estudiar un híbrido trigenérico de la tribu *Triticeae*

Dumort. Los autores argumentan que eso indicaría la existencia de una relación entre la localización de un genoma en el núcleo y su expresión génica. Este fenómeno también fue observado al analizar algunas experiencias de GISH en híbridos interespecíficos dentro del género *Andropogon*, utilizando como sondas ADN total de cada parental, siendo la tendencia de los genomas parentales a permanecer espacialmente separados. Este fenómeno en cromosomas mitóticos, también ha sido observado en híbridos de cereales, tan diversos como *Hordeum vulgare* x *Psathyrostachys fragilis* (Boiss.) Nevski (Linde-Laursen y Jense, 1991), *H. vulgare* x *S. africanum* (Finch et al. 1981) y *H. vulgare* x *H. bulbosum* L. (Schwarzacher et al. 1992a).

El análisis de la meiosis en *A. barretoj*, dio como configuración más frecuente la formación de 30 II + 4-8 Bs (Figura 32 A). Es posible que, de esas configuraciones observadas, el apareamiento de 10 II se realice entre cromosomas con el genoma de diploides sudamericanos o algún ancestro a ellos.

La sonda de *A. selloanus*, también fue utilizada para hibridar el complemento cromosómico de *A. exaratus*, mostrando en 20 cromosomas un patrón de hibridación más homogéneo que lo observado en *A. barretoj*, aunque disperso y menos intenso. De estos cromosomas, la mayoría presentó hibridación a lo largo del cromosoma, pero a diferencia de *A. barretoj*, también hubo hibridación de las secuencias de ADN repetido de las regiones teloméricas heterocromáticas (Figura 70 A, B y C). Esto podría estar indicando que las secuencias de ADN altamente repetido de *A. selloanus* están presentes en el genoma de *A. exaratus*, presentado menos divergencia a nivel de las secuencias de ADN repetido. También esta especie presenta un par de cromosomas con hibridación en un brazo cromosómico, lo que podría estar indicando la ocurrencia de reordenamientos intergenómicos; un par con un patrón de hibridación menos disperso y más intenso en las regiones que se corresponden con regiones ricas en heterocromatina y un par con patrón de hibridación donde las regiones ricas en heterocromatina DAPI+ no están hibridadas.

Al analizar el comportamiento de los cromosomas en meiosis en *A. exaratus*, se observó como configuración más frecuente la formación de 30 II + 2 Bs (Figura 33 A). También en esta especie cabe la posibilidad que, en esas configuraciones observadas, el apareamiento de 10 II se realice entre cromosomas que comparten alguna forma del genoma de diploides sudamericanos o algún ancestro a ellos.

La hibridación de *A. glaucophyllus* con la especie diploide sudamericana, mostró brazos y regiones cromosómicas con señales de hibridación intensas pero muy dispersas, lo que podría estar indicando la presencia de fuertes divergencias entre ambos genomas y la ocurrencia de reordenamientos intergenómicos (Figura 71 A, B, C y D).

Norrmann et al. (2004), por medio de experiencias de GISH, hibridaron cromosomas mitóticos del hexaploide sudamericano *A. lateralis*, con ADNg de *A. selloanus*, observando hibridación en veinte cromosomas del complemento hexaploide, aunque con un patrón de hibridación poco uniforme a lo largo de los cromosomas, siendo más concentrada las señales en las regiones pericentroméricas. Estos autores también analizaron los cromosomas del hexaploide en meiosis, con ADNg de *A. gyrans* utilizado como sonda, obteniendo como resultado hibridación en al menos 10 bivalentes. También obtuvieron resultados similares cuando hibridaron cromosomas mitóticos del hexaploide *A. bicornis* con ADN genómico de ambos diploides sudamericanos *A. selloanus* o *A. macrothrix*. Esto datos, estarían demostrando la presencia del genoma “S” en esos hexaploides. Cabe señalar que tanto los diploides utilizados como sonda como *A. lateralis* y *A. bicornis* pertenecen a la sección *Leptopogon*, dando así estos resultados, cohesión a dicha sección.

La ausencia de homología entre el genoma de *A. selloanus* con el resto del complemento cromosómico de las especies hexaploides de la sección *Notosolen* analizadas para esta tesis, podrían sugerir un origen alopoliploide para *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*. Donde el genoma “S” o alguna variación éste, podría estar involucrado en la formación de estos hexaploides. La baja homología observada entre las secuencias de ADN repetido de los diploides y los hexaploides, podrían estar indicando importantes divergencias. Es importante señalar que la presencia de regiones hibridadas y cromosomas parcialmente hibridados en los hexaploides, podrían estar indicando la ocurrencia de rearrreglos intergenómicos, sugiriendo que estos poliploides variaron de manera tal que ya no presentan una homología completa con el genoma “S” de los diploides. Esto concuerda con lo propuesto por Soltis y Soltis (1999), quienes postularon que la reorganización intra e intergenómica es un evento frecuente en especies poliploides, siendo posible que la falta de hibridación entre la sonda del genoma diploide y la pérdida de secuencias de ADN repetidas en las regiones más

distales de los cromosomas pueda deberse a eventos evolutivos moleculares que ocurrieron desde que surgieron los alohexaploides (Norrman, 2004).

Numerosos estudios moleculares realizados en poliploides (*Triticum*, *Aegilops* entre otros), han informado la ocurrencia de importantes cambios genómicos a nivel molecular, incluyendo la eliminación rápida y no aleatoria de secuencias específicas de ADN postpoliploidización (Ozkan et al. 2001; Shaked et al. 2001; Liu y Wendel 2002). Asumiendo, que tales cambios genómicos podrían ayudar a la estabilización de los poliploides recién formados (Sasakuma et al., 1995; Song et al., 1995; Wendel et al., 1995; Feldman et al., 1997; Liu et al., 1998a, 1998b; Comai et al., 2000).

Los experimentos de GISH realizados utilizando como blanco a las especies *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*, no nos permite descartar a ninguna de las especies diploides sudamericanas analizadas o algún ancestro de ellas, como posibles donantes de uno de los genomas que participaron en la formación de estos poliploides.

#### **Afinidades genómicas entre una especie tetraploide y una especie hexaploide, ambas de la sección *Notosolen*.**

Al analizar las afinidades genómicas entre *A. selloanus* y *A. gayanus*, se observó que, si bien existen divergencias entre los genomas de ambos taxones, evidenciándose por la falta de hibridación en al menos diez cromosomas del complemento del tetraploide y por la presencia de la mitad de los cromosomas hibridados mostrando un patrón de hibridación poco uniforme y de aspecto disperso en toda su longitud, existiría cierto grado de afinidad entre ambos genomas. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió hibridar el complemento cromosómico de *A. glaucophyllus*, con sonda de ADN<sub>g</sub> de *A. gayanus* (Figura 72 A, B, C y D), observándose señales de hibridación en veinte cromosomas del hexaploide, aunque con un patrón de hibridación disperso a lo largo de la mayoría de estos cromosomas. Estos resultados, podrían estar indicando que, secuencias de ADN repetido del genoma “S” o de alguna variante de éste, estarían presente en el genoma del tetraploide, durante la estabilización del hexaploide, con la ocurrencia de rearrreglos cromosómicos intergenómicos manifestados en la ausencia de hibridación en los brazos cromosómicos de cuatro cromosomas. De acuerdo con estos resultados se podría inferir que esos cromosomas hibridados tendrían en su

constitución secuencias de ADN repetido del genoma diploide o de algún genoma relacionado entre la especie tetraploide y el hexaploide.

### **Afinidades genómicas entre una especie diploide y una especie tetraploide de la sección *Leptopogon*.**

Otra serie de experimentos de GISH, se realizaron para analizar las afinidades genómicas entre especies nativas del Hemisferio Norte.

Los cromosomas mitóticos de *A. ternarius*, al ser hibridado con ADN genómico de *A. gyrans* marcado con biotina, presentó regiones de homología en al menos 20 cromosomas, manifestando un patrón de hibridación homogéneo a lo largo de al menos 10 cromosomas y solo en brazos y regiones cromosómicas en los 10 cromosomas restantes (Figura 73 B y C).

### **Afinidades genómicas entre especies diploide de la sección *Leptopogon* y una especie hexaploide de la sección *Andropogon*.**

Dentro de las especies hexaploides americanas existe un grupo considerado un “complejo” para algunos autores (Barnes, 1985, 1986; Wipff, 1996), el llamado “Complejo *A. gerardii*-*A. halii*”. Este grupo pertenece a la Sección *Andropogon* Stapf y está bien representado por dos especies hexaploides: *A. gerardii* Vitman (“*bigbluestem*”) y *A. halii* Hack. (“*sandbluestem*”) distribuidas en el Hemisferio Norte.

*Andropogon gerardii*, es una de las especies nativas de mayor distribución en las praderas de pastos altos, Great Plains Grassland (Weaver & Fitzpatrick, 1934; Weaver, 1954), formando comunidades dominantes.

En 1975, Stebbins hipotetizó sobre el origen genético de los hexaploides en Norteamérica retomando la idea de Gould (1956), que *A. gerardii*, podría haberse originado a partir del cruzamiento intergenérico con especies norteamericanas del género *Bothriochloa*, las cuales en ese momento aún se consideraban miembros de la sección *Amphilopis*. La hipótesis propuesta por Stebbins consideraba que, por un proceso de poliploidización de las especies diploides del género *Andropogon*, de la región del “*Cotton Belt*” (Sureste de Estados Unidos), se habría originado la especie tetraploide *A. ternarius*, el cual luego se cruzó con alguna especie del género



*Bothriochloa*. El sustento de esta hipótesis podría encontrarse en el aparente parecido morfológico entre *A. gerardii* y especies del género *Bothriochloa*. Ciertas similitudes sugeridas por Stebbins (1975), fueron reconocidas como el resultado de procesos evolutivos convergentes (Clayton & Renvoize, 1986).

Para comprobar la hipótesis de Stebbins y analizar las relaciones genómicas entre las especies del hemisferio norte quizá involucradas en el origen del hexaploide *A. gerardii*, se realizaron experiencias de GISH para esta tesis.

Antes de realizar la hibridación con ADNg de una entidad diploide de origen norteamericano, se realizó la hibridación con el diploide sudamericano a fin de detectar la presencia del genoma "S". Se utilizó como sonda el ADNg de *A. selloanus*, sobre cromosomas mitóticos de *A. gerardii*, observándose ausencia de hibridación en la mayoría de los cromosomas y la presencia de un patrón de hibridación disperso y poco uniforme a lo largo de algunos cromosomas, en brazos cromosómicos y en zonas que se corresponden con regiones ricas en heterocromatina (Figura 74 A, B y C). Estos resultados podrían estar indicando la existencia de importantes divergencias entre ambos genomas, posiblemente debido a que *A. selloanus* y *A. gerardii*, además de pertenecer a diferentes secciones (*Leptopogon* y *Andropogon* respectivamente), tienen hábitat y centros de distribución en diferentes hemisferios. La sección *Leptopogon*, considerada la sección más evolucionada y con mayor cantidad de representantes en América (Clayton & Renvoize, 1986; Campbell, 1983b), cuenta con especies diploides, triploides y hexaploides. Las secciones *Notosolen* y *Andropogon*, no cuentan con entidades diploides, registradas hasta el momento. Quizá la mayor parte de la sección *Leptopogon*, podrían haber tenido su centro de evolución en América, como fuera sugerido por Clayton & Renvoize (1986), Norrmann (1999).

Todas las especies diploides estudiadas en esta tesis, pertenecen a la sección *Leptopogon*, y de acuerdo con los resultados obtenidos al analizar el genoma de estas entidades, *A. gyrans* compartiría alguna forma del genoma "S", por lo cual se lo utilizó como sonda para hibrida cromosomas del hexaploide *A. gerardii* (Figura 75 A, B y C). En dicho trabajo, se observó ausencia de hibridación en aproximadamente 20 cromosomas, sin embargo, también se observaron cromosomas hibridados en toda su longitud con un patrón de hibridación homogéneo e intenso lo cual estaría indicando homología entre las secuencias de ADN repetido de la sonda diploide y el genoma del

hexaploide; además se observaron hibridaciones en brazos cromosómicos, en extremos distales de un brazo y en regiones pericentroméricas las cuales se corresponden con regiones ricas en heterocromatina. Estas señales podrían sugerir la existencia de divergencias presentes en ambos genomas y la ocurrencia de rearrreglos intergenómicos durante la estabilización del hexaploide, presentándose cierto grado de homología entre secuencias de ADN repetido.

Estos resultados concuerdan con Norrmann y Nagahama (2012), que al hibridar ambos genomas, observaron ausencia de hibridación en 20 cromosomas, y los cromosomas hibridados presentaron un patrón de hibridación poco uniforme y con variada intensidad. Estos autores sugieren que ha habido divergencias de las secuencias de ADN repetido de algunas regiones cromosómicas durante la evolución del poliploide, considerando que estos cromosomas hibridados presentan secuencias relacionadas con el genoma “S” de *A. selloanus* que está presente en *A. gyrans*. Sin embargo, los cromosomas no hibridados, de los cuales se desconoce su origen genómico, quizá se hayan originado a partir de una especie o de especies constituidas por pocas secuencias de ADN repetido en común con especies de genoma “S”.

Al hibridar el complemento cromosómico del tetraploide *A. ternarius*, con ADN genómico de *A. gyrans*, se observó hibridación a lo largo de aproximadamente diez cromosomas, mostrando un patrón de hibridación muy intenso en toda su longitud, correspondiéndose con regiones ricas en heterocromatina, lo que podría estar indicando que secuencias de ADN repetido del genoma diploide estarían presentes en el tetraploide. Otros diez cromosomas hibridados, muestran fuerte intensidad de hibridación, pero solo en brazos y regiones cromosómicas. Este resultado, podría estar sugiriendo que hubo eventos de pérdidas de secuencias repetidas y la ocurrencia de divergencias al estabilizarse el poliploide, por lo cual las secuencias del diploide ya no hibridan sobre los cromosomas del tetraploide (Figura 73 A, B y C).

---

**Afinidades genómicas ente una especie tetraploide de la sección *Leptopogon* y una especie hexaploide de la sección *Andropogon*.**

También se hibridaron cromosomas de *A. gerardii*, con ADNg de *A. ternarius*. Si bien el complemento cromosómico del hexaploide, al ser hibridado mostró hibridación en todos los cromosomas, el patrón de hibridación se presentó más homogéneo y uniforme en cromosomas enteros y algunas regiones cromosómicas y en otras regiones más disperso y con diferentes intensidades (Figura 76 A, B, C y D). La hibridación fue uniforme y de mucha intensidad en aproximadamente 40 cromosomas (Figura 76 B, C y D). Sin embargo, en la mayoría de ellos, se observó que las regiones teloméricas, tanto las que contienen secuencias repetidas ricas en heterocromatina como las que no presentan heterocromatina DAPI+, no hibridaron con la sonda utilizada, lo mismo se observó en aquellos cromosomas donde hubo ausencia de hibridación en las regiones centroméricas. Estas secuencias de ADN repetido se presentaron como bloques o puntos de heterocromatina, como se puede observar en los cromosomas 11 y 12 (Figura 76 D), observándose ausencia de hibridación en esas regiones; además se observaron señales de hibridación con un patrón en banda en posición distal o proximal en un brazo o en ambos; otros cromosomas presentaron intensa señal, con un patrón de hibridación en banda en la región pericentromérica, correspondiéndose con la misma región rica en heterocromatina. También la constricción secundaria mostró intensa y homogénea señal de hibridación. En general, estos patrones de hibridación podrían estar indicando la pérdida de secuencias de ADN repetido, las cuales se perdieron en los diferentes procesos de formación del poliploide, además de rearrreglos cromosómicos.

La ausencia de hibridación o señal muy débil e inespecífica en uno de los brazos cromosómicos, estaría indicando la ocurrencia de rearrreglos intergenómicos durante la estabilización del hexaploide.

Siguiendo la hipótesis propuesta por Stebbins (1975), se hibridaron cromosomas de *Botriochloa* (*B. eurylemma*) con ADNg de *A. gerardii* (Figura 77 A y B), observándose ausencia de señales de hibridación. Con Norrmann G.A., también realizamos las hibridaciones entre otras especies hexaploides de *Botriochloa* con hexaploides de *Andropogon* (fotos no publicadas en esta tesis). La completa ausencia de hibridación podría estar indicando ausencia de afinidad entre ambos genomas, debido a importantes divergencias a nivel de secuencias repetidas de ADN.

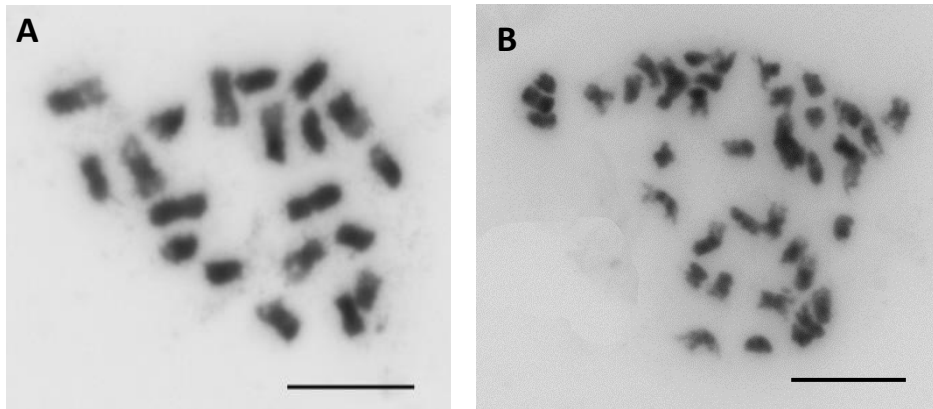
La sucesión de eventos propuestos por Stebbins (1975), para la formación de los hexaploides norteamericanos sería la siguiente: 1. La formación de una entidad tetraploide a partir de la poliploidización de especies diploides norteamericanas; 2. El cruzamiento intergenérico entre el tetraploide originado (*A. ternarius*) y alguna especie del género *Bothriochloa*.

### **Reflexiones sobre el origen de *A. gerardii***

De acuerdo con los resultados obtenidos para esta tesis, la vía propuesta por Stebbins (1975) que a la fecha tendría más solidez sería la premisa (1). Posiblemente alguna especie perteneciente a un grupo de diploides norteamericanos, fuera la donadora de un genoma, dicho grupo podría ser el “Complejo *A. virginicus*”, comúnmente llamados “broomsedges”, el cual fue definido por Campbell (1983b) como un grupo monofilético, cuya monofilia fue demostrada por taxonomía clásica y con numerosos taxa morfológicamente similares (Stebbins, 1957). *Andropogon gyrans* (SgSg), es miembro del “Complejo *A. virginicus*”, además comparte con los diploides sudamericanos *A. selloanus* (SS) y *A. macrothrix* (SmSm) el genoma “S” o alguna forma de variante de dicho genoma, siendo muy posible que los miembros restantes de dicho grupo también contengan el genoma “S” (Norrman et al., 2004; Hidalgo et al., 2019).

Los trabajos de GISH realizados para esta tesis, utilizando como sonda ADN<sub>g</sub> de *A. gyrans* sobre cromosomas de *A. ternarius*, mostraron señales de hibridación en veinte cromosomas, de los cuales la mitad presentó un patrón de hibridación más homogéneo en su longitud y el resto manifestó divergencias y rearrreglos intergenómicos. Estos resultados podrían concordar con la primera premisa de la hipótesis de Stebbins (1975), según la cual, en la formación del tetraploide *A. ternarius*, podría estar involucrado alguna forma del genoma del diploide *A. gyrans* o alguna especie con un genoma semejante (con arreglos del genoma “S”).

Cabe señalar que, la poliploidización natural podría ser un fenómeno recurrente entre las especies del grupo, ya que al realizar preparaciones cromosómicas con diferentes raíces de un mismo individuo del diploide *A. gyrans*, se encontraron algunas raíces con número cromosómico tetraploide *A. gyrans* (A (2n=20) y B (2n=40)).

A. *A. gyrans* 2n = 20B. *A. gyrans* 2n = 40. Barra: 10  $\mu$ m.

Sin embargo, para la segunda premisa (2), existen varios puntos que, actualmente, le quitan sustento a la hipótesis. Por ejemplo, para la época en que se propuso la hipótesis no se conocía la existencia de hexaploides en América del Sur, ya que los primeros recuentos cromosómicos para entidades hexaploides fueron publicados entre 1985 (Norrman) y 1986 (Campbell y Windisch); luego, los trabajos de GISH realizadas para esta tesis con Norrmann G.A., al hibridar especies de *Bothriochloa* con *A. gerardii* y *A. exaratus* estarían sugiriendo muy baja afinidad genómica entre estos taxones y la existencia de importantes divergencias a nivel de secuencias repetidas de ADN; el parecido morfológico entre *Bothriochloa* y *Andropogon* sugerido por Stebbins (1975), actualmente es reconocido, como el resultado de procesos evolutivos convergentes (Clayton & Renvoize, 1986); Gould, 1956; Norrmann, 1999), basándose en la morfología de las espiguillas, sugirió que tanto *A. gerardii* como *A. hallii*, se parecen a los miembros de la sección *Amphilophis* (género *Bothriochloa* según Celarier, 1957 y de Wet, 1968a), pudiendo haber surgido como aloploidos interseccionales o por cruzamiento intergenéricos.

En Estados Unidos, las especies de *Andropogon*, en su mayoría se distribuyen preferentemente hacia los estados del sureste, a excepción de *A. gerardii* y *A. hallii*, que se extienden más al norte y al oeste que otros taxones del género (Keeler, 1992; USDA, 2014). Stebbins (1975) planteó la hipótesis de que esos eventos ancestrales de aloploidización, pueden haber ocurrido en el sureste, involucrando especies más adaptadas a las regiones del oeste de América del Norte, lo que resultó en la naturaleza más xérica de *A. gerardii* y *A. hallii* en comparación con otras especies del género en Norteamérica (McAllister & Miller, 2016). Dentro de este escenario, podrían

encuadrarse varias especies del género *Bothriochloa*, adaptadas a las regiones áridas del oeste de América del Norte. Dado que en la actualidad no se han registrado especies diploides o tetraploides de *Bothriochloa* en América del Norte, Stebbins asumió que el antepasado de estos poliploides superiores de haber existido, estaría extinto.

Según Stebbins (1975), *A. gerardii* y otros complejos poliploides se distribuyeron en las grandes planicies del centro de América del Norte hace aproximadamente cinco millones de años. La poliploidía ha sido reconocida durante mucho tiempo como un factor importante en la evolución de las plantas superiores, incluidas las gramíneas (Stebbins 1971, 1975, 1981). Las praderas norteamericanas se encuentran entre los ecosistemas más recientemente desarrollados en América (Keeler, 1990). Desde el último retroceso de los glaciares, quizá hace no más de 10.000 años, las extensas praderas dominadas por pastos, ocuparon sus posiciones y composiciones actuales (Wells 1970; Stebbins 1975, 1981; Axelrod 1981; Leopold y Dentonm 1987), por lo cual se considera que *A. gerardii*, no se habría podido originar en el lugar que se distribuye actualmente, sino quizá en aquellas regiones en las que no ocurrieron las glaciaciones. Actualmente, existe consenso en el origen de *A. gerardii* en Centroamérica o en el norte de Sudamérica desde donde, luego de la retirada de los hielos, avanzó y colonizó las llanuras norteamericanas (Norrman, 1999; Nagahama y Norrmann, 2012). Estos autores consideran que dicha hipótesis quizá estaría apoyada por la estrecha relación que podría existir entre *A. gerardii* y la especie octoploide *A. hondurensis*, cuyo centro de distribución es Centroamérica y, fue considerada en el pasado como subespecie de *A. gerardii* (Davidse y Pohl, 1972, 1992).

Según los resultados obtenidos para esta tesis, el genoma "S" o alguna variante del mismo, estaría presente en las especies diploides aquí analizadas y en *A. ternarius* y *A. gerardii*, participando en la estabilización de estos poliploides en América. Estos resultados ratificarían lo propuesto por Nagahama & Norrmann (2012) que, en la composición genómica *A. gerardii* intervino el genoma "S" o uno muy similar a éste, además un complemento cromosómico parcialmente relacionado con dicho genoma y un tercer genoma desconocido hasta el momento y aparentemente no relacionado al genoma "S", sugiriendo estos autores la fórmula genómica  $SS S_1S_1 XX$  para *A. gerardii*.

Considerando que, para los trabajos de GISH realizados se utilizó como sonda el ADN<sub>g</sub> de *A. gyrans* para hibridar los cromosomas de *A. gerardii*, y se propuso como

fórmula genómica para dicho diploide (SgSg), se propone aquí, completar esa fórmula genómica y presentarla como SgSg S<sub>1</sub>S<sub>1</sub> XX, (siendo SgSg el genoma del ancestro putativo *A. gyrans*).

Coincidiendo con Nagahama & Norrmann (2012), *A. gyrans* o algún miembro del complejo *A. virginicus*, podría ser la pieza faltante en la hipótesis del origen de los *Andropogon* poliploides en América del Norte propuesta por Stebbins en 1975.

### **Posible origen de los hexaploides en América.**

A continuación, se postulará el posible origen de los hexaploides en América, a partir de los trabajos previos de Norrmann et al., contrastándolos con los datos de las hibridaciones realizadas en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren la existencia de relaciones intergenómicas entre las especies diploides sudamericanas *A. selloanus*, *A. macrothrix* y el diploide norteamericano *A. gyrans*, todas ellas pertenecientes a la sección *Leptopogon* Stapf. Estas entidades, podrían constituir un grupo homomórfico según sus características de cariotipo, su patrón de bandas heterocromáticas presentes en todos los cromosomas y sus afinidades en el número y localización de los loci de secuencias de ADNr, lo que estaría definiendo al genoma “S” (llamado así por *A. selloanus*). Estos datos confirmarían que las tres especies comparten el genoma “S”, tal como fuera postulado por Galdeano & Norrmann (2000) a través de cruzamientos interespecíficos controlados entre *A. selloanus* y *A. macrothrix* y Norrmann et al. (2004) mediante experiencias de GISH. Los diploides sudamericanos, son muy similares entre sí, son especies autógamas (Norrmann 1985) y completamente fértiles (Norrmann & Quarin 1991). Cabe señalar que Nagahama (2012), propuso la monofilia del grupo de entidades diploides sudamericanas a partir de análisis filogenéticos, basándose en caracteres moleculares y morfológicos incorporando, además, a otras dos especies sudamericanas de la sección *Leptopogon*, al diploide *A. leucostachyus* y a *A. ternatus*, si bien es triploide, podría ser considerado como un diploide con un complemento adicional de cromosomas (Norrmann, 1985; Norrmann & Quarin, 1987). En el sur de América del Sur, *A. selloanus* crece en campos naturales o alterados, en forma aislada o en pequeñas poblaciones espaciadas; *A. macrothrix* vive en lugares con alta humedad en el suelo. Sin embargo, ambas pueden vivir en simpatría en grandes áreas de Argentina, Paraguay,

Brasil y Uruguay donde la hibridación natural es posible, aunque en bajo grado (Galdeano & Norrmann 2000). Por otro lado *A. gyrans*, una de las nueve especies diploides de un grupo monofilético (Campbell 1983), norteamericano, con especies autóгамas y/o cleistógamas, estrechamente interrelacionadas, morfológicamente difícil de distinguir entre ellas, pertenece al “Complejo *A. virginicus*”, con centro de diversidad en la llanura costera del sureste de los Estados Unidos, siendo las especies dominantes de este grupo *A. virginicus*, *A. gyrans* y *A. glomeratus* (Campbell 1983).

Cabe destacar que, de acuerdo con los patrones de hibridación aquí observados, existiría mayor afinidad genómica entre los diploides sudamericanos que entre *A. selloanus* y *A. gyrans*, debido a divergencias genómicas presentes entre ambos genomas, quizá producto de reestructuraciones a nivel cromosómico.

El genoma “S” de estos diploides, o alguna variante de dicho genoma, fue detectado en dos especies hexaploides sudamericanas *A. lateralis* y *A. bicornis* (Norrmann et al., 2004), ambas también de la sección *Leptopogon* e incluidas en un grupo denominado “Complejo *A. lateralis* Nees.” En el cono sur de Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay), el complejo está representado por 5 especies (*A. lateralis* Nees, *A. hypogynus* Hack., *A. glaziovii* Hack., *A. bicornis* L., *A. arenarius* Hack.), todos taxones hexaploides cuyos hábitats están restringidos a América Central y América del Sur, a excepción de *A. bicornis*, que tiene la distribución geográfica más amplia del grupo y también está presente en América del Norte (Norrmann, 2009). En las regiones que habitan algunos de estos taxones, existen áreas simpátricas por lo cual, ocurre hibridación habiéndose registrados 5 híbridos interespecíficos naturales (*A. × lindmanii* Hack. (pro. sp.) [*arenarius × lateralis*], *A. × coloratus* Hack. (pro. sp.) [*hypogynus × lateralis*], *A. × subtilior* Hack. (pro. sp.) [*bicornis × lateralis*], *A. × pantanosus* Norrmann [*bicornis × glaziovii*] y *A. × catarinensis* Norrmann [*arenarius × bicornis*]) (Campbell, 1983; Campbell & Windisch, 1986; Norrmann, 1999; 2009; Nagahama 2012).

Norrmann et al. (2004) en sus trabajos de GISH, observaron la existencia de homología entre secuencias de ADN repetidas de las especies diploides sudamericanas y al menos veinte cromosomas de los hexaploides *A. lateralis* y *A. bicornis*, infiriendo que el resto del complemento, si bien podría tener un origen genómico actualmente desconocido, presumiblemente podrían haberse originado de especies que tienen muy pocas secuencias repetidas en común con las especies del genoma “S”, postulando para



estos hexaploides un comportamiento alohexaploide donde el genoma “S” sería uno de los genomas involucrados en la formación de estas entidades, tal como lo sugieren otras contribuciones (Norrman, 1985; Campbell & Windisch, 1986; Norrmann et al., 1997); además estos autores, detectaron divergencias en las secuencias de ADN repetido entre el genoma “S” del diploide norteamericano y estos hexaploides.

Nagahama (2012), estableció la monofilia para este grupo de entidades hexaploides, en base al análisis de caracteres combinados moleculares y morfológicos discretos, considerando que se podría extrapolar la presencia del genoma “S” a todas las especies del complejo.

Como se describiera anteriormente, alguna variante del genoma “S”, también estarían involucrados en la formación del tetraploide norteamericano *A. ternarius* (Sección *Leptopogon* Stapf) y del hexaploide *A. gerardii* (Sección *Andropogon* Stapf). Los resultados obtenidos para esta tesis en trabajos de GISH, estarían señalando la existencia de una forma diferentes de dicho genoma presente en el diploide *A. gyrans*, el cual mostró más afinidad con las entidades norteamericanas que el diploide sudamericano. Según la hipótesis de Stebbins (1975), *A. gerardii*, podría haberse formado a partir de eventos ancestrales de poliploidización de un diploide norteamericano que habría originado al tetraploide. De acuerdo con los resultados de este trabajo, habría más afinidad entre *A. ternarius* y *A. gerardii*, dando sostén a la primera premisa de dicha hipótesis.

América es muy rica en especies que pertenecen a la sección *Leptopogon* Stapf, sin embargo, tiene pocos representantes de otras secciones. *Leptopogon* es considerada la sección más avanzada (Campbell, 1983b; Clayton & Renvoize, 1986; Campbell & Windisch, 1986; Norrmann, 1999), conteniendo especies diploides y hexaploides. En cambio, las secciones *Notosolen* y *Andropogon*, son consideradas las más primitiva y carecen de representantes diploides en América. Por otro lado, África posee al menos un representante de las 4 secciones (Clayton, 1972a; Clayton & Renvoize, 1982).

El genoma “S” de los diploides sudamericanos, fue detectado en tres especies hexaploides sudamericanas *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*, perteneciente a la sección *Notosolen* Stapf. En el contexto del cono sur de Sudamérica, las especies de esta sección son considerada la más primitivas, ya que parecen tener puntos de contacto con especies africanas (Clayton, 1972 a; Clayton & Renvoize, 1986). Este

contacto podría deberse a la existencia de una continuidad geológica entre el este de América del Sur y África Occidental siendo este hecho reconocido desde hace tiempo (Rambo, 1951 a y b, 1956; Raven & Axelrod, 1974).

Estas especies tienen una distribución geográfica muy reducida (Figura 5). *Andropogon glaucophyllus*, vive en cerros graníticos cerca de Porto Alegre, relictos de la Serra do Mar. De acuerdo con Norrmann (1999), *A. glaucophyllus*, se habría extendido desde esa región hacia las planicies cuaternarias del litoral Atlántico del Sur de Brasil y de Uruguay. Este autor considera que la situación inversa es poco probable debido a que todo el litoral es de origen reciente (Rambo, 1954 a y b, 1956; Klein, 1984). *Andropogon barretoj*, vive cerca de *A. glaucophyllus*, habitando una franja muy estrecha de aproximadamente 100 km en la costa norte de la Depresión Central, al oeste de la Serra do Mar coincidiendo con la cuenca del Río Yacuí, formando densas comunidades en los bordes de la ruta. *Andropogon exaratus*, habita zonas anegables del sur de Paraguay y nordeste de Argentina y también vive cerca de *A. glaucophyllus*.

La distribución geográfica de estas especies es relativamente restringida, no son simpátricas, no habiéndose registrado hasta el momento la presencia de híbridos naturales entre ellas. Sin embargo, las combinaciones híbridas en cruzamientos controlados entre estas especies fueron posible y algunas de ellas resultaron de alta fertilidad (Capítulo III-Híbridos interespecíficos-en esta tesis). Por lo cual se podría considerar que tienen una composición genómica muy relacionada y posiblemente un origen común. Cabe señalar, que las secciones *Andropogon* y *Notosolen* son alógamas debido a que presentan un sistema de autoincompatibilidad genética (Norrmann & Scarel, 2000), el cual es considerado por Connor (1981, 1987) como un carácter primitivo, requiriéndose de la polinización cruzada; sin embargo, la autoincompatibilidad se ha perdido en la mayoría de las especies de la sección *Leptopogon*, abriendo el camino a la autopolinización e incluso a la cleistogamia (Campbell, 1982).

Según los resultados obtenidos empleando GISH, el genoma del diploide sudamericano (*A. selloanus*) estaría contribuyendo con un tercio de la mayoría de los genomas de estos hexaploides. Lo que estaría demostrado con la existencia de homología entre las secuencias de ADN repetido entre el genoma diploide y al menos veinte cromosomas de estos hexaploides de la sección *Notosolen*. La ausencia de

hibridación u homología entre el genoma de *A. selloanus* con el resto del complemento cromosómico de estas especies, podrían sugerir un origen aloploidico para *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*. Donde el genoma “S” o alguna variante del mismo, podría estar involucrado en la formación de estas entidades sudamericanas. No obstante, la afinidad detectada entre el genoma diploide y *A. barretoii* estaría indicando importantes divergencias a nivel de las secuencias de ADN repetido particularmente de las regiones teloméricas heterocromáticas, además de la ocurrencia de reordenamiento intergenómicos.

Resultados similares, se observaron entre *A. selloanus* con *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*. La presencia de regiones hibridadas y cromosomas parcialmente hibridados en los hexaploides, estaría indicando que hubo rearrreglos intergenómicos, sugiriendo que en la formación de estos poliploides intervino una variante del genoma “S” de manera que ya no presentan homología completa con el genoma de *A. selloanus*. Soltis y Soltis (1999), postularon que es muy frecuente que durante la estabilización de los poliploides exista una reorganización intra e intergenómica, siendo posible que la ausencia de hibridación pueda deberse a eventos evolutivos moleculares que ocurrieron desde que surgieron los alohexaploides. En estas especies el resto del complemento pudo haberse originado de especies con un genoma diferente o con muy pocas secuencias repetidas en común con las especies del genoma “S”.

Dentro de la sección *Notosolen* encontramos al tetraploide de origen africano *A. gyanus*, en el cual los trabajos de GISH, denotaron la existencia de importantes divergencias entre el genoma de los diploides *A. selloanus* (SS) y *A. gyrans* (SgSg). Estos resultados podrían estar indicando la existencia de mayor cercanía entre *A. selloanus* y el genoma del tetraploide, aunque con la existencia de un patrón de hibridación disperso con posibilidad de que hayan existido rearrreglos intergenómicos, además la ausencia de hibridación podría estar indicando que durante el surgimiento del tetraploide tuvo participación otro genoma aún desconocido o diferente. Mucho más marcada es la falta de afinidad entre el genoma SgSg y el genoma de *A. gyanus*. Moffett & Hurcombe (1949) y Olorode (1972), reportaron citotipos tetraploides ( $2n=4x=40$ ) para todos los individuos provenientes de Nigeria, sin embargo, otros recuentos cromosómicos para el material nigeriano reportaron citotipos diploides ( $2n=2x=20$ ), y aneuploides con  $2n=35$ ,  $2n=42$  y  $2n=43$  cromosomas (Singh y Godwar,

1960). Foster (1962), encontró indicios de hibridación natural entre los diploides *A. gayanus* var. *tridentatus* y *A. tectorum* Schum. y Thonn., una especie estrechamente relacionada con *A. gayanus* (Keeler-Grein y Rainer Schultze-Kraft, 1989) con quien forma el “Complejo *A. gayanus-A. tectorum*” ampliamente distribuido en las savannas de Guinea, Nigeria (Okoli & Olodore, 1983) y pertenecientes a la sección *Notosolen*.

Okoli & Olodore (1983), realizaron cruzamientos controlados entre *A. tectorum* y *A. gayanus*, obteniendo híbridos ( $2n=30$ ). Probablemente, las especies aneuploides registradas en esta especie (Olorode, 1972) sean derivados de patrones de segregación irregulares observados en cromosomas de triploides y tetraploides de *A. tectorum*. Este autor observó un comportamiento irregular de los cromosomas, especialmente en el triploide, con producción de gametos desequilibrados, postulando que las especies aneuploides podrían haberse originado por autofecundación de dichos triploide o de cruzamientos con especies diploides, dando lugar a la gran variedad de aneuploides con números cromosómicos entre 20 y 40. Estos indicios podrían estar indicando la existencia de homologías. Okoli & Olodore (1983), de acuerdo con los resultados obtenidos, postularon que el número diploide en *A. tectorum* es ancestral y los triploides naturales son autotriploides originados por no reducción.

Singh y Godward (1960), hipotetizaron sobre el posible origen de *A. gayanus*, basándose en la continuidad que existe entre la morfología y las preferencias ecológicas de *A. gayanus* y *A. tectorum*. Estos autores, postularon que *A. gayanus* ( $2n=40$ ) resultó de la poliploidización de un híbrido diploide originado entre *A. tectorum* ( $2n=20$ ) y *A. gayanus* ( $2n=20$ ). Trabajos previos realizados en el “Complejo *A. gayanus-A. tectorum*”, estarían respaldando esta hipótesis: la presencia de aneuploides en *A. gayanus* (con  $2n=35, 42$  y  $43$ ) (Singh y Godward, 1961); en *A. tectorum* (con  $2n=23$  y  $40$ ), así como la formación de asociaciones multivalentes durante la Diasineiss en *A. gayanus* (Olorode, 1972) y en *A. tectorum* ( $2n=30$ ), mostrando que la tendencia a un comportamiento poliploide es muy fuerte en dicho complejo. Estos autores observaron la formación de 18 II en promedio, sugiriéndoles que los genomas de los grupos parentales putativos son lo suficientemente distintos como para que el apareamiento se produzca dentro de los genomas de origen común, otra alternativa sería que después de la formación del tetraploide inicial, se produjeron cambios genómicos, estabilizando la meiosis y asegurando la formación bivalente regulares. Esta última posibilidad podría ser la más

probable debido a la presencia de trivalentes en el híbrido interespecífico triploide, lo que podría estar indicando la existencia de homología entre los dos genomas. Estas observaciones sugieren que *A. gayanus* es un alotetraploide que contiene un genoma de *A. tectorum*, y que algunas secuencias de ADN repetido serían homologas entre los dos genomas, proponiendo las fórmulas genómicas TT para *A. tectorum* y para TTtt *A. gayanus*.

Considerando que tanto *A. gayanus* como *A. tectorum* y otras entidades de dicho complejo forman parte de la misma sección (*Notosolen*), sería muy importante poder seguir esta línea de estudio, para poder detectar si existen homologías entre los genomas de las entidades diploides nigerianas (*Notosolen*), compararlas con los genomas de los diploides americanos (*Leptopogon*) y con el genoma de *A. gayanus*. Merece señalarse, que *A. tectorum*, posee un cariotipo simétrico, constituido por cromosomas metacéntricos, muy parecido al patrón observado en los diploides americanos.

2. Cruzamientos entre las secciones: *A. barretoii* (*Notosolen*) x *A. gerardii* (*Andropogon*). En los híbridos resultantes de esta combinación Norrmann (1999), observó una elevada tasa de apareamiento entre los cromosomas. Sin embargo, los trabajos de GISH (Norrmann no publicado, información personal), detectaron muy bajas homologías entre los cromosomas de cada parental. La formación de multivalentes como fenómeno de divergencia está fuertemente sugerida por alguna meiosis, con segregación irregular y formación de micronúcleos.

Norrmann (1999), realizó cruzamientos interespecíficos controlados entre secciones, y en algunos casos la hibridación *in situ* de los híbridos obtenidos. Entre ellos:

1. Cruzamientos entre las secciones: *A. lateralis* (*Leptopogon*) x *A. exaratus* (*Notosolen*). Resultando en cruzamientos con variada cruzabilidad, quizá debido a diferentes genotipos de los parentales utilizados, pero en todos los casos los híbridos resultantes fueron estériles. Esta combinación híbrida puede encontrarse en la naturaleza y también pueden producirse en forma controlada (Norrmann, 1999). Este autor, estudiando la meiosis en estos híbridos, observó que la mayoría de los apareamientos formaban bivalente, además de la formación de trivalentes, tetravalentes y ocasionalmente un hexavalente y univalentes. Los trabajos de GISH

(Norrman no publicado, información personal), revelaron muy baja homología entre estas especies.

3. Hibridación *in situ* Genómica: ADNg de *A. gerardii* (*Andropogon*) sobre cromosomas mitóticos de *A. bicornis* (*Leptopogon*), detectándose más homologías entre sus genomas (Norrman no publicado, información personal).

Estos resultados podrían estar indicando que la sección *Notosolen* no tiene una relación tan cercana con las secciones *Andropogon* o *Leptopogon*. Señalando el caso del genoma de *A. gayanus*, en el cual, según los resultados aquí expuestos, tendría en su constitución genómica alguna variante del genoma del diploide sudamericano (SS), aun siendo de diferentes secciones. Sin embargo, presentó menos afinidad con el triploide sudamericano y con el tetraploide norteamericano ambos de la sección *Leptopogon*. Finalmente, al comparar la afinidad entre *A. gayanus* con el hexaploide *A. glaucophyllus* (ambos *Notosolen*), el comportamiento de estos genomas fue prácticamente semejante a la hibridación con el diploide *A. selloanus*, a juzgar por la cantidad de cromosomas hibridados, lo que estaría señalando la presencia del genoma “S” o alguna variante del mismo.

Norrman (1999), hipotetizó sobre el origen de los taxos hexaploides del género *Andropogon*, considerando posible la existencia de hexaploides ancestrales, los que podrían haberse establecido hace unos 60 millones de años en América y en África.

El género, se diversificó más en América y África que en Asia o Europa (Clayton y Renvoize, 1986; Norrman, 1999). Sin embargo, las diferencias genéticas entre las especies americanas y africanas aún no están completamente definidas. Tal como se expresará en párrafos anteriores, el género *Andropogon* en África, está representado en su gran mayoría por taxones diploides o tetraploides; mientras que en América del Norte y América del Sur son diploides o hexaploides, con algunas pocas excepciones (Norrman et al., 2004; Nagahama y Norrman, 2012). En la actualidad, la ausencia de taxones hexaploides en el continente africano, si realmente están faltando, podría deberse a que estos poliploides encontraron mejores condiciones adaptativas en América y no en África luego de la separación de ambos continentes (Raven & Axelrod, 1974; Hattersley & Watson, 1992); la otra posibilidad es que existan especies hexaploides en África cuyos recuentos cromosómicos no han sido registrados hasta el momento. Existen el registro de un hexaploide africano *A. huillensis* Rendl, en el cual se

detectó diferentes niveles de plodía:  $2n=20$  (Dujardin, 1978),  $2n=60$  (De Wet., 1960) y  $2n = 100$  (Spies & Du Plessis, 1987), lo que podría estar indicando que en esta especie tuvo lugar un proceso de poliploidización quizá a causa de una duplicación genómica (autopoliploide), y no como ocurre en los hexaploides americanos que tienen un comportamiento alopoliploide.

#### **Un escenario para *Notosolen* en el contexto del cono sur Sudamérica:**

*Andropogon gayanus* fue introducido en Sudamérica en la década del '70, los resultados obtenidos mediante la técnica de GISH, podrían estar indicando un comportamiento alopoliploide, coincidiendo con Singh y Godward (1961). Su origen africano se entendería según lo postulado por Singh y Godward (1961), hipótesis de la poliploidización de un híbrido entre dos entidades diploides *A. tectorum* y *A. gayanus* con la posterior estabilización del tetraploide debido a reiterados rearrreglos y cambios genómicos. Según los resultados obtenidos en esta tesis, alguna variante del genoma "S", más afín a la expresión sudamericana que a la norteamericana, estaría presente en el genoma de *A. gayanus*. Como se expresará anteriormente, tanto *A. gayanus* como *A. tectorum* y otras entidades forman parte del "Complejo *A. gayanus-A. tectorum*" incluidas en la sección *Notosolen*, sería muy importante detectar la composición genómica de las entidades diploides parentales putativas africanas, analizar si hay alguna afinidad con el genoma "S" y comparar la existencia de homologías con los genomas diploides nigerianos (*Notosolen*) y con el genoma de *A. gayanus*.

Los resultados obtenidos al analizar las afinidades genómicas utilizando como blanco los complementos de las especies hexaploides, no nos permiten descartar ninguna de las especies diploides sudamericanas aquí estudiadas (*A. sellonus* y *A. macrothrix*) o alguna/algunas entidades diploides que contengan el genoma "S" o alguna expresión del mismo, como posible donador de uno de los genomas involucrados en la formación de estos poliploides.

Varias hipótesis pueden plantearse al respecto. Podría ser que, especie diploides ancestrales estén involucradas directa o indirectamente con el origen de los hexaploides. También pudo haber ocurrido, que un tetraploide se haya originado de alguno de los diploides ancestrales y haya hibridado con otro diploide para dar origen a las especies hexaploides. Esto explicaría también, el hecho de que las especies diploides

presenten cierta homología con las especies hexaploides. Tal como lo planteara Norrmann (1999), las entidades diploides americanas de la sección *Leptopogon*, no deberían considerarse solo como una fuente que dio origen a los hexaploides, sino como una línea separada ancestralmente de los hexaploides, que tuvieron sus propias vías evolutivas.

*Andropogon exaratus*, pareciera mostrar más afinidad con el genoma de *A. selloanus*, presentando mayor uniformidad en la hibridación, menos divergencia a nivel de las secuencias de ADN repetidas de las regiones teloméricas ricas en heterocromatina, además de reordenamientos intergenómicos. Sin embargo, *A. barretoii*, mostró un grado de afinidad con el genoma de *A. selloanus* menos homogéneo y con mayor divergencia a nivel de las secuencias de ADN repetido en las regiones teloméricas ricas en heterocromatina. En ambos poliploides, las divergencias presentes a nivel de estas regiones, podría deberse a que fueron perdiéndose durante los eventos de estabilización del poliploide. Posiblemente, alguna especie diploide ancestral a *A. selloanus* (extinta o aún no estudiada), poseedora de un genoma semejante pero no el mismo, habría participado aportando las regiones ricas en heterocromatina; luego, en los procesos evolutivos, estos diploides pudieron acumular suficientes cambios de manera tal que en la actualidad no encontramos los patrones de hibridación esperados. En cambio, en *A. glaucophyllus* se observaron divergencias entre ambos genomas y la ocurrencia de fuertes reordenamientos intergenómicos.

Por todo lo expuesto, las especies hexaploides de la sección *Notosolen* del cono sur de Sudamérica aquí analizadas, al igual que las de la sección *Leptopogon* y posiblemente *Andropogon*, tienen genomas parcialmente homólogos, con un origen común y ancestral, comportándose las mismas como alopoliploide.

Hasta el momento los resultados mostraron la presencia de un genoma relacionado con el genoma "S", por lo que, hasta que se lleven a cabo experiencias de GISH adicionales para proporcionar más información sobre otros posibles genomas involucrados en la formación de los hexaploides, se asignan las siguientes fórmulas genómicas a cada una de esas entidades:

-Para *A. barretoii* ( $S_{barr}S_{barr}X_1X_1X_2X_2$ ) con un genoma relacionado a *A. selloanus* (SS), y otros genomas aún desconocidos ( $X_1X_1$ ) y ( $X_2X_2$ ).



- Para *A. exaratus* ( $S_{ex}S_{ex}X_3X_3X_4X_4$ ) con un genoma relacionado a *A. selloanus* (SS), y otros genomas aún desconocidos ( $X_3X_3$ ) y ( $X_4X_4$ ).

- Para *A. glaucophyllus* ( $S_{glau}S_{glau}X_5X_5X_6X_6$ ) con un genoma relacionado a *A. selloanus* (SS), y otros genomas aún desconocidos ( $X_5X_5$ ) y ( $X_6X_6$ ).

El resultado de la hibridación entre el tetraploide *A. gayanus* y el hexaploide *A. glaucophyllus*, permitiría suponer que ambas comparten un genoma, un genoma común o ancestral. De acuerdo con los resultados obtenidos, se sugiere que el alguna variante o expresión del genoma “S” comprendería uno de los genomas involucrados en la formación de estos alohexaploides, el cual podría haber estado presente en algún ancestro (extinto o aún no estudiado) de los diploides sudamericanos.

Según Norrmann (1999), sería difícil suponer que genomas de especies de secciones diferentes, hayan podido evolucionar para converger en homologías. Sin embargo, tendría más sustento suponer que la existencia de homología, entre las diferentes especies, aunque sea parcial, debería ser ancestral.

### Capítulo III

#### Híbridos interespecíficos controlados dentro de la sección *Notosolen*

##### Tratamiento taxonómico

##### ***A. barretoi* N146 x *A. glaucophyllus* N103**

Hierba perenne, cespitosa, innovaciones intravaginales, sin rizomas, matas densas de 30-40 cm de diámetros, cañas erectas, cilíndricas, nudos marcados, glabros, altura en estado vegetativo de 130-150 cm y en floración 170-200 cm. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde claro a verde glauco. Vaina glabra en ambas superficies, envolvente, con márgenes solapados separándose varios cm antes de lígula, bordes de los márgenes con tenue membrana. Lígula, membranácea-papirácea, de 1-2 mm de longitud, truncada, aurículas (2) cuando están presentes, de 1,5-2 mm, ápice subagudo, en dirección más o menos paralela al eje foliar, con escasos pelos hialinos de 2 mm de longitud en ambos márgenes, collar descolorido y dividido. Pseudopécíolo, cuya longitud puede llegar hasta 28 cm, presenta una hendidura en toda su longitud de color blanco solo en la cara adaxial. Lámina linear, plana, glabra, convoluta, de color verde a verde glauco, uniforme en ambas superficies, de hasta 70-80 cm x 1 cm, nervio central engrosado, de 1mm de ancho, base de la lámina reducida al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopecioloado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada. Nervio medio prominente en la cara abaxial, verde, y blanquecino solo en la cara adaxial, coloración que nace en la base del pseudopécíolo prolongándose hasta 2/3 de la longitud de la lámina. Varas florales erectas, de 180-200 cm de altura, con nudos marcados y glabros. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, aguda, estrecha, de 12 cm x 0,5 cm, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado. **Racimos** erguidos, gráciles, espiciformes, agrupados de a 3-4 (-5) racimos de espiguillas, de 4-8 cm de longitud, desiguales, notablemente excertos, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sésil. Cada racimo de espiguillas está constituido por 1 diásporo terminal formado por una espiguilla sésil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas y 16-20 pares de espiguillas formados por 1 espiguilla sésil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos filiformes, hueco, de 4,5-7 mm x 0,5 mm, levemente dilatados en el

ápice (0,5 mm), coriáceos, con una hilera de ciliat hialinas de 0,5-1,5-2 mm de longitud en ambas márgenes, dorso convexo tenuemente 3-sulcado en longitud y lado ventral plano, ápice cóncavo oblicuo, dentado. Callo oblicuo de 0,5 mm de diámetro, con pelos rígidos, hialinos de 0,25-0,50 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis. Espiguilla sésil hermafrodita, de 4-5,5-6 mm de longitud, cartácea, aristada, lanceolada, linear; gluma inferior de 4-5,5-6 mm x 1 mm, cartácea, lanceolada, márgenes inflexos tocándose en la porción superior distal, con asperezas antrorsas en el tercio superior, ápice bidenticulado, glabra, dorso plano apenas sulcada, 2 nervios conspicuos en las carenas, bicarenada; gluma superior membranácea (no hialina), de 4 mm de longitud, aquillada, navicular, nervio central marcado, dorso convexo, ápice agudo, mucronado; lemma inferior hialina, lanceolada, de 3,5 mm x 0,5 mm, aguda en el ápice, tenues márgenes inflexos tocándose en la porción apical, glabra; lemma superior hialina, aristada, de 3 mm de longitud, navicular, lobada, ápice bidenticulado libre, nervio central continuándose en una arista cilíndrica, subapical, de 10-12 mm de longitud, base retorcida y linear, castaño oscura, luego geniculada y súbula amarillenta. Palea hialina, enervia, de 1,5-2 mm de longitud, márgenes inflexos desde la mitad hacia la base, borde superior obtuso con escasas pestañas; lodículas (2), hialinas, truncadas, de 0,8 mm de longitud. Estambres 3 con anteras de 2-2,5-3 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida. Ovario con estigmas plumosos de color amarillo claro, de 2-2,5 mm de longitud. Cariopse, castaño, ovoide, de 0,8 mm x 0,5 mm. Espiguilla pedicelada masculina o neutra: pedicelo filiforme, coriáceo, hueco, de 3-4 mm de longitud, dorso convexo, lado ventral plano levemente sulcado, apenas dilatado en el ápice (1 mm), estrechándose hacia la porción media (0,5 mm) y ensanchándose hacia la base (1 mm), con una hilera de pelos hialinos en longitud creciente (0,5-1-1,5 mm) hacia el tercio superior de ambas márgenes, callo oblicuo glabro, ápice cóncavo de borde suave, hueco en el centro. Gluma inferior cartácea, lanceolada, aguda en el ápice, de 4,2-5-7 mm x 1 mm, dorso convexo 4-6-nervia, glabro, márgenes estrechos, inflexos, tocándose en la porción superior distal, carinas escabrosas que se prolongan hacia el ápice en un mucrón de 1 mm de longitud. Gluma superior cartácea, lanceolada, aguda en el ápice, levemente navicular, dorso convexo, de 4 mm de longitud, con márgenes ciliados en el tercio superior. Lemma inferior hialina, estrecha, lanceolada, de 3,5 mm x 0,8 mm, con tenues bordes inflexos ciliados en el tercio superior, uninervia, venación vinácea.

Lemma superior hialina, lobada, de 3 mm de longitud, márgenes enteros ondulados en el tercio superior. Pálea hialina, de 1 mm de longitud, márgenes gruesos, inflexos, tocándose en la porción central y distantes entre sí en el ápice y en la base, ápice bidentado; lodículas (2), membranáceas, de 0,5 mm de longitud. Estambres (3) con anteras de 2 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida.

**Obs. 1:** Un corte transversal del pseudopécíolo nos muestra forma de “U”, con la hendidura casi superficial la cual se extiende en toda su longitud. El fondo de esa hendidura es de color blanco solo en la cara adaxial proyectándose al nervio central de la lámina, mientras que en la cara abaxial es verde.

**Obs. 2:** el follaje tiene un color verde glaucescente como *A. glaucophyllus*, pero con intensidad intermedia.

#### ***A. glaucophyllus* N103 x *A. barretoii* N146**

El diásporo terminal del racimo de espiguillas está compuesto por una espiguilla séstil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas, el diásporo medio compuesto por 1 espiguilla séstil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos del raquis, coriáceo, 4-5 mm de longitud, dilatado en el ápice (1 mm) luego rectilíneo hasta la base donde se estrecha (0,5 mm), dorso convexo, tenuemente acanalado, lado ventral plano, con una hilera de escasas ciliaciones hialinas de 1-2-3 mm de longitud sobre ambos márgenes, ápice cóncavo, tenuemente oblicuo, suavemente dentado, hueco en el centro. Callo oblicuo de 0,3-0,4 mm de diámetro, rodeado de abundantes pelos hialinos, rígidos, de 1-1,5 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis. Espiguilla séstil hermafrodita, de 5-5,5 mm de longitud, cartácea, lanceolada, aguda en el ápice, aristulada, callo oblicuo con pelos hialinos, rígidos de 0,5-2 mm de longitud. Gluma inferior de 5-5,5 mm x 1,2 mm, cartácea, lanceolada, márgenes inflexos tocándose en la porción superior distal, bicarenada, dorso con carenas escabriúsculas en el tercio apical, dorso plano sulcada. Gluma superior membranácea (no hialina), de 5-5,5 mm de longitud, navicular, aquillada, quilla escabriúscula en el tercio superior, dorso convexo. Lemma inferior hialina, lanceolada, de 5 mm x 1,2 mm, aguda en el ápice, márgenes inflexos distantes entre sí borde de los márgenes con ondulaciones hialinas y ciliadas desde el tercio superior. Lemma superior membranácea, de 4,5 mm de longitud, aristulada, navicular, lobada, márgenes hialinos, ondulados, se continúan hacia el ápice

bidenticulado, libres, nervio central continuándose en una arista subapical, de 5-6 mm de longitud, base retorcida castaña, geniculada, súbula rectilínea y amarillenta. Pálea hialina, enervia, márgenes inflexos, distanciados entre sí, de 2,5 mm de longitud, margen superior irregularmente dentado; lodículas (2), membranáceas, de 0,5 mm de longitud, amarillentas, margen superior irregularmente dentadas. Estambres con 3 anteras de 2 mm de longitud. Ovario con 2 estigmas plumosos de color blanco amarillento, de 2 mm de longitud. Espiguilla pedicelada masculina o neutra: pedicelo coriáceo, filiforme, rectilíneo, de 2,5-3-3,2 mm de longitud, levemente dilatado hacia el ápice (0,8 mm) estrechándose en la base (0,2 mm), dorso levemente convexo, lado ventral plano, con una hilera de abundantes pelos hialinos de 1-3-4 mm de longitud en ambas márgenes, ápice cóncavo apenas oblicuo, de suavemente dentado, hueco en el centro. Callo oblicuo, glabro. Gluma inferior cartácea, lanceolada, dorsalmente plana, de 5-6-6,5-7 mm x 1,2 mm, 3-nervia, márgenes inflexos, tocándose en la porción superior distal, bicarenada, carinas escabriúsculas en el tercio apical. Callo con pelos hialinos, rígidos, de 0,5 mm de longitud. Gluma superior cartácea, lanceolada, dorso plano o levemente convexo, aguda en el ápice, de 4,5 mm x 1 mm, márgenes inflexos tocándose en el ápice, bordes de los márgenes hialinos, ondulados, bicarenada, uninervada. Lemma inferior y lemma superior hialinas, lanceoladas, agudas en el ápice, bicarenadas. Lemma inferior de 4,5 mm x 1 mm, márgenes inflexos tocándose en toda su longitud, borde de los márgenes ondulados solapándose en el ápice. Lemma superior de 4-4,5 mm x 1 mm, uninervia. Pálea hialina, de 1,5 mm x 1,2 mm, enervia, tenues márgenes inflexos desde la mitad hacia el ápice distanciados entre sí, margen superior irregularmente dentado; lodículas (2), membranáceas, amarillentas, de 0,5 mm de longitud, truncadas. Estambres 3 con anteras de 2 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida.

***A. barretoii* N146 x *A. exaratus* N106**

Hierba perenne, cespitosa, innovaciones intravaginales, sin rizomas, matas densas de 80-100 cm de diámetros, cañas erectas, cilíndricas, nudos marcados, glabros, altura en estado vegetativo de 110-120 cm y en floración 180-200 cm. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde a verde claro. Vaina aplanada, envolvente, abierta, con márgenes solapados separándose varios cm antes de lígula,

márgenes pilosos, con pelos hialinos de 1,5-2 mm de longitud con mayor densidad en la cara externa a lo largo de ambos márgenes, ocasionalmente densa pilosidad en la zona interna de la lígula. Lígula, membranácea-papirácea, de 1-2 mm de longitud, ocasionalmente, con una hendidura de 2,5 mm de longitud, margen superior truncado, escasos pelos hialinos de 2-3 mm de longitud en los laterales de la lígula y a veces densa pilosidad en el interior de la zona ligular, collar del color de la vaina, continuo. Pseudopécíolo, cuya longitud puede llegar hasta 28-30 cm, presenta en la cara adaxial una hendidura de 2 mm de profundidad en toda su longitud, de color blanco pálido, con pelos hialinos de 5-7 mm de longitud, en la cara abaxial el pseudopécíolo es verde y glabro. Lámina linear, lanceolada, plana, glabra, convoluta, con ápice acuminado, de color verde amarillento en la cara adaxial y verde claro a glauco en la cara abaxial, márgenes con asperezas antrorsas, de hasta 80-90-95 cm x 0,9-1 cm, nervio central engrosado, de 1mm de ancho, de color blanco pálido solo en la cara adaxial y notablemente prominente y verde en la cara abaxial. Esta coloración nace en la base del pseudopécíolo y se prolonga hasta 2/3 de la longitud de la lámina. La base de la lámina es reducida al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopeciulado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces acuminada. Varas florales erectas, de 180-200 cm de altura, con nudos marcados y glabros. **Inflorescencia:** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, aguda, estrecha, de 12-15 cm x 0,5 cm, pedúnculo exserto. **Racimos** erguidos, gráciles, cada nudo con 2-3 ramificaciones simples que terminan en un grupo de 3-4 racimos de espiguillas espiciformes, los cuales pueden ramificarse nuevamente desde la mitad del racimo, llegando a formar hasta 8-9 racimos de espiguillas de hasta 8-9 cm de longitud, espiciformes, desiguales. Cada racimo de espiguillas está constituido por 1 diásporo terminal formado por una espiguilla sésil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas y 18-22 pares de espiguillas formados por 1 espiguilla sésil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos del raquis, subclavados, coriáceo, huecos, de 3,5-4 mm x 0,8 mm, dilatados en el ápice, ligeramente curvos a la madurez, dorso convexo, lado ventral plano, con una hilera de escasas ciliass hialinas de 0,5-1,5 mm de longitud sobre uno de los márgenes, ápice cóncavo fuertemente bidentado, hueco en el centro. Callo oblicuo de 0,5 mm de diámetro, con pelos rígidos, hialinos de 1-1,5 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas

al raquis. Espiguilla sésil hermafrodita: de 5-6 mm de longitud, cartácea, aristada, lanceolada, linear. Gluma inferior cartácea, lanceolada, de 5-6 mm x 1,2 mm, márgenes inflexos apenas tocándose en la porción superior distal prolongándose en un ápice bidenticulado, bicarenada, glabra, dorso plano apenas sulcada, 2 nervios conspicuos en las carenas. Gluma superior membranácea (no hialina), de 4,5 mm de longitud, aquillada, navicular, quilla castaño oscura, escabrosa desde la porción media hacia el ápice, dorso convexo. Lemma inferior hialina, lanceolada, de 4 mm x 1 mm, aguda en el ápice, tenues márgenes inflexos tocándose en la porción apical, enervia, glabra. Lemma superior hialina, aristulada, de 4 mm de longitud, navicular, tenuemente lobada, ápice bidenticulado, ondulado, libre, nervio central se continúa en una arista subapical, de 7-8 mm de longitud, base retorcida, linear, castaño oscuro, luego geniculada, súbula amarillenta. Pálea hialina, enervia, de 2 mm de longitud, tenues márgenes inflexos distanciados entre sí, borde superior irregularmente dentado; lodículas (2), membranáceas, amarillentas, truncadas, de 1 mm de longitud. Estambres (3) con anteras de 2 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida. Ovario con estigmas plumosos de color amarillo pálido, de 2 mm de longitud. Cariopse, castaño, ovoide, de 0,8 mm x 0,5 mm. Espiguilla pedicelada masculina o neutra: pedicelo coriáceo, 2,5-3 mm de longitud, dorso convexo, lado ventral plano, dilatado desde la porción media hacia el ápice (1 mm), estrechándose desde la porción media hacia la base (0,5 mm), con una hilera de pelos hialinos de 1-1,5 mm de longitud en el tercio superior de ambas márgenes, callo oblicuo, con pelos hialinos rígidos de 0,5-1,5 mm de longitud, ápice cóncavo de borde suave, hueco en el centro. Gluma inferior cartácea, lanceolada, acuminada, 5-5,5-6 mm x 1 mm, 3-nervia, glabra, márgenes estrechos inflexos, tocándose en la porción superior distal, carinas escabrosas. Gluma superior membranácea (no hialina), aquillada, navicular, de 4 mm de longitud, dorso convexo, sin márgenes inflexos. Lemma inferior hialina, lanceolada, plana, de 3,5 mm x 1 mm, con tenues márgenes inflexos, glabros, uninervia. Lemma superior hialina, navicular, de 3,5 mm de longitud. Pálea hialina, de 1 mm de longitud, márgenes inflexos desde la porción media hacia la base, gruesos, distanciados entre sí, borde superior con lacinias ciliadas; lodículas (2), membranáceas, amarillentas, de 0,25 mm de longitud. Estambres (3) con anteras de 2 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida.

**A. exaratus N106 x A. glaucophyllus N103 (N327)**

Hierba perenne, cespitosa, matas densas de 50-60 cm de diámetro, de 170-180 cm de altura en estado vegetativo, y hasta 190-250 cm de altura en floración, cañas erectas, cilíndricas, con nudos marcados amarillentos. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde claro a glaucescente. Vaina glabra en ambas superficies, envolvente, con márgenes solapados separándose varios cm antes de lígula, bordes de los márgenes con tenue membrana. Lígula, membranácea-papirácea, de 2-3 mm x 3 mm, borde superior truncado, con escasos pelos hialinos de 1-1,5 mm de longitud en los laterales de la lígula, collar descolorido y dividido. Pseudopécíolo, cuya longitud puede llegar hasta 60-70 cm, presenta una hendidura no muy profunda, en toda su longitud, de color blanco solo en la cara adaxial. Lámina linear, lanceolada, plana, glabra, convoluta, de color verde claro a verde glauco uniforme en ambas superficies, de hasta 90-95 cm x 1 cm, nervio central engrosado, de 1mm de ancho, de color blanco solo en la cara adaxial y prominente y verde en la cara abaxial. Esta coloración nace en la base del pseudopécíolo y se prolonga hasta 2/3 de la longitud de la lámina. La base de la lámina es reducida al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopecioloado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada. Varas florales erectas, de 190-250 cm de altura, con nudos marcados amarillentos y glabros. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, aguda, estrecha, de 10-12 cm x 0,5 cm, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado. **Racimos** erguidos, gráciles, espiciformes, agrupados de a 3-4 (-5) racimos de espiguillas, de 4-8 cm de longitud, desiguales, notablemente excertos, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sésil. Cada racimo de espiguillas está constituido por 1 diásporo terminal formado por una espiguilla sésil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas y 7-11 pares de espiguillas formados por 1 espiguilla sésil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos del raquis, coriáceo, de 3-4 mm x 1 mm, dilatado desde el ápice hasta el tercio inferior luego estrechándose en la base (0,2-0,3 mm) (como copa alargada) dorso convexo, lado ventral plano, con una hilera de escasas ciliás hialinas de 1-2-1,5 mm de longitud sobre ambos márgenes, siendo más abundantes en uno, ápice cóncavo, oblicuo, dentado, hueco en el centro. Callo oblicuo de 0,5 mm de diámetro, glabro. **Espiguillas** subadpresas al raquis.



Espiguilla sésil hermafrodita, de 4,5-5 mm de longitud, cartácea, aristulada, lanceolada, aguda en el ápice. Gluma inferior de 4,5-5 mm x 1 mm, cartácea, lanceolada, márgenes inflexos apenas tocándose en la porción superior distal, bicarenada, carenas escabrosas en el tercio apical, glabra, dorso plano apenas sulcada. Gluma superior membranácea (no hialina), de 4,5 mm de longitud, navicular, aquillada, quilla escabrosa desde la porción media hacia el ápice, dorso convexo. Lemma inferior hialina, de tonalidad vinácea, lanceolada, aguda, de 4,8-5 mm x 1 mm, aguda en el ápice, márgenes inflexos solapándose en la región media, borde con ondas hialinas y ciliadas desde la mitad hacia la región apical, glabra. Lemma superior hialina, aristada, navicular, de 4,8-5 mm de longitud, lobada, ápice ondulado bidentificado, libre, nervio central continuándose en una arista subapical, de 4 mm de longitud, base retorcida, suavemente geniculada, súbula rectilínea y amarillenta. Pálea hialina, enervia, de 3 mm de longitud, márgenes inflexos tocándose en toda la longitud separándose en el ápice, borde superior irregularmente dentado y ciliado; lodículas (2), membranáceas, de 0,5 mm de longitud, amarillentas, margen superior irregularmente dentadas. Estambres con 3 anteras. Ovario con 2 estigmas plumosos de color blanco amarillento, de 2 mm de longitud. Cariopse, castaño, ovoide, de 2 mm de longitud. Espiguilla pedicelada masculina o neutra: pedicelo coriáceo, rectilíneo, de 2-2,5-3-4 mm de longitud, dorso convexo, lado ventral plano, levemente dilatado hacia el ápice (0,7-0,8 mm) estrechándose en la base (0,25 mm), con una hilera de pelos hialinos de 1,5-2 mm de longitud en el tercio superior de una de las márgenes, con escasos pelos hialinos de 1 mm de longitud hacia la base, ápice cóncavo apenas oblicuo, de suavemente dentado, hueco en el centro. Callo oblicuo, glabro. Gluma inferior cartácea, lanceolada, dorsalmente plana, bicarenada, de 4-5 mm x 1,2 mm, 6-nervia, glabra, carenas escabriúsculas en el tercio apical, márgenes inflexos, tocándose en la porción superior distal continuándose en un ápice bidentificado. Gluma superior cartácea, lanceolada, plana, aguda en el ápice, mucronada, de 4 mm x 1 mm, márgenes inflexos tocándose en el tercio apical, con bordes hialinos, ondulados, ciliados, uninervada. Lemma inferior hialina, lanceolada, aguda, mucronada, de 4 mm x 1 mm, márgenes inflexos tocándose en el ápice, con borde ondulado. Lemma superior hialina, lanceolada, aguda en el ápice, mítica, de 4 mm x 1 mm, márgenes inflexos con borde ondulado desde la porción media hacia al ápice y tocándose. Pálea hialina, de 2,5 mm x 1,2 mm, tenue 3-nervia, margen superior

obtusos, pestañosos; lodículas (2), membranáceas, amarillentas, de 0,8-1 mm de longitud, con escasas ciliaciones en el margen superior. Estambres 3 con anteras amarillas de 2 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida.

Híbrido controlado:

Progenitores: madre	padre	Híbrido	Herbario
<i>A. exaratus</i> N 106	<i>A. glaucophyllus</i> N103	N327	CTES

**Obs. 1:** Un corte transversal del pseudopécíolo nos muestra forma de “U”, con la hendidura casi superficial la cual se extiende en toda su longitud. El fondo de esa hendidura es de color blanco solo en la cara adaxial proyectándose al nervio central de la lámina, mientras que en la cara abaxial es verde.

**Obs. 2:** algunos diásporos terminales observados, presentaron 1 espiguilla pedicelada poco desarrollada y neutra y la otra espiguilla pedicelada desarrollada masculina.

**Obs. 3:** el follaje tiene un color glaucescente como *A. glaucophyllus*, pero con menor intensidad.

**Obs. 4:** La cruzabilidad en la combinación *A. exaratus* N 106 x *A. glaucophyllus* N 103, fue de 0.7 (de 2625 espiguillas se obtuvieron 19 híbridos). Los híbridos obtenidos en esta combinación, tienen mayor y mejor vigor híbrido que las plantas obtenidas en el cruzamiento recíproco, pero estériles.

***A. glaucophyllus* N103 x *A. exaratus* N106 (N328)**

Hierba perenne, cespitosa, matas densas de 50-60 cm de diámetro, de 170-175 cm de altura en estado vegetativo, y hasta 190-250 cm de altura en floración, cañas erectas, cilíndricas, con nudos marcados amarillentos. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde a verde glauco. Vaina glabra en ambas superficies, envolvente, con márgenes solapados separándose varios cm antes de lígula, bordes de los márgenes con tenue membrana. Lígula, membranácea-papirácea, de 2-3 mm x 3 mm, borde superior truncado, con escasos pelos hialinos de 2 mm de longitud en los laterales de la lígula, collar descolorido y dividido. Pseudopécíolo, cuya longitud puede llegar hasta 50-60 cm, presenta una hendidura casi superficial, de color blanco solo en la cara adaxial en toda su longitud. Lámina linear, lanceolada, plana, glabra, convoluta,

con ápice acuminado, de color verde claro a verde glauco uniforme en ambas superficies, con márgenes escabrosos, ásperos, de hasta 80-90-95 cm x 0,9-1 cm, nervio central engrosado, de 1mm de ancho, de color blanco solo en la cara adaxial y notablemente prominente y verde en la cara abaxial. Esta coloración nace en la base del pseudopecíolo y se prolonga hasta 2/3 de la longitud de la lámina. La base de la lámina es reducida al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopeciolado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada. Varas florales erectas, de 190-250 cm de altura, con nudos marcados amarillentos y glabros. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, aguda, estrecha, de 12 cm x 0,5 cm, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado. **Racimos** erguidos, gráciles, espiciformes, agrupados de a 2-3-4 (-5) racimos de espiguillas, de 4-10 cm de longitud, desiguales, notablemente excertos, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sésil. Cada racimo de espiguillas está constituido por 1 diásporo terminal formado por una espiguilla sésil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas y 16-22 pares de espiguillas formados por 1 espiguilla sésil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. Artejos del raquis, coriáceo, 3-4 mm de longitud, ligeramente curvos en la base, dilatados en el ápice (1 mm), estrechándose en la base (0,7-0,8 mm), dorso convexo, lado ventral plano, tenuemente acanalado en el dorso o costillas marcadas en los márgenes, con una hilera de cilia hialinas de 2-3 mm de longitud sobre ambos márgenes, más abundante en uno, ápice cóncavo, oblicuo, fuertemente bidentado, hueco en el centro. Callo oblicuo de 0,7-0,8 mm de diámetro, rodeado de pelos hialinos, rígidos, de 1-1,5 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis. Espiguilla sésil hermafrodita, de 5-5,5 mm de longitud, cartácea, aquillada, navicular, lanceolada, lateralmente comprimida, aristulada. Gluma inferior de 5-5,5 mm x 1 mm, cartácea, lanceolada, márgenes inflexos distanciados entre sí prolongándose en un ápice bidentado, bicarenada, dorso con carenas escabriúsculas en el tercio apical, 2-nervias, dorso plano sulcada. Gluma superior membranácea (no hialina), de 5 mm de longitud, aquillada, navicular, quilla suavemente escabriúscula en el tercio superior, dorso convexo, lateralmente comprimida, ápice bidentado unidos por una membrana. Lemma inferior hialina, lanceolada, de 5 mm x 0,8 mm, márgenes inflexos tocándose desde la porción media hacia la base, borde de los márgenes hialinos,

ondulados y ciliados formando una solapa desde la porción media hacia el ápice terminando en una membrana tenue. Lemma superior hialina, de 4 mm de longitud, aristada, navicular, lobada, márgenes hialinos, ondulados, se continúan hacia el ápice bidentado, libres, nervio central continuándose en una arista subapical, de 5-6 mm de longitud, base retorcida castaña, geniculada, súbula rectilínea y amarillenta. Pálea hialina, lanceolada, enervia, márgenes inflexos, distanciados entre sí tocándose en el ápice, borde de los márgenes hialinos, ondulados formando una solapa en el tercio superior, de 3 mm x 0,5, margen superior obtusa, ciliada; lodículas (2), membranáceas, de 0,8 mm de longitud, amarillentas, margen superior bidentadas. Ovario con 2 estigmas plumosos de color amarillo claro, de 2 mm de longitud. Espiguilla pedicelada masculina, pedicelo coriáceo, filiforme, de 3,5-4 mm de longitud, levemente dilatado hacia el ápice (0,8 mm) estrechándose en la base (0,3 mm), dorso levemente convexo, lado ventral plano, con una hilera de abundantes pelos hialinos de 1-2-2,5 mm de longitud en ambas márgenes, ápice cóncavo apenas oblicuo, bidentado, hueco en el centro. Callo oblicuo, con pelos hialinos rígidos, de 0,5 mm de longitud. Gluma inferior cartácea, lanceolada, aguda en el ápice, dorsalmente plana, de 6 mm x 3 mm, 4-nervia, márgenes inflexos, tocándose en la porción superior distal, bicarenada, carinas escabriúsculas en el tercio apical. Gluma superior cartácea, aguda en el ápice, aquillada, navicular, quilla castaño oscura, de 5 mm de longitud, bordes de los márgenes hialinos, ondulados, bicarenada, univervia sobre los márgenes, bordes de los márgenes hialinos y ondulados. Lemma inferior y lemma superior hialinas, lanceoladas, agudas, márgenes inflexos tocándose en toda su longitud, tercio apical rodeado de una membrana hialina ondulada. Lemma inferior de 5 mm x 0.8 mm, lemma superior de 4,5 mm x 0,5 mm. Pálea hialina, de 3 mm, enervia, tenues márgenes inflexos distanciados entre sí, margen superior trunco, ciliado; lodículas (2), membranáceas, de 0,8 mm de longitud, amarillentas, margen superior bidentadas. Estambres 3 con anteras amarillas, de 2 mm de longitud.

Híbrido controlado:

Progenitores: madre	padre	Híbrido	Herbario
<i>A. glaucophyllus</i> N103	<i>A. exaratus</i> N 106	N328	CTES

**Obs. 1:** Un corte transversal del pseudopécíolo nos muestra forma de “U”, con la hendidura casi superficial la cual se extiende en toda su longitud. El fondo de esa hendidura es de color blanco solo en la cara adaxial proyectándose al nervio central de la lámina, mientras que en la cara abaxial es verde.

**Obs. 2:** algunos diásporos terminales observados, presentaron 1 espiguilla pedicelada poco desarrollada y neutra y la otra espiguilla pedicelada desarrollada masculina.

**Obs. 3:** el follaje tiene un color glaucescente como *A. glaucophyllus*, pero con intensidad intermedia.

**Obs. 4:** La cruzabilidad de la combinación *A. glaucophyllus* N 103 x *A. exaratus* N 106, fue de 2.57 (de 3968 espiguillas se obtuvieron 102 plantas híbridas). Estas plantas resultaron fértiles (83,10 % de viabilidad de los granos de polen), motivo por el cual fueron utilizadas como polinizadoras en otros cruzamientos.

**Cruzamientos e híbridos entre secciones *Andropogon* y *Notosolen*****Tratamiento taxonómico*****A. gerardii* N125 x *A. barretoii* N146 (N320)**

Hierba perenne, cespitosa, innovaciones intravaginales, sin rizomas, matas densas de 60-80 cm de diámetros, cañas erectas, cilíndricas, de 180-200 cm de longitud, nudos marcados, glabros, altura en estado vegetativo de 150-160 cm y en floración 180-200 cm. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde. Vaina de superficie glabra, envolvente, de 15-19,5 cm x 1,5 cm, hendida hasta la base, con márgenes solapados separándose 3-5 cm antes de lígula, bordes de los márgenes con tenue membrana. Lígula, membranacea-papirácea, de 2 mm de longitud, truncada, aurículas (2), de 2 mm, pudiéndose desarrollarse sólo 1, entonces de 3-9-10 mm de longitud, ápice subagudo, en dirección más o menos paralela al eje foliar, vaina y región de la lígula se unen por una membrana hialina de 2-2,5 mm de longitud, con escasos pelos hialinos de 2 mm de longitud en ambos márgenes. Pseudopécíolo de 9-28 cm de longitud presenta una hendidura casi superficial en toda su longitud de color blanco

solo en la cara adaxial, en la cara abaxial es prominente y verde. Lámina linear, plana, glabra, convoluta, de 36-49 cm x 0,8 cm, nervio central engrosado, de 1mm de ancho, base de la lámina reducida en la base al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopeciolado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada. Nervio medio engrosado, de 1mm de ancho, base de la lámina reducida al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopeciolado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada, prominente y verde en la cara abaxial, en la cara adaxial es blanquecino, esa coloración nace en la base del pseudopecíolo prolongándose hasta 2/3 de la longitud de la lámina. Varas florales erectas, de 180-200 cm de altura, con nudos glabros. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, aguda, estrecha, de 12 cm x 0,5 cm, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado. **Racimos** erguidos, gráciles, espiciformes, en cada nudo con 2-3 ramificaciones simples que terminan en un grupo de 3-4 (-5) racimos de espiguillas espiciformes de 9-11 cm, de longitud, desiguales, notablemente excertos, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sécil. Cada racimo de espiguillas está constituido por 1 diásporo terminal formado por una espiguilla sécil hermafrodita y/o masculina y dos espiguillas pediceladas masculinas y/o hermafroditas, o neutras o combinadas y 9-22 pares de espiguillas formados por 1 espiguilla sécil hermafrodita o masculina y 1 espiguilla pedicelada masculina o hermafroditas. **Artejos del raquis**, coriáceo, 4-6 mm de longitud, linear, levemente dilatados en el ápice (1 mm), estrechándose hacia la base (0,8-0,9 mm), dorso convexo, tenuemente acanalado en el dorso, lado ventral plano, con una hilera de cilias hialinas de 1-2,5-4 mm de longitud sobre uno de los márgenes y escasos en el otro, ápice cóncavo, oblicuo, bidentado, hueco en el centro. Callo oblicuo de 0,5 mm de diámetro, rodeado de pelos hialinos, rígidos, de 0,5-1,5 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis. **Espiguilla sécil** hermafrodita, de 5,5-6 mm de longitud, cartácea, aquillada, navicular, aristulada, lateralmente comprimida. Callo pequeño con escasas cilias rígidas. **Gluma inferior** de 5-6 mm x 1 mm, cartácea, lanceolada, con tintes vináceos en la base (se observa en el dorso), márgenes inflexos distanciados entre sí prolongándose en un ápice bidentado, bicarenada, dorso con carenas escabriúsculas en el tercio apical, 2-nervias, dorso plano sulcada. **Gluma superior** membranácea (no hialina), de 4,5-5 mm de longitud, aquillada, navicular,

aguda, quilla suavemente escabriúscula en el tercio superior, dorso convexo con tintes vináceos en la base, lateralmente comprimida, márgenes apenas inflexos, bordes de los márgenes hialinos ciliados. **Lemma inferior** hialina, lanceolada, aguda, de 4,5 mm x 0,8 mm, ápice truncado, márgenes inflexos tocándose desde la base hacia el ápice, borde de los márgenes hialinos, ondulados y ciliados en el tercio superior, dorso plano, 1-nervada, sulcada, con tientes vináceos en la base. **Lemma superior** hialina, de 4-4,5 mm de longitud, aristulada, navicular, lobada, márgenes hialinos, ondulados, ciliados, se continúan hacia el ápice bidenticulado, libre, nervio central continuándose en una arista subapical, de 4-5-5,5 mm de longitud, base retorcida castaño oscura, geniculada, súbula rectilínea y amarillenta. Pálea hialina, borde superior subagudo, pestañoso, enervia, márgenes gruesos inflexos hasta el tercio apical, distanciados entre sí, de 2,5-3 mm x 1mm; lodículas (2), membranáceas, de 0,5 mm x 0,5 mm, amarillentas, margen superior dentadas. Ovario con 2 estigmas plumosos amarillos claro, de 2 mm de longitud. **Cariopse** castaño, ovoide, 2 mm de longitud. Estambres (3) con anteras de 2 mm de longitud. **Espiguilla pedicelada** hermafrodita o neutra: pedicelo coriáceo, de 3-3,5 mm de longitud, levemente dilatado hacia el ápice (1 mm) estrechándose en la base (0,2-0,3 mm), ligeramente curvos en la base, dorso convexo, lado ventral plano-sulcado, con una hilera de abundantes cilia hialinas de 2-2,5 mm de longitud en ambas márgenes, ápice cóncavo apenas oblicuo, bordes lisos, hueco en el centro. Callo oblicuo (0,4 mm), con pelos hialinos rígidos, de 0,5-1 mm de longitud. **Gluma inferior** cartácea, lanceolada, aguda en el ápice, de 5-5,5-6 mm x 1,2 mm, nervio central y laterales vináceos, bicarenada, carinas escabriúsculas en el tercio apical. **Gluma superior** cartácea, aguda en el ápice, aquillada, navicular, de 5 mm de longitud, bordes de los márgenes hialinos, ondulados, bicarenada. **Lemma inferior** hialina, lanceolada, subaguda en el ápice, de 4,5 mm x 0,5-0,6 mm, márgenes inflexos tocándose desde la mitad hacia el ápice, borde de los márgenes hialinos, ondulados y ciliados desde la mitad hasta el ápice, 1-nervia. **Lemma superior** hialina, navicular, aguda, mútica, bordes de los márgenes con membrana ondulada y ciliada, de 4,5 mm de longitud. Pálea hialina, de 3 mm, enervia, tenues márgenes inflexos distanciados entre sí, margen superior irregular ciliado; lodículas (2), membranáceas, de 0,3 mm de longitud, amarillentas, margen superior dentado. Ovario con 2 estigmas plumosos de color

amarillo claro. **Cariopse** castaño, ovoide. Estambres (3) con anteras de 3 mm de longitud.

Híbrido controlado:

Progenitores:	madre	padre	Híbrido	Herbario
	<i>A. gerardii</i> N125	<i>A. barretoi</i> N146	N320	CTES, US

**Obs. 1:** lígula con aurículas (2) como en *A. barretoi*, eventualmente, puede tener mayor desarrollo una de ellas y la otra no, en este caso la más desarrollada puede medir 9-10 mm de longitud y al solaparse los márgenes de la vaina para envolver a la caña, esta aurícula queda en posición frontal tapando la región interna de la lígula.

**Obs. 2:** los arreglos florales observados en el diásporo terminal fueron:

a- Espiguilla sésil hermafrodita S(H) y 1 espiguilla pedicelada masculina P(M) formada por 3 anteras desarrolladas, de 2 mm de longitud, amarillas + 3 anteras de 0,5 mm de longitud, de las cuales 2 amarillas y 1 castaño oscuro, seca; y la otra espiguilla pedicelada neutra P (0).

b- Espiguilla sésil hermafrodita S(H) y 1 espiguilla pedicelada con 3 anteras desarrolladas, amarillas, de 3 mm de longitud + gineceo rudimentario no desarrollado P(M) y la otra espiguilla pedicelada masculina P(M) formada por 3 anteras desarrolladas, amarillas, de 3 mm de longitud.

c- Espiguilla sésil masculina S(M) con 3 anteras desarrolladas, amarillas de 3 mm de longitud, no se observó gineceo ni restos de órganos y 1 espiguilla pedicelada con 3 anteras poco desarrolladas, de 0,5 mm de longitud, oscuras y secas y 1 espiguilla pedicelada con 2 anteras desarrolladas, amarillas, de 3 mm de longitud + 1 antera no desarrollada, de 0,5 mm, oscura y seca P(M).

d- Espiguillas sésil hermafrodita S(H) y 1 espiguilla pedicelada con 2 anteras desarrolladas, amarillas de 2,5 mm de longitud + 1 antera no desarrollada, de 0,5 mm de longitud, oscura y seca y la otra espiguilla pedicelada con 3 anteras poco desarrollada, de 0,5 mm de longitud, negras y secas.

**Obs. 3:** los arreglos florales observados en los diásporos medios fueron:

a- Espiguilla sésil masculina S(M) y 1 espiguilla pedicelada masculina P(M) formada por 3 anteras desarrolladas, de 3 mm de longitud, amarillas.



b- Espiguilla sésil hermafrodita S(H) y 1 espiguilla pedicelada masculina P(M) formada por 3 anteras desarrolladas, de 3 mm de longitud, amarillas.

c- Espiguilla sésil masculina S(M) formada por 3 anteras desarrolladas, de 3 mm de longitud, amarillas y 1 espiguilla pedicelada con 3 anteras poco desarrolladas, de 0,5 mm de longitud, oscuras y secas.

d- Espiguilla sésil masculina S(M) formada por 3 anteras desarrolladas, de 3 mm de longitud, amarillas y 1 espiguilla pedicelada con 2 anteras poco desarrolladas de 0,5 mm de longitud, oscuras y secas + 1 antera desarrollada, amarilla, de 3 mm de longitud.

#### ***A. gerardii* N122 x *A. exaratus* N101 (N304)**

Hierba perenne, cespitosa, innovaciones intravaginales, sin rizomas, matas densas de 40-50 cm de diámetros, cañas erectas, cilíndricas, los nudos glabros, no son marcados, con un anillo de color púrpura, altura en estado vegetativo de 100-110 cm y en floración 190-250 cm. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde amarillento. Vaina circular, glabra, envolvente, hendida hasta la base, con márgenes con bordes marcados, solapados, separándose varios cm antes de lígula. Lígula, membranácea-papirácea, de 1 mm de longitud, borde superior truncado, escasos pelos hialinos en ambos laterales, collar continuo, blanquecino. Pseudopécíolo, cuya longitud puede llegar hasta 20-25 cm, presenta una hendidura casi superficial, en toda su longitud de color blanco en la cara adaxial y en la cara dorsal es verde. Lámina linear, plana, glabra, convoluta, de ápice mucronado de color púrpura, de color verde amarillento en la superficie adaxial y verde glauco en la superficie abaxial, de hasta 64-65 cm x 0,8-0,9 cm, nervio central engrosado, de 1 mm de ancho, blanco, base de la lámina reducida al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopecioloado), luego ensanchándose hacia el ápice. Nervio medio prominente en la cara abaxial, verde y blanquecino solo en la cara adaxial, coloración que nace en la base del pseudopécíolo prolongándose hasta 2/3 de la longitud de la lámina. Varas florales erectas, de 190-250 cm de altura, con nudos glabros. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, aguda, estrecha, de 12 cm x 0,5 cm, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado. **Racimos** erguidos, gráciles, espiciformes, agrupados de a 2-3(-5) racimos de espiguillas, de 6-12 cm de longitud, desiguales, notablemente excertos,

raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sésil. Cada racimo de espiguillas está constituido por 1 diásporo terminal formado por una espiguilla sésil hermafrodita o masculina y dos espiguillas pediceladas masculinas, y 23-31 pares de espiguillas formados por 1 espiguilla sésil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. **Artejos** filiformes, hueco, de 2-5 mm de longitud, suavemente dilatados en el ápice (1 mm), angostos en la base (0,8 mm), coriáceos, con un reborde acanalado de 0,5 mm en el ápice, con escasas ciliias hialinas de 1-1,5 mm de longitud en ambos márgenes ventrales o solo uno de los márgenes ciliado, dorso convexo, tenuemente acanalado en longitud en material fresco y fuertemente acanalado en material herborizado, lado ventral plano, ápice cóncavo oblicuo, marcadamente bidentificado, hueco. Callo ligeramente oblicuo de 0,5 mm de diámetro, con pelos rígidos, hialinos, de 1 mm de longitud en el dorso, ventralmente no se observan. **Espiguillas** subadpresas al raquis. **Espiguilla sésil** hermafrodita, de 5-5,5-6 mm de longitud, cartácea, aristada, lanceolada, no se desprende con callo; **gluma inferior** de 5-5,5-6 mm x 1,2 mm, cartácea, lanceolada, márgenes escabriúsculos inflexos, distanciados entre sí prolongándose en un ápice agudo, bidentificado, con asperezas antrorsas desde la mitad hacia el ápice, glabra, dorso plano apenas sulcada, 2 nervios conspicuos escabriusculos en las carenas, bicarenada; **gluma superior** membranácea, de 5-5,5 mm de longitud, aquillada, navicular, nervio central marcado, dorso convexo, ápice agudo bidentificado, borde de los márgenes hialinos con escasas ciliias hialinas; **lemma inferior** hialina, lanceolada, de 5,5 mm x 1 mm, apiculada, desde la mitad hacia la base con tonalidad vinácea, márgenes inflexos que no llegan hasta el ápice, distanciados entre sí, con bordes hialinos ciliados en el tercio superior; **lemma superior** hialina, con tonalidad vinácea, aristada, de 4-4,5 mm de longitud, bilobada, ápice bidentificado libre, nervio central continuándose en una arista cilíndrica, subapical, de 3-8 mm de longitud, columna basal retorcida, púrpura, luego geniculada, súbula amarillenta. Palea hialina, tercio basal con tonalidad vinácea, lanceolada, ápice agudo, tercio apical pestañoso, 1 nervio central marcado, de 3 mm x 1 mm; lodículas (2), hialinas, borde superior truncado e irregularmente pestañoso, de 1 mm x 0,5 mm. Estambres 3 con anteras amarillas de 2-2,5 mm de longitud, funcionales con dehiscencia poricida. Ovario con estigmas plumosos de color amarillo claro, de 2-2,5 mm de longitud. Cariopse, castaño, ovoide, de 0,8 mm x 0,5 mm. **Espiguilla pedicelada** masculina: pedicelo filiforme, rectilíneo,

coriáceo, ápice cóncavo, marcadamente bidenticulado, hueco en el centro, de 4 mm de longitud, dorso convexo, lado ventral plano, apenas dilatado en el ápice (1 mm), estrechándose hacia la base (0,5 mm), con una hilera de pelos hialinos de 1 mm de longitud en el tercio medio e inferior en ambos márgenes y pelos hialinos de 2-3 mm de longitud en el tercio superior en un solo margen. Callo oblicuo piloso, con pelos hialinos rígidos de 0,8-0,9 mm de longitud. **Gluma inferior** cartácea, lanceolada, ápice acuminado, dorso plano, de 5-6 mm x 1,5 mm, un nervio central escabriúsculo en el tercio apical y 3-nervada en cada carena, bicarenada, márgenes estrechos, inflexos, tocándose en el ápice, bordes con asperezas antrorsas en el tercio superior que se prolongan hacia el ápice en un mucrón 1 mm de longitud. **Gluma superior** cartácea, lanceolada, ápice acuminado, de 4,5-5 mm x 1 mm, dorso tenuemente navicular, quilla escabriúscula en el tercio apical y 1-nervio tenue a ambos lados, bicarenada, márgenes estrechos, inflexos, tocándose en el ápice, bordes hialinos, ciliados en el tercio superior. **Lemma inferior** hialina, lanceolada, de 4 mm x 1 mm, con tenues bordes inflexos distanciados entre sí en el tercio inferior y engrosándose hasta tocarse desde la mitad hacia el ápice, ciliados en el tercio superior, ápice bidenticulado ciliado, uninervia, venación vinácea. **Lemma superior** hialina, lanceolada, plana, 1-nervio central y nervios tenues en ambos lados, de 4,5 mm x 1 mm, márgenes inflexos, con bordes hialinos, ciliados en el tercio superior, tocándose. **Pálea** hialina, lanceolada de ápice obtuso, ciliado, 1,5-3 mm x 1 mm, tenues márgenes inflexos en la base, distantes entre sí, borde inferior con 2 nervios tenues o, en material fresco, de 1 mm x 1 mm hialina con tonalidad vinácea y margen superior de 0,5 mm de longitud profundamente dividido; **Iodículas** (2), membranáceas, de 0,5 mm de longitud, amarillentas, margen superior trucado. **Estambres** (3) con anteras de 2 mm de longitud, amarillas, funcionales con dehiscencia poricida.

#### Híbrido controlado:

Progenitores:	madre	padre	Híbrido	Herbario
	<i>A. gerardii</i> N122	<i>A. exararus</i> N101	N304	CTES, US, BAB

**Obs. 1:** Se observó diferente morfología en la palea:

a- Lanceolada de ápice obtuso, hialina, con margen superior ciliado, de 1,5-3 mm x 1 mm, con tenues márgenes inflexos en la base, distantes entre sí.

b- Plana, de 1,5 mm x 1 mm, sin márgenes, hialina con tonalidad vinácea, margen superior profundamente dividido, pestañas de 0,5 mm de longitud.

**(*A. glaucophyllus* x *A. exaratus*) N328 x *A. gerardii* N125 (N331)**

Hierba perenne, cespitosa, matas densas de 50-60 cm de diámetro, de 170-175 cm de altura en estado vegetativo, y hasta 190-250 cm de altura en floración, cañas erectas, cilíndricas, con nudos marcados amarillentos. Innovaciones basales intravaginales, prefoliación convoluta. Follaje, verde claro a verde glauco. Vaina glabra en ambas superficies, envolvente, con márgenes solapados separándose varios cm antes de lígula. Lígula, membranácea-papirácea, de 1-2 mm x 5-6 mm, borde superior truncado, pelos hialinos de 1-2 mm de longitud detrás, entre la lígula y el pseudopécíolo y en los laterales externos de la lígula, collar descolorido y dividido; o, de 2-3 mm de longitud, y presencia de aurícula de 2 mm de longitud. Pseudopécíolo, cuya longitud puede llegar hasta 50-60 cm, presenta una hendidura de 2 mm de profundidad, de color blanco solo en la cara adaxial en toda su longitud. Lámina linear, lanceolada, plana, glabra, convoluta, con ápice acuminado, con mucrón de 0,5-1,5 cm de longitud, superficie adaxial de color verde amarillento, envés de color verde glauco, de hasta 80-90-95 cm x 1-1,5 cm, nervio central engrosado, de 1mm de ancho, de color blanco solo en la cara adaxial y notablemente prominente y verde en la cara abaxial. Esta coloración nace en la base del pseudopécíolo y se prolonga hasta 1/3 de la longitud de la lámina. La base de la lámina es reducida al tamaño de la nervadura central (aspecto pseudopecioloado), luego ensanchándose hacia el ápice y entonces largamente acuminada. Varas florales erectas, de 190-250 cm de altura, con nudos marcados amarillentos y glabros. **Inflorescencia** laxa, compuesta por unidades de inflorescencia terminales y axilares, con racimos espiciformes, digitados o subdigitados. Espateola lanceolada, aguda, estrecha, de 12 cm x 0,5 cm, excerta de los racimos. Pedúnculo delgado. **Racimos** erguidos, gráciles, espiciformes, agrupados de a 3-4 (-5) racimos de espiguillas, de 5-8 cm de longitud, desiguales, notablemente excertos, raquis frágil articulado por debajo de la espiguilla sécil. Cada racimo de espiguillas está constituido por 1 diásporo terminal formado por una espiguilla sécil hermafrodita y dos espiguillas pediceladas masculinas y 14-18 pares de espiguillas formados por 1 espiguilla sécil hermafrodita y 1 espiguilla pedicelada masculina. **Artejos del raquis**, coriáceo, 4 mm de longitud, linear, levemente

curvo hacia la base, tenuemente dilatados en el ápice (1 mm), estrechándose desde la mitad hacia la base (0,8-0,9 mm), reborde en el ápice de 0,5 mm en vista dorsal, dorso convexo, tenuemente acanalado en longitud en la mitad superior, lado ventral plano en toda su longitud, con una hilera de cilias hialinas de 1-2-3 mm de longitud sobre uno de los márgenes, ápice cóncavo, oblicuo, marcadamente bidentificado, hueco en el centro. Callo oblicuo de 0,8 mm de diámetro, rodeado de pelos hialinos, rígidos, de 0,5-1 mm de longitud. **Espiguillas** subadpresas al raquis. **Espiguilla sésil** hermafrodita, aristada. Callo tenuísimo, con escasas cilias rígidas laterales. **Gluma inferior** de 5-6 mm x 1 mm, lanceolada, nervio tenue sobre ambos márgenes (vista ventral), márgenes inflexos, distanciados entre sí prolongándose en un ápice bidentificado, bicarenada, dorso con carenas con asperezas antrorsas en el tercio apical, 2-nervada sobre cada carena, dorso plano sulcada. **Gluma superior** membranacea verdosa, de 5-5,5 mm de longitud, aquillada, navicular, quilla con asperezas antrorsas en el tercio superior, dorso convexo, glabra, ápice agudo, bordes de los márgenes hialinos ondulados. **Lemma inferior** hialina, lanceolada, aguda en el ápice, de 4 mm x 0,8 mm, márgenes inflexos, borde de los márgenes ondulados, hialinos tocándose en el tercio superior, dorso plano-sulcada, 3-nervada. **Lemma superior** hialina, de 3 mm de longitud, aristada, lobada, márgenes hialinos, ciliados, continuándose hacia el ápice bidentificado, libres, el nervio central se proyecta en una arista subapical, de 8-10 mm de longitud, base de 3 mm retorcida, bicolor (amarillenta y castaña), geniculada, súbula rectilínea y amarillenta. Pálea hialina, de 2 mm x 1 mm, margen superior fimbriado, ciliado, márgenes inflexos estrechos distanciados entre sí, enervia; lodículas (2), hialinas, de 1 mm x 0,5 mm, amarillentas. Ovario con 2 estigmas plumosos de 2 mm de longitud. Estambres (3) con anteras de 2,5 mm de longitud. **Espiguilla pedicelada** masculina: pedicelo coriáceo, filiforme, de 2,5-3 mm de longitud, levemente dilatado desde la porción media hacia el ápice (1 mm), estrechándose hacia el tercio inferior (0,8-0,9 mm), dorso levemente convexo, lado ventral plano, con una hilera de cilias hialinas de 1-2 mm de longitud en la región media de ambas márgenes, ápice cóncavo, hueco en el centro. Callo oblicuo (0,5 mm), con pelos hialinos rígidos, de 0,5-1 mm de longitud. **Gluma inferior** lanceolada, acuminada, aguda, de 6,5 mm x 1 mm, mucronada, márgenes inflexos estrechos tocándose en el ápice formando un mucrón de 1 mm, bicarenada, carenas y nervio central escabriúsculos desde la mitad hacia el ápice, dorso plano, 3 tenues

nervios verdes en cada carena, tonalidad vinácea entre los nervios, 3-nervia. **Gluma superior** membranácea, verdosa, aguda en el ápice, tenuemente aquillada, quilla con asperezas antrorsas en el tercio superior, bicarenada, de 5 mm x 1 mm, márgenes inflexos, bordes de los márgenes hialinos, escasas ciliadas, tocándose en el tercio superior. **Lemma inferior** hialina, lanceolada, de 4,5 mm x 0,5 mm, ápice agudo, márgenes inflexos separados y estrechos desde la base hacia región media, luego ciliados acercándose desde la mitad hacia el ápice, 1-nervia, dorso plano sulcado. **Lemma superior** hialina, levemente navicular, de 4 mm de longitud, ápice agudo, bicarenada, 1-nervada. Pálea hialina, de 1 mm x 0,8 mm, enervia, margen superior ovoide, pestañoso y base trunca, o con margen superior profundamente dividido; lodículas (2), membranáceas, de 0,5 mm de longitud, truncadas, amarillentas. Ovario con 2 estigmas plumosos. Estambres (3) con anteras de 2,5 mm de longitud.

Híbrido controlado:

Progenitores:	madre	padre	Híbrido	Herbario
	( <i>A. glaucophyllus</i>	<i>A. gerardii</i> N125	N331	CTES
	<i>x A. exaratus</i> ) N328			

**Obs. 1:** Un corte transversal del pseudopécíolo nos muestra forma de “U”, con la hendidura profunda, la cual se extiende en toda su longitud. El fondo de esa hendidura es de color blanco solo en la cara adaxial proyectándose al nervio central de la lámina, mientras que en la cara abaxial es verde glauco.

**Obs. 2:** Se observó diferente morfología en la palea:

- a- Margen superior ovoide, pestañoso con base trunca, de 1 mm x 0,8 mm, enervia,
- b- Margen superior profundamente dividida, pestañosa.

# RESULTADOS

## Híbridos interespecíficos entre especies de la sección *Notosolen*

### Citogenética Clásica

#### Análisis de las afinidades genómicas entre las especies de *Andropogon* mediante estudios meióticos

Con el propósito de analizar las afinidades genómicas entre las especies del género *Andropogon*, pertenecientes a la sección *Notosolen* que habitan el cono sur de Sudamérica, se realizaron estudios meióticos en híbridos interespecíficos F1, obtenidos por cruzamientos controlados. El Promedio y rango de configuraciones meióticas de los híbridos controlados (*Notosolen*), analizados para este trabajo, se resumen en la Tabla 11.

Todas las especies progenitoras de estos híbridos presentan  $2n=6x=60$  cromosomas. El análisis de la meiosis de los progenitores *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus*, se describe como regular, con formación de 30 bivalentes (II).

La viabilidad de los granos de polen, se analizó sobre la base del porcentaje de granos de polen teñidos con el método de Alexander. De cada individuo analizado se tomaron al azar 300-1000 granos de polen maduros, cosechados al momento de la antesis.

#### Comportamiento meiótico del híbrido F1 *A. barretoii* x *A. exaratus*

El recuento del número cromosómico del híbrido F<sub>1</sub> *A. barretoii* x *A. exaratus*, en metafase mitótica, reveló la presencia de  $2n= 60$  cromosomas más cromosomas accesorios (B) en número variable.

El análisis meiótico mostró que, en un total de 76 CMP analizadas en diacinesis-metafase I, la configuración meiótica frecuente fue de 30 II (bivalentes) (Figura 78 A; Tabla 11).

En Diacinesis, se observaron cromosomas apareados formando 30 II, individualizables, siendo notoria la presencia de 2 a 4 bivalentes asociados al nucleolo. En muy pocas de estas células se observó, la presencia de cromosomas accesorios (Bs), cuyo número varió de 1 a 4 (Figura 78 A y B), de tamaño muy pequeño. Se observó, que algunos de estos cromosomas no se asocian entre sí, comportándose como univalentes, en cambio otros, permanecían de a pares, muy cercanos uno del otro. En las especies

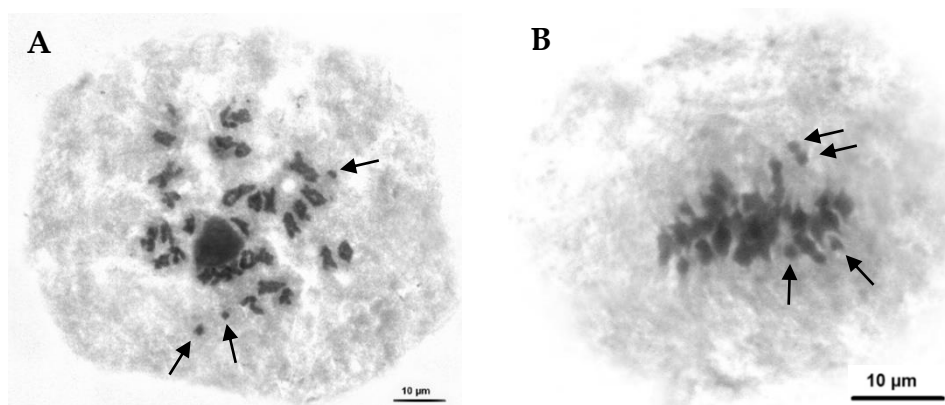


progenitoras de este híbrido, se observó la presencia de cromosomas accesorios, tanto en mitosis como en meiosis, y los mismos, se transmitieron a la descendencia al azar.

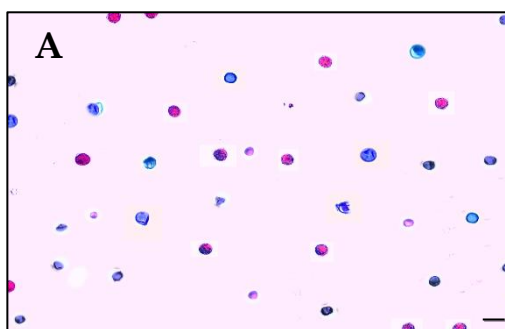
En las células analizadas en Metafase I, las asociaciones bivalentes, no pudieron observarse con claridad, ya que las mismas permanecían muy juntas, agrupadas una al lado de la otra dentro de la placa ecuatorial. Los cromosomas accesorios, se comportaron como univalentes, manteniéndose fuera del plano ecuatorial de la célula y muchos de ellos alejados del complemento cromosómico (Figura 78 B).

De cada individuo, se analizaron 300 espiguillas sésiles para detectar la producción de granos. En una de las plantas, se observó solamente 1 espiguilla con formación de grano (0,33%) y 1 espiguilla abortada (0,33%). En otra de las plantas se contabilizaron 8 espiguillas con formación de granos (2,66%), 5 espiguillas abortadas (1,66%) y 287 vacías (95,6%). En el cruzamiento recíproco *A. exaratus* x *A. barretoii*, la producción de granos fue algo mayor (5,6% - 6,33%) con un 3,3% de espiguillas abortadas.

El análisis de la viabilidad de los granos de polen fue del 3,79% (Figura 79), por lo cual se infiere indirectamente que es altamente estéril, ya que, a través de la tinción, mostró una viabilidad de los granos de polen menor al 10%. La producción de semillas es muy baja.



**Figura 78: Comportamiento meiótico el híbrido F<sub>1</sub> *A. barretoii* x *A. exaratus*. A. Diacinesis. Se observan 30 II y 3 cromosomas accesorios (flechas). Barra: 10 µm. B. Metafase I. Se observan 5 cromosomas fuera de la placa ecuatorial de la célula (flechas), comportándose como univalentes. Barra: 10 µm.**



**Figura 79: Granos de polen del híbrido F<sub>1</sub> *A. barretoii* x *A. exaratus* teñidos con colorante Alexander. A. Los granos coloreados (magenta) se consideran viables, los no coloreados (celestes) inviables. Barra 50 µm.**

**Comportamiento meiótico del híbrido F1 *A. barretoii* x *A. glaucophyllus***

El recuento del número cromosómico del híbrido F1 *A. barretoii* x *A. glaucophyllus* en metafase mitótica, reveló la presencia de  $2n = 60$  cromosomas más cromosomas accesorios en número variable.

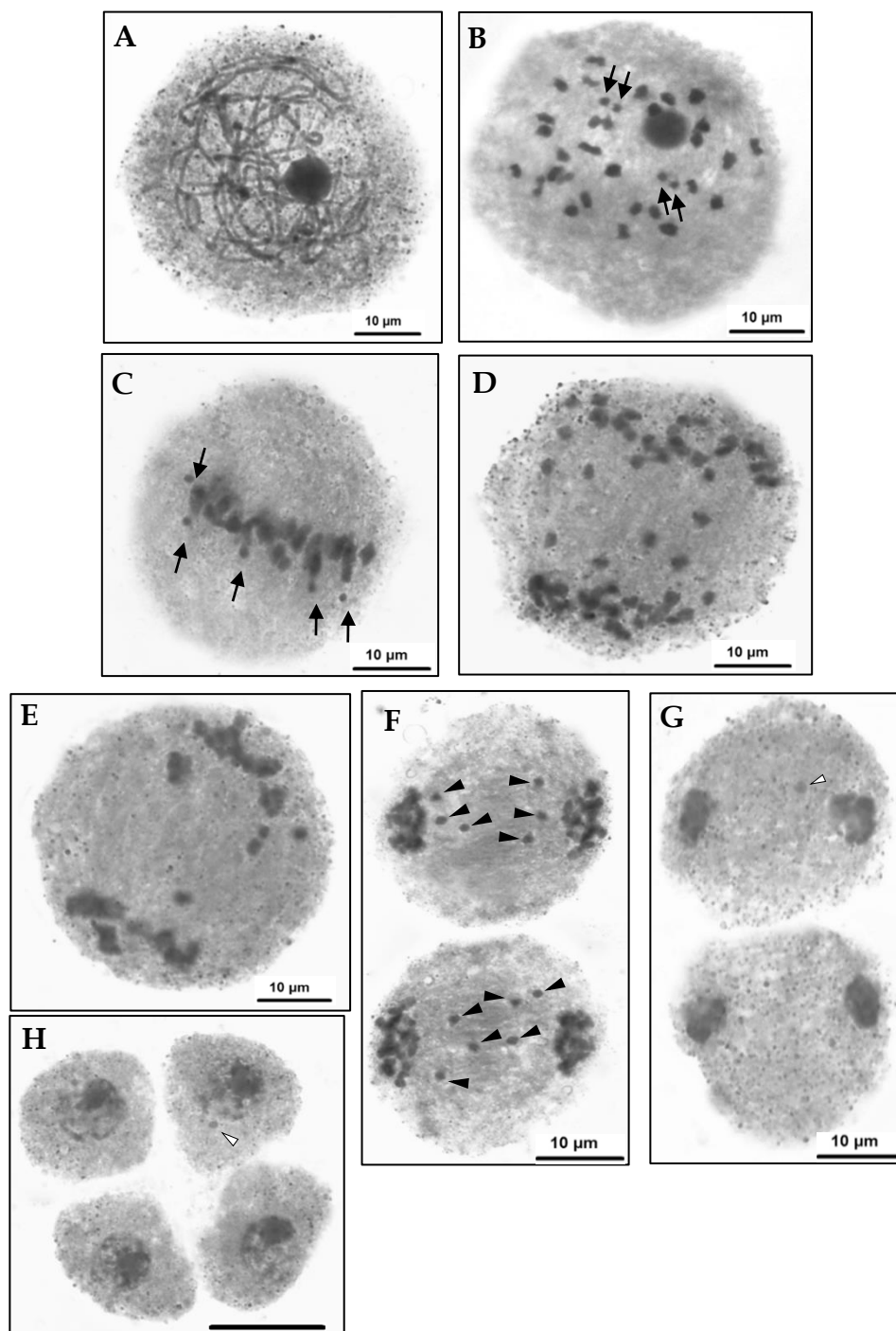
El análisis de la meiosis realizados en 80 células madres del polen mostraron que en 77 células la configuración meiótica más frecuente fue de 30 II, de las cuales 15 células, además, presentaban cromosomas accesorios. En 3 células se observó una configuración de 29 II + 1 I.

En Diacinesis (Figura 80 B), se observaron cromosomas apareados formando 30 bivalentes, individualizables, de los cuales, de 2 a 4 bivalentes se observaron asociados al nucléolo. En las células con 30 II, se observó la presencia de cromosomas accesorios (Bs). Estos cromosomas se diferenciaron del resto del complemento por su pequeño tamaño y por su comportamiento como univalentes, aunque, si bien no se observó apareamiento entre ellos, en algunas células se los observó de a pares muy cerca uno de otro. El número de estos cromosomas es muy variable, aunque con frecuencia se contaron de 2 a 4 y en muy pocas células se observaron hasta 5. En solo uno de los progenitores del híbrido, *A. barretoii*, se observaron cromosomas accesorios, tanto en mitosis como en meiosis, por lo que se estima que este progenitor ha transmitido estos cromosomas a la descendencia.

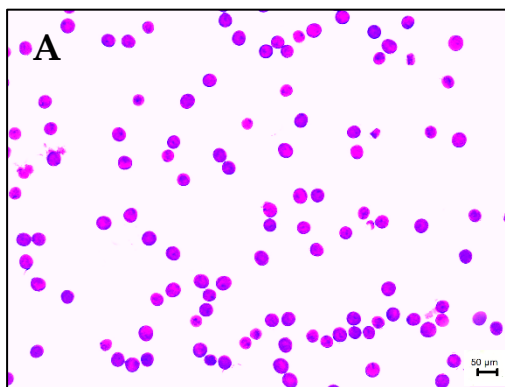
En las células analizadas en Metafase I, no se pudieron individualizar con claridad las asociaciones bivalentes, ya que las mismas permanecen muy juntas una al lado de la otra, en la placa ecuatorial de la célula. Se observaron cromosomas univalentes fuera de la placa ecuatorial y muchos de ellos alejados del complemento (Figura 80 C). En Anafase I (Figura 80 D y E) y Telofase II (Figura 80 F), se observaron cromosomas rezagados migrando a cada polo de la célula; también se observó la presencia de micronúcleos (1) en Telofase II y en una tétrade formada (Figura 80 G y H).

La producción de granos de polen de este híbrido fue nula (0%). En todas las plantas analizadas, no se encontró producción de granos al analizar las espiguillas sésiles. Para analizar la viabilidad de los granos de polen, se sometieron a tinción las anteras del interior de 300 espiguillas pediceladas y se observó un 16,5% de granos viables (coloreados). Al realizar la tinción con las anteras maduras que se encontraban fuera de la espiguilla la viabilidad aumentó (84%) (Figura 81).

Cabe destacar que, en general, los granos de polen de estos híbridos son de forma esferoidal, monoporados, con un opérculo cercano al polo distal, característicos de las Poaceae, con un diámetro variable (30 µm; 31,42 µm; 33,36 µm; 46,10 µm; 48,19 µm). En el híbrido *A. barretoii* x *A. glaucophyllus*, se observó en algunos recuentos, la presencia de granos de polen multiporados (con hasta 6-7-8 poros). Estos granos de polen colorearon completamente y siempre fueron de tamaño mayor comparados con los granos monoporados.



**Figura 80: Comportamiento meiótico del híbrido F1 *A. barretoii* x *A. glaucophyllus*.** **A. Leptotene.** **B. Diacinesis.** 30 II y 4 cromosomas accesorios (flechas) comportándose como univalentes. **C. Metafase I.** Se observan asociaciones bivalentes dentro de la placa ecuatorial de la célula y 5 cromosomas fuera de la placa ecuatorial (flechas). **D-E. Anafase I:** cromosomas bivalentes dirigiéndose a los polos de la célula. **F-G. Telofase II.** En **F**, se observan cromosomas rezagados (cabezas de flechas negras); en **G** se observa un micronúcleo (cabeza de flecha blanca). **H:** Tétrade de microsporas, con un micronúcleo en una de ellas (cabeza de flecha blanca). Barra: 10 µm.



**Figura 81: Granos de polen del híbrido  $F_1$  *A. barretoii* x *A. glaucophyllus* teñidos con colorante Alexander. A.** Los granos coloreados (magenta) se consideran viables, los no coloreados inviables. Barra 55 μm.

**Comportamiento meiótico del híbrido F1 *A. glaucophyllus* x *A. barretoii***

El recuento del número cromosómico del híbrido F1 *A. glaucophyllus* x *A. barretoii* en metafase mitótica, reveló la presencia de  $2n=60$  cromosomas más cromosomas accesorios en número variable.

Los estudios citogenéticos realizados en 71 CMP, mostraron que en 69 células la configuración meiótica más frecuente fue de 30 II, en alguna de las cuales se observó, además, la presencia de 1-2 cromosomas accesorios (Figura 82 B) y en 2 células se observó una configuración de 29 II + 2 I (Figura 82 C). Los univalentes solo se identificaron en el 4,22 % de las células, los cuales quizá se deba a una disyunción precoz de bivalentes. Al igual que en el híbrido anterior, se observaron cromosomas accesorios, que se diferenciaron del resto del complemento por su pequeño tamaño y se mantuvieron separados, bien individualizados, variando su número de 1 a 2.

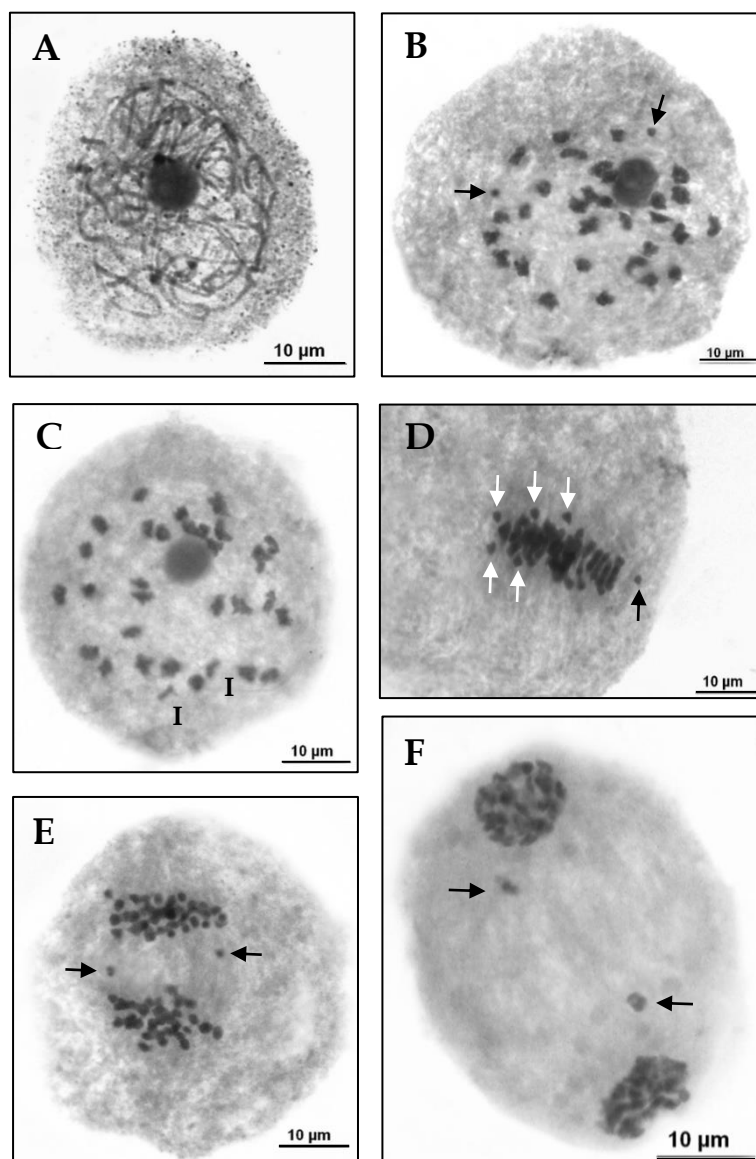
Uno de los progenitores de este híbrido, *A. barretoii*, contiene cromosomas accesorios (B) en células mitóticas y meióticas transmitiéndoselos a la descendencia.

En Diacinesis (Figura 82 B), se observaron cromosomas apareados formando 30 II, con presencia de 2-3 bivalentes asociados al nucleolo. En el 21% de las células, se observó la presencia de cromosomas Bs (Figura 82 B), de tamaño pequeño, sin aparearon entre ellos ni con el resto del complemento, comportándose como univalentes, permaneciendo distanciados entre sí. En la configuración 29 II + 2 I (Figura 82 C), los cromosomas univalentes se mostraron separados, de tamaño y morfología similar. Estos univalentes, quizá sean el producto de una disyunción precoz de un bivalente. No se observó la presencia de cromosomas Bs en estas células.

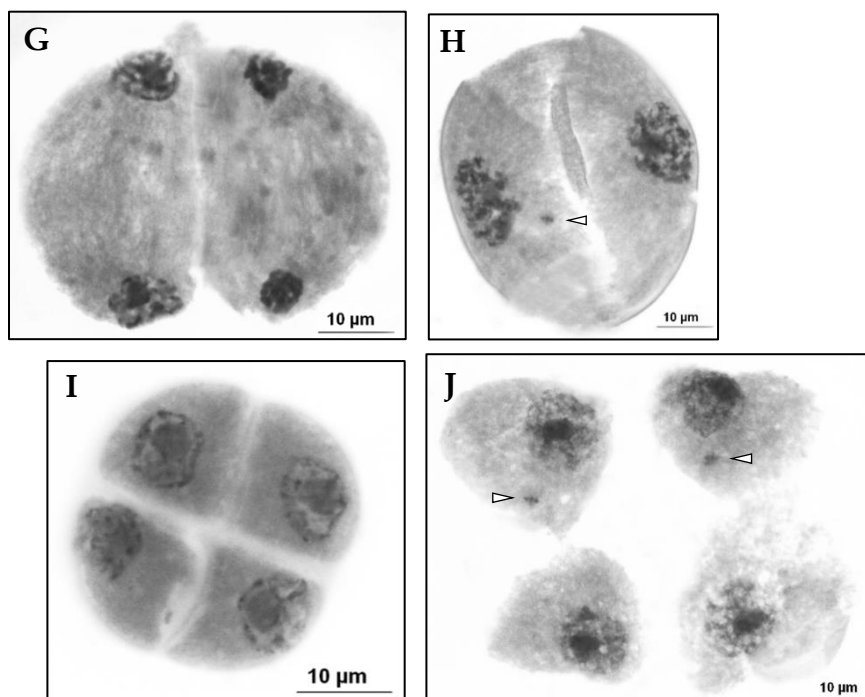
En las células analizadas en Metafase I, si bien no se pudieron individualizar con claridad a los bivalentes, ya que las asociaciones cromosómicas permanecían muy juntas, se observó una desinapsis precoz de 3 bivalentes alejándose de la placa ecuatorial de la célula y la presencia de 1 cromosoma accesorio fuera de dicha placa y alejado del complemento (Figura 82 D). En Anafase I y Telofase I, se observaron cromosomas rezagados migrando hacia ambos polos (Figura 82 E-F).

En algunas díadas y tétrade de microsporas, se observó la presencia de un micronúcleo por microspora (Figura 82 H-J).

La producción de granos de este híbrido, fue similar al cruzamiento anterior. Sin embargo, al analizar la viabilidad de los granos de polen sometidos a tinción se observó un 80% de granos coloreados. Los granos de polen son de forma esferoidal, monoporados, con un opérculo cercano al polo distal, característicos de las Poaceae, con tamaño variable. No se observaron granos de polen multiporados.







**Figura 82: Comportamiento del híbrido F1 *A. glaucophyllus* x *A. barretoii*. A. Leptotene. B. Diacinesis. 30 II y 2 cromosomas accesorios comportándose como univalentes (flechas). C. Diacinesis. 29 II y 2I (I: univalentes). D. Metafase I: desinapsis precoz de tres bivalentes (flechas blancas) y 1 cromosoma accesorio fuera del plano ecuatorial (flecha negra). E. Anafase I: cromosomas rezagados (flechas). F. Telofase I: cromosomas rezagados (flechas). G. Telofase II. H. Diada de microsporas: se observa un micronúcleo (cabeza de flecha blanca). I-J: Tétrade de microsporas. En J se observan las microsporas separadas y dos de ellas con un micronúcleo (cabeza de flecha blanca). Barra: 10 µm.**

**Comportamiento meiótico del híbrido F1 *A. exaratus* x *A. glaucophyllus***

El recuento del número cromosómico del híbrido F1 *A. exaratus* x *A. glaucophyllus* en metafase mitótica, reveló la presencia de  $2n=60$  cromosomas más cromosomas accesorios en número variable.

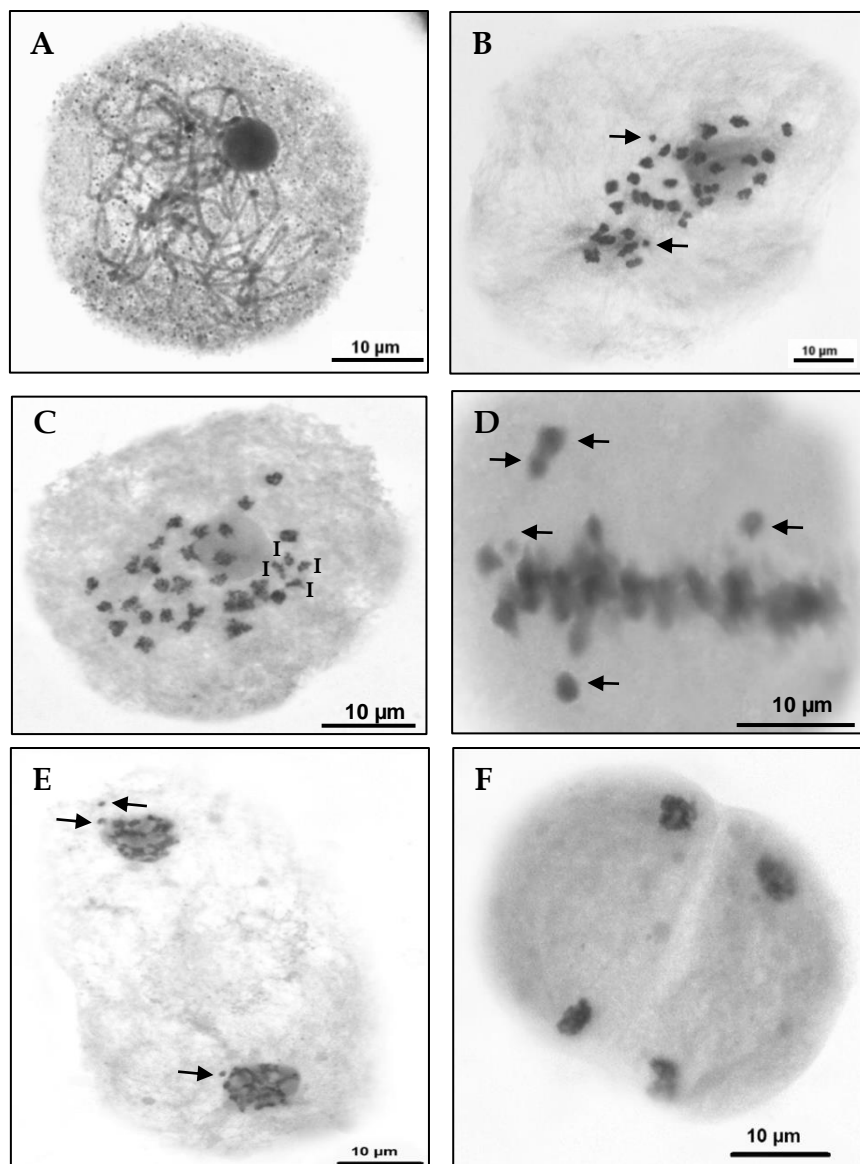
El análisis de 84 CMP del híbrido mostró en Diacinesis, que en la mayoría de las células (79), la configuración meiótica más frecuente fue de 30 II (Figura 83 B). En 11 de estas células, se observaron de 1 a 5 cromosomas accesorios (Bs) por célula los cuales mantenían un tamaño constante y más pequeños que el complemento. Como en los híbridos anteriores, estos cromosomas accesorios no se aparean con los cromosomas del complemento normal, permaneciendo distantes y comportándose como univalentes. En uno de los progenitores de este híbrido, *A. exaratus* se observaron cromosomas accesorios (Bs) en células mitóticas y meióticas.

En 4 células se observó una configuración de 29 II + 2 I y en una célula 28 II + 4 I (Figura 83 C). Estos univalentes se pudieron haber formado, quizá debido a la disyunción precoz de un par de bivalentes, ya que como se observa, de acuerdo con la morfología y al tamaño similar que ellos tienen, se los puede agrupar de a pares.

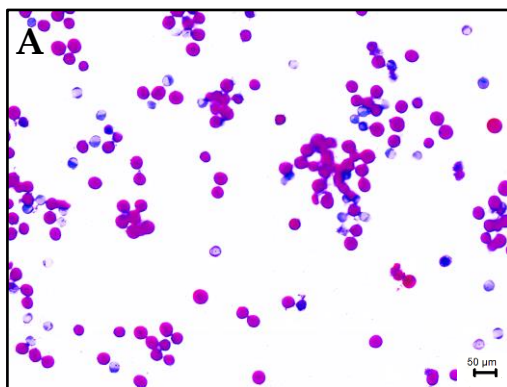
En las células analizadas en Metafase I, se observaron cromosomas fuera de la placa ecuatorial de la célula (Figura 83 D). Algunos de ellos univalentes y otros como consecuencia de una desinapsis precoz de cromosomas bivalentes.

No se observaron cromosomas rezagados en Anafase I, sin embargo, en pocas células, se visualizaron cromosomas rezagados en Telofase I (Figura 83 E). No se observaron cromosomas rezagados en Telofase II (Figura 83 F) ni la presencia de micronúcleos en las tétrade.

La producción de granos de este híbrido fue variable, de 5% a 43% de semillas llenas. Los descendientes de la  $F_2$  se cultivaron, y mantuvieron su vigor y fertilidad. Los granos de polen son de forma esferoidal, monoporados, con un opérculo cercano al polo distal, característicos de las *Poaceae*, de tamaño variable de 23,55  $\mu\text{m}$  a 43,52  $\mu\text{m}$ . El análisis de la viabilidad de los granos de polen dio como resultado 75% de granos coloreados (Figura 84 A).



**Figura 83: Células madres del polen (CMP) del híbrido F1 *A. exaratus* x *A. glaucophyllus*.** **A. Leptotene.** **B-C. Diacinesis.** En **B** se observan 30 II y 2 cromosomas accesorios (flechas negras). En **C** se observan 28 II + 4 I. **D. Metafase I:** Se observan 5I fuera de la placa ecuatorial. **E. Telofase I:** Se observan cromosomas rezagados (flechas negras). **F. Telofase II:** No se observan cromosomas rezagados ni micronúcleos. **I:** univalente. Barra: 10 µm.



**Figura 84: Granos de polen del híbrido  $F_1$  *A. exaratus* x *A. glaucophyllus* teñidos con colorante Alexander. A.** Granos de polen coloreados (viables) y no coloreados celestes transparentes (inviabiles). Barra 50  $\mu$ m.

**Comportamiento meiótico del híbrido F1 *A. glaucophyllus* x *A. exaratus***

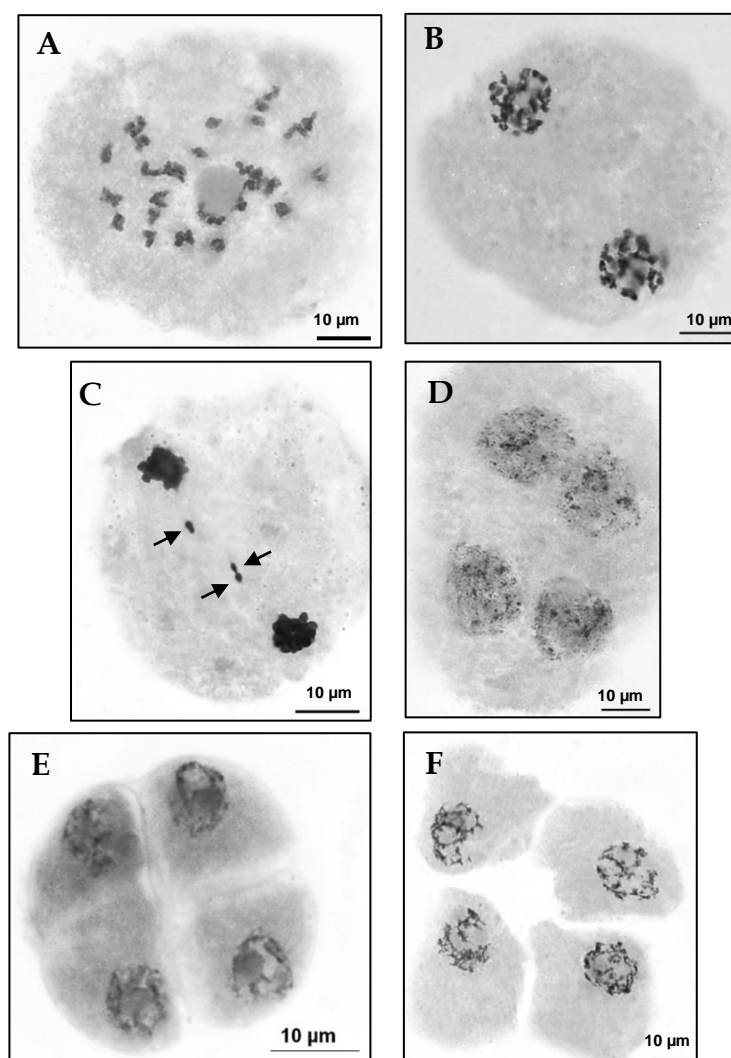
El recuento del número cromosómico del híbrido F1 *A. glaucophyllus* x *A. exaratus* en metafase mitótica, reveló la presencia de  $2n = 60$  cromosomas más cromosomas accesorios en número variable.

El análisis de la meiosis realizados en 76 CMP mostró en Diacinesis que, los cromosomas se aparearon completamente formando 30 II (Figura 85 A) y en muy pocas células se contaron 1-2 cromosomas accesorios (Bs), los cuales mantenían un tamaño pequeño y constante. Estos cromosomas no se aparearon con los cromosomas del complemento normal; los que se observaron, permanecían de a pares, cercanos uno de otro, aunque comportándose como univalentes. Se observaron cromosomas accesorios (Bs) en células mitóticas y meióticas de uno de los progenitores del híbrido (*A. exaratus*), y posiblemente se transmitieron a la descendencia a través de este parental. Se observaron 2-3 bivalentes asociados al nucléolo.

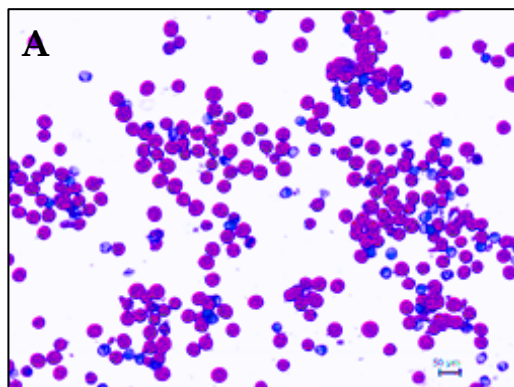
En Metafase I, los cromosomas bivalentes se agruparon en la placa ecuatorial de la célula y permanecieron dentro de ella; no se observaron cromosomas univalentes fuera de dicha placa. Las microfotografías de esta fase no fueron muy claras por lo cual no se presentan en este trabajo.

En Anafase I y en la mayoría de las células analizadas en Telofase I, no se observaron anomalías, aunque, en un par de células se visualizaron cromosomas rezagados en Telofase I (Figura C). En Telofase II, no se observaron cromosomas rezagados (Figura 85 D-E), ni la presencia de micronúcleos en las trétnadas analizadas (Figura 85 F).

Como en el híbrido anterior, la producción de granos de este híbrido fue variable, de 15% a 35% de semillas llenas. También se cultivaron las descendencias  $F_2$ , las cuales mantuvieron su vigor y fertilidad. Los granos de polen son de forma esferoidal, monoporados, con un opérculo cercano al polo distal, característicos de las Poaceae, con tamaño variable. El análisis de la viabilidad de los granos de polen dio como resultado un 75% - 83% de granos coloreados (Figura 86 A).



**Figura 85:** Células madres del polen (CMP) del híbrido F<sub>1</sub> *A. glaucophyllus* x *A. exaratus*. **A.** Diacinesis. 30 II. **B-C.** Telofase I: En **C** se observan cromosomas rezagados (flechas). **D.** Telofase II: No se visualizan cromosomas rezagados ni micronúcleos. **E-F.** Tétrade de microsporas. No se observan micronúcleos. Barra: 10 µm.



**Figura 86:** Granos de polen del híbrido F<sub>1</sub> *A. glaucophyllus* x *A. exaratus* teñidos con colorante Alexander. **A.** Granos de polen coloreados y no coloreados. Barra 50 µm.

Tabla 12: Promedio y rango de configuraciones meióticas de los híbridos controlados (*Notosolen*), analizados para este trabajo.

Cruzamientos	N° células estudiadas	Configuraciones meióticas rango y $\bar{x}$	
		I	II
<i>A. barretoii</i> x <i>A. exaratus</i>	76	0-4* (2,65)	30 (30)
<i>A. barretoii</i> x <i>A. glaucophyllus</i>	80	0-5* (0,16)	29-30 (29,96)
<i>A. glaucophyllus</i> x <i>A. barretoii</i>	71	0-2 (0,07)	29-30 (29,97)
<i>A. exaratus</i> x <i>A. glaucophyllus</i>	84	0-5* (0,31)	30 (30)
<i>A. glaucophyllus</i> x <i>A. exaratus</i>	76	0-2* (0,02)	30 (30)

\* cromosomas accesorios.

### Distribución de la composición de la heterocromatina mediante la técnica de Bando CMA<sub>3</sub> / DAPI.

En general, los patrones de distribución de la composición de la heterocromatina observados fueron homomórficos para las bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI en la mayoría de los pares de homólogos (Figura 87 A) de los híbridos analizados; además, en pocos casos se observaron dos tipos heteromórficos (Figura 87 B). Los patrones son consistentes entre las células de cada individuo, y para cada cruzamiento recíproco correspondiente.

El número y posición de bandas heterocromáticas CMA<sub>3</sub>/DAPI y el número de sitios de ADN ribosomal 5S en híbridos de *Andropogon*, se resumen en la Tabla 12.

Los cariotipos analizados, mostraron una alta variación en cuanto a la distribución de la composición de la heterocromatina, observándose un mayor número de bandas de posición terminal, en las regiones teloméricas de los brazos cromosómicos, las mismas se presentaron brillantes, de tamaño y forma constante ubicándose, preferentemente en los brazos cortos. En menor cantidad, se observaron bandas pericentroméricas, de tamaño uniforme y de intensa tinción.

Para simplificar la descripción y la comparación de los cariotipos se establecieron diferentes de patrones de composición de las regiones heterocromáticas, algunos de los cuales presentan alguna variante. Los siguientes patrones se comportan como homomórficos para las bandas:

**Tipo I:** heterocromatina pericentromérica CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (**IA**).

**Tipo II:** heterocromatina pericentromérica DAPI+/CMA<sub>3</sub>- y telomérica CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ en un brazo cromosómico (**IIA**).

**Tipo III:** heterocromatina telomérica CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ en un brazo cromosómico (**IIIA**). Heterocromatina telomérica CMA<sub>3</sub>+/DAPI- en un brazo cromosómico (**IIIB**). Heterocromatina telomérica DAPI+ / CMA<sub>3</sub>- en un brazo cromosómico (**IIIC**).

**Tipo IV:** heterocromatina pericentromérica DAPI+/CMA<sub>3</sub>- y telomérica CMA+/DAPI+ en ambos brazos (**IVB**). Heterocromatina pericentromérica DAPI+/CMA<sub>3</sub>- y telomérica CMA+/DAPI- en un brazo y CMA+/DAPI+ en el otro brazo (**IVD**).

**Tipo V:** brazo heterocromático CMA<sub>3</sub>+/DAPI+ (**VA**). Brazo heterocromático CMA<sub>3</sub>+/DAPI- (**VB**).

**Tipo VII:** cromosoma heterocromático CMA<sub>3</sub>+/DAPI+.

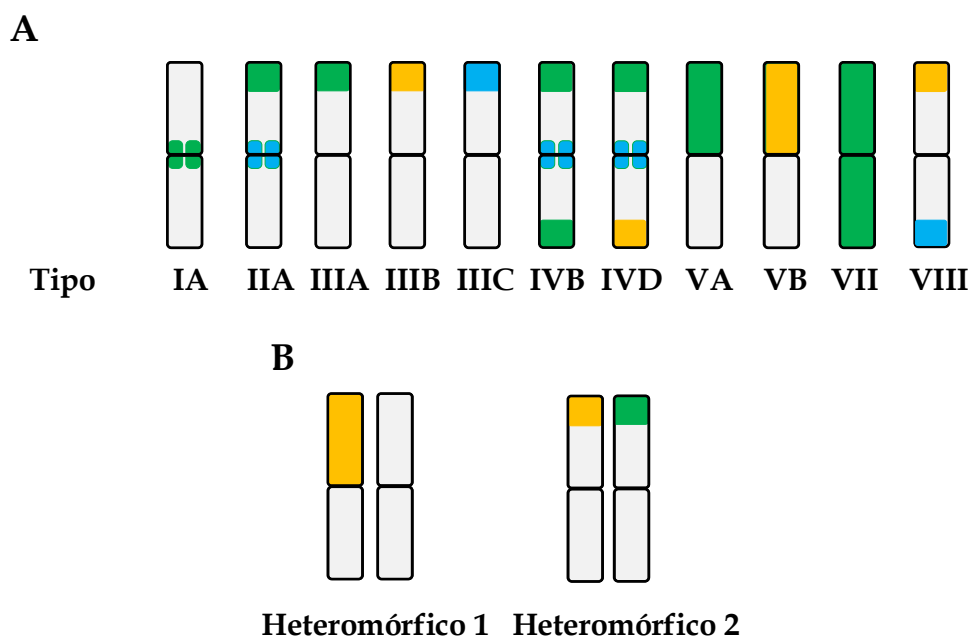


**Tipo VIII:** heterocromatina telomérica CMA<sub>3</sub>+ / DAPI- en brazo corto y telomérica DAPI+ / CMA<sub>3</sub>- en brazo largo.

También se observaron patrones heteromórficos para las bandas, los cuales se identificaron como heteromórfico1 (H<sub>1</sub>) y heteromórfico2 (H<sub>2</sub>).

**Tipo Heteromórfico<sub>1</sub>:** uno de los cromosomas homólogos no presenta bandas heterocromáticas y el otro cromosoma presenta el brazo corto heterocromático CMA<sub>3</sub>+ / DAPI-.

**Tipo Heteromórfico<sub>2</sub>:** uno de los cromosomas homólogos presenta heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI- localizada en la región telomérica del brazo corto y el otro cromosoma presenta heterocromatina CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ localizada en la región telomérica del brazo corto.



**Figura 87:** Patrones de composición de la heterocromatina en híbridos controlados de *Andropogon*, de acuerdo con la posición de las bandas CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+. **A:** Patrones homomórficos para las bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI. **B:** Patrones heteromórficos para las bandas CMA<sub>3</sub>. Referencias: DAPI+ / CMA<sub>3</sub>- (celeste); CMA<sub>3</sub>+ / DAPI- (anaranjado); CMA<sub>3</sub>+ / DAPI+ (verde).

**Tabla 13: Número y posición de bandas heterocromáticas DAPI/CMA<sub>3</sub>, número de sitios de ADN ribosomal 5S en híbridos de *Andropogon*. Abreviaturas: NB: número de bandas heterocromáticas. BH: brazos heterocromáticos; CH: cromosomas heterocromáticos; Ce: centromérica; Per: pericentromérica; Int: intersticial; Ter: terminal.**

Híbridos F1	2n	Heterocromatina CMA <sub>3</sub> /DAPI						N° de sitios ADNr 5S
		NB	NB	NB	NB	Br	Cr	
		Ce	Per	Int	Ter	Het	Het	
<i>A. barrettoi</i> x <i>A. exaratus</i>	60	0	0	0	0	1	0	1
<i>A. barrettoi</i> x <i>A. glaucophyllus</i>	60	7	0	0	26	6	0	1
<i>A. glaucophyllus</i> x <i>A. exaratus</i>	60	2	0	0	5	5	2	-

En el cariotipo del híbrido F<sub>1</sub> *A. barrettoi* x *A. glaucophyllus* (Figura 88 A y B), se identificó un patrón de composición de la heterocromatina heteromórfico para un par cromosómico. Uno de los cromosomas del par de homólogos, presentó un brazo heterocromático, con intensa señal heterocromática CMA<sub>3</sub>+, localizada en el brazo corto, con aspecto de bloque, mientras que en el otro cromosoma del par no se visualizó dicha banda. Esta señal también se manifestó en los núcleos interfásicos (Figura 88 C y D) observándose un cromocentro con señal intensa. En el resto de los cromosomas hubo ausencia de bandas.

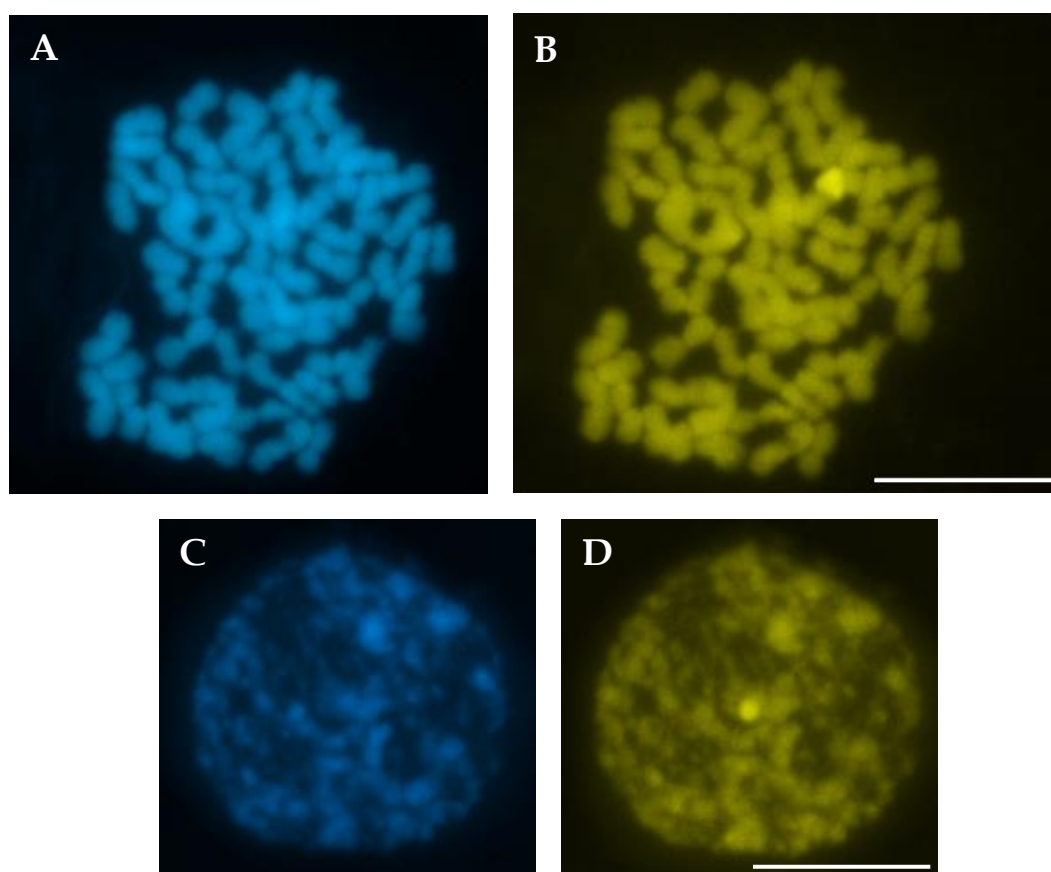


Figura 88: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI. Bandas heterocromáticas en cromosomas mitóticos y núcleo interfásico del híbrido F1 *A. barretoii* x *A. glaucophyllus* A-C: Tinción DAPI. B-D: Tinción CMA<sub>3</sub>. Barra: 10 μm.

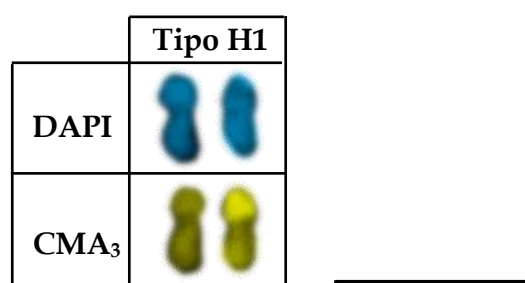


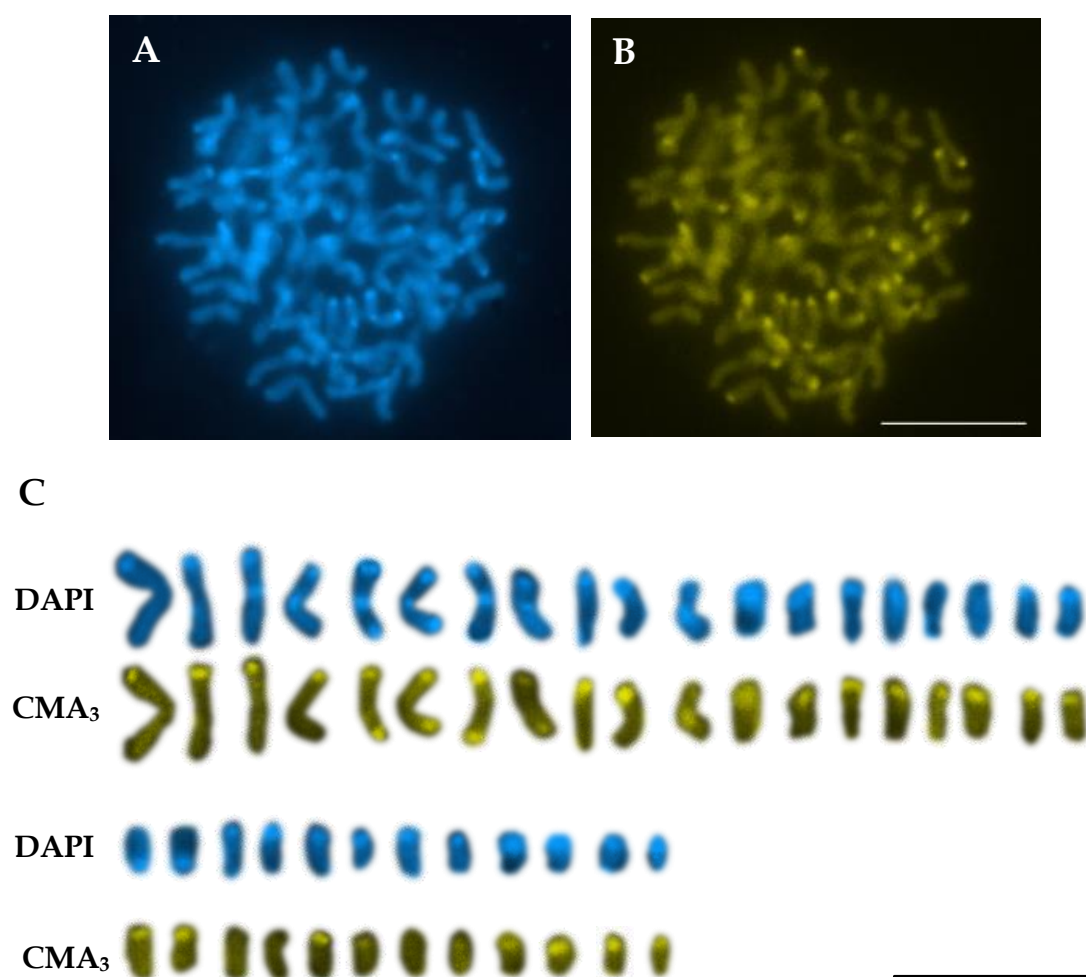
Figura 89: Cromosomas del híbrido F1 *A. barretoii* x *A. glaucophyllus* mostrando el patrón de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo Heteromórfico<sub>1</sub>. Barra 10 μm.

En el cariotipo del híbrido  $F_1$  *A. barretoii* x *A. exaratus* (Figura 90 A y B), se observó la presencia de bandas heterocromáticas en la mitad de los cromosomas del complemento.

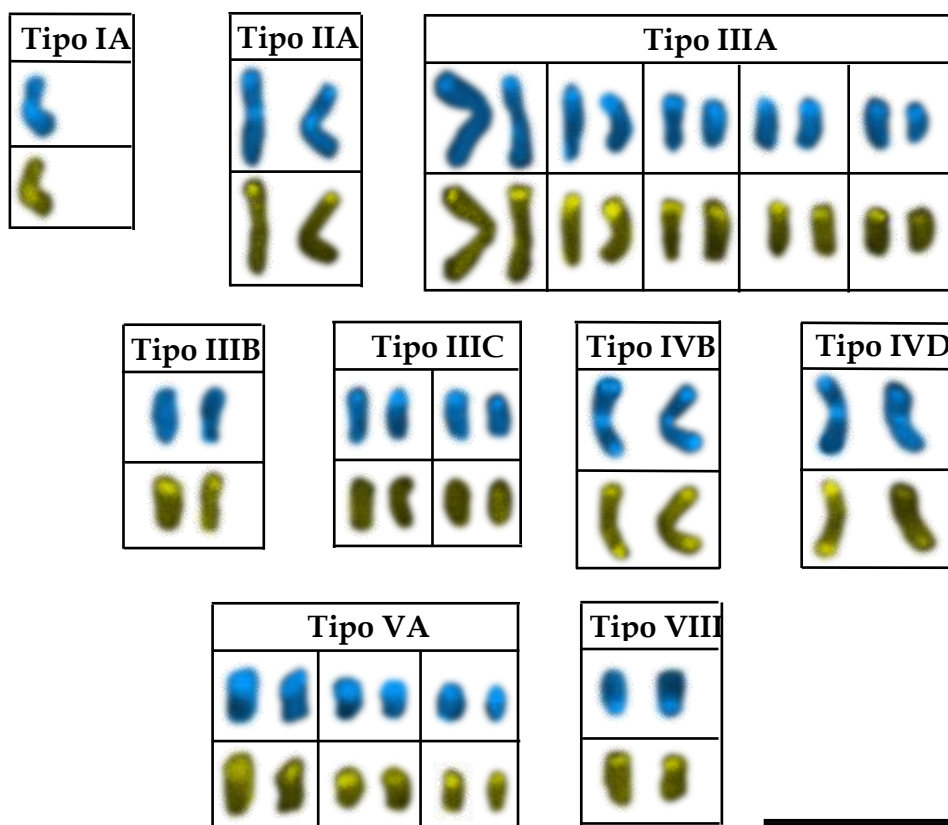
En cuatro pares de cromosomas, se observaron bandas de heterocromatina pericentromérica DAPI+. Estas bandas, de tamaño constante, se observaron junto a bandas terminales en tres pares de cromosomas, presentando los patrones Tipo IIA, IVB y IVD. En un cromosoma se observó el patrón del Tipo IA, no pudiéndose individualizar su cromosoma homólogo.

En la mayoría de los cromosomas, se identificaron bandas heterocromáticas en posición terminal, en un brazo o en ambos brazos (patrón Tipo IIIA, IIIB, IIIC y VIII) (Figura 90 C y Figura 91). El tamaño de estas bandas es constante en todos los cromosomas.

También se observaron tres pares de cromosomas con brazo corto heterocromático Tipo VA (Figura 90 C y Figura 91).



**Figura 90: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI. Bandas heterocromáticas en cromosomas mitóticos del híbrido F1 *A. barreto* x *A. exaratus*. A: Tinción DAPI. B: Tinción CMA<sub>3</sub>. C: Cariograma de bandas CMA<sub>3</sub>/DAPI. Los cromosomas se ordenaron por tamaño de mayor a menor y solo se representaron aquellos que presentan bandas heterocromáticas. Barra: 10 μm.**



**Figura 91: Cromosomas del híbrido F1 *A. barretoii* x *A. exaratus* mostrando los diferentes patrones de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, IIA, IIIA, IIIB, IIIC, IVB, IVD, VA, VIII. Barra 10 µm.**

En el cariotipo del híbrido F<sub>1</sub> *A. glaucophyllus* x *A. exaratus* (Figura 92 A y B), se observó la presencia de bandas heterocromáticas en muy pocos cromosomas del complemento y en su mayoría constituyendo brazos heterocromáticos.

Solo en un par de cromosomas se observó la presencia de bandas de heterocromatina pericentromérica, correspondiéndose al patrón IA; dos pares de cromosomas registraron el patrón VA con bandas con aspecto de bloque; un par el patrón VB y un par el patrón VII (Figura 93). En la Figura 92 C y D, se observan los núcleos interfásicos mostrando los cromocentros CMA<sub>3</sub>+

Cabe destacar que, en este híbrido, también se observaron dos tipos de patrones de bandas heteromórficos (Figura 93). El patrón Heteromórfico<sub>1</sub> (H<sub>1</sub>), se observó en un par de cromosomas. Con tinción DAPI, ninguno de los cromosomas mostró señales de bandas, solo en uno de ellos se observó una interrupción (zona oscura) en uno de los brazos (Figura 92 A). Sin embargo, al observar a este cromosoma con tinción CMA<sub>3</sub>, manifestó una intensa coloración CMA<sub>3</sub>+ en todo ese brazo (Figura 92 B y Figura 93). El otro cromosoma del par de homólogos no mostró señal CMA<sub>3</sub>. El patrón tipo Heteromórfico<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>), se observó en un par de cromosomas con heterocromatina terminal, en el cual uno de los homólogos presentó fluorescencia DAPI+ en uno de los brazos (Figura 93).

Cabe aclarar que, en algunas células de los híbridos analizados, se observaron cromosomas accesorios (Bs). Estos cromosomas mostraron señales fluorescentes DAPI+ y CMA<sub>3</sub>+. Dado el tamaño pequeño de estos cromosomas, las señales pueden apreciarse como brazos heterocromáticos, con un patrón del Tipo IX.

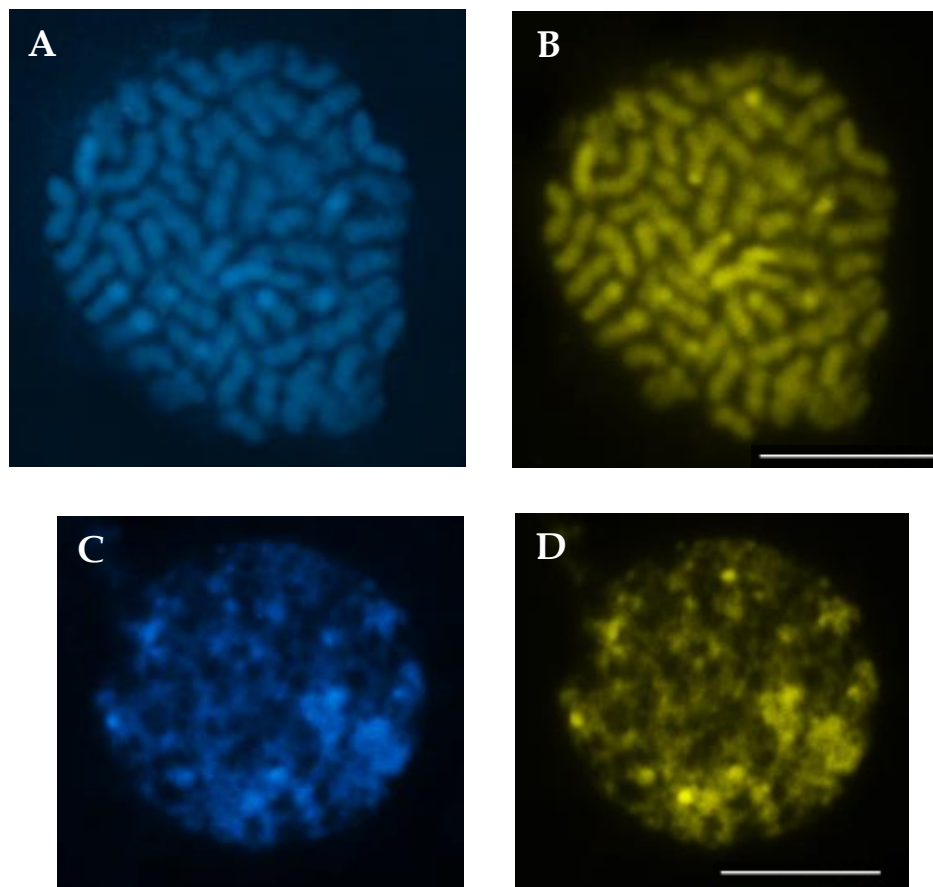


Figura 92: Distribución de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI. Bandas heterocromáticas en cromosomas mitóticos y núcleos interfásicos del híbrido F1 *A. glaucophyllus* x *A. exaratus*. A-C: Tinción DAPI. B-D: Tinción CMA<sub>3</sub>. Barra: 10 μm.

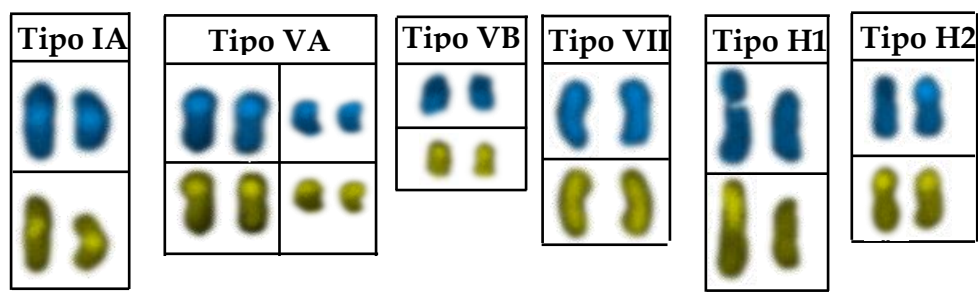


Figura 93: Cromosomas del híbrido F1 *A. glaucophyllus* x *A. exaratus* mostrando los diferentes patrones de composición de la heterocromatina CMA<sub>3</sub> / DAPI, de acuerdo con la posición de las bandas: Tipo IA, VA, VB, VII, Heteromórfico<sub>1</sub> y Heteromórfico<sub>2</sub>. Barra 10 μm.

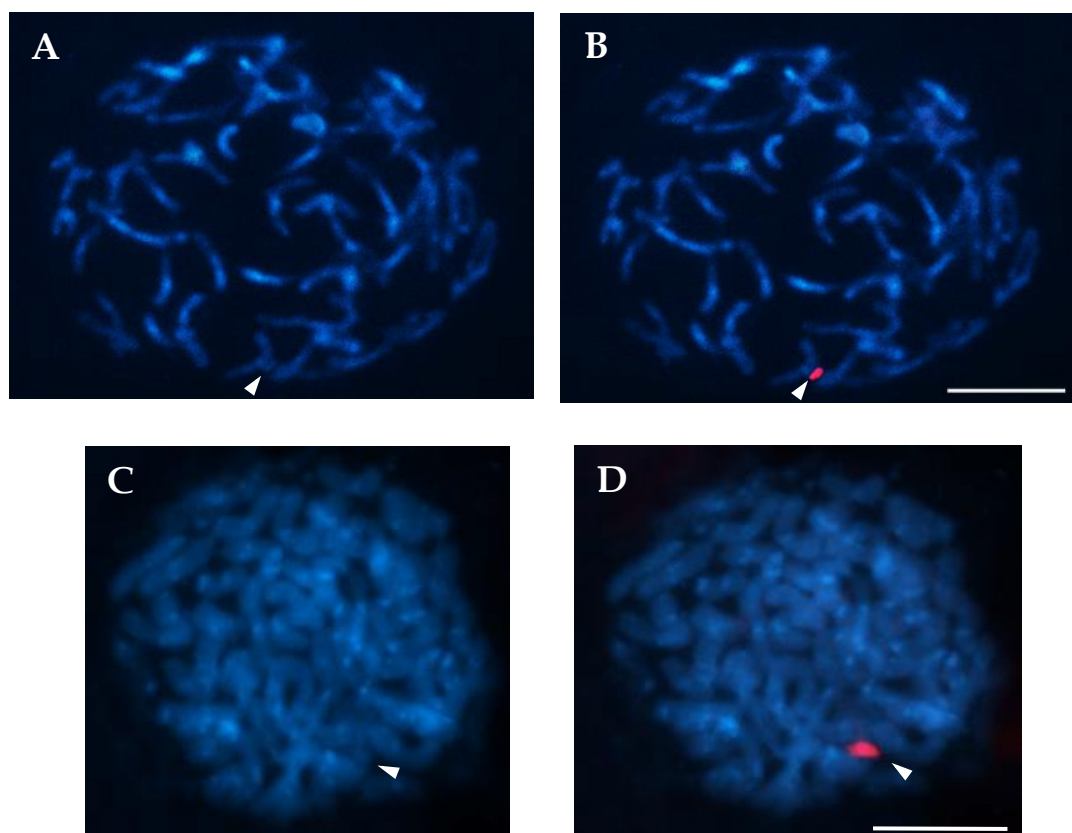


## Citogenética Molecular

### Mapeo cromosómico de los genes del ADNr 5S por FISH

Con el fin de mapear y detectar las zonas de ADN ribosomal en experimentos de Hibridación *In Situ* Fluorescente, se utilizó como sonda la secuencia de ADN ribosomal 5S de *Triticum aestivum*, sobre cromosomas mitóticos de los híbridos interespecíficos  $F_1$  *A. barretoi* x *A. exaratus* y *A. barretoi* x *A. glaucophyllus*.

En cada uno de estos híbridos, el patrón de distribución de los *loci* de ADNr 5S (Figura 94), fue muy semejante. En ambos casos se detectó un *loci* de alta intensidad fluorescente, de 0,72  $\mu$ m de tamaño en *A. barretoi* x *A. exaratus* (Figura 94 A y B) y de 1  $\mu$ m de tamaño en *A. barretoi* x *A. glaucophyllus* (Figura 94 C y D). Los mismo, fueron mapeados en posición intersticial o distal.



**Figura 94: Hibridación In Situ Fluorescente con sonda de ADNr 5S en híbridos de *Andropogon*. Cromosomas mitóticos de A: *A. barretoi* x *A. exaratus*. B: misma célula con FISH. C: *A. barretoi* x *A. glaucophyllus*. D: misma célula con FISH. Las células fueron hibridadas con la secuencia ADNr 5 S de *Triticum aestivum* marcada con biotina y revelada con antibiotina (Cy3). La flecha señala la zona de hibridación. Contratinción con DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.**



## Conclusiones

### Sobre estudios de citogenética clásica

- Se propone por primera vez la fórmula cariotípica de  $18 m + 2 sm$  para *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans*.

- *Andropogon selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans* constituyen un grupo homomórfico según sus características de cariotipo, patrón de bandas heterocromáticas, número de *loci* de secuencias de ADNr validando así la monofilia del grupo, la cual fuera propuesta por Nagahama (2012) a partir de análisis filogenéticos, basándose en caracteres moleculares y morfológicos.

- *Andropogon selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans* comparten el genoma "S", validando la hipótesis de Norrmann et al. (2004) mediante experiencias de GISH.

- Se propone por primera vez la fórmula cariotípica de  $40 m + Bs$  para *A. gayanus*;  $52 m + 6 sm + 2 t + Bs$  para *A. barretoi*;  $56 m + 4 sm + Bs$  para *A. exaratus* y  $54 m + 6 t$  para *A. glaucophyllus*.

- En las especies analizadas la meiosis fue regular: *A. gayanus*, con  $2n = 40$ , se observó la formación de 20 II; en *A. barretoi* y *A. exaratus* con  $2n = 60$ , se observó la formación de 30 II + (2-6) Bs y *A. glaucophyllus*, con  $2n = 60$ , presentó la formación de 30 II. En todas las especies analizada se observó un alto porcentaje de granos de polen viables (> 80-90%).

- Las especies que pertenecen a la sección *Notosolen* Stapf. que habitan el cono sur de Sudamérica: *A. barretoi*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* tiene una distribución geográfica relativamente limitada, no habiéndose detectado áreas simpátricas y no habiendo registros de híbrido naturales entre ellas hasta el momento. Al someter a algunas de estas especies a cruzamientos controlados se obtuvieron híbridos con cierto grado de fertilidad: las combinaciones fueron *A. barretoi* x *A. exaratus* y el cruzamiento recíproco; *A. barretoi* x *A. glaucophyllus* y el cruzamiento recíproco; *A. glaucophyllus* x *A. exaratus*. Estos resultados y la ausencia de barreras reproductivas entre estas especies, estaría sustentando la hipótesis de que las mismas estarían genómicamente relacionadas.

- Se analizó por primera vez la distribución y composición de la heterocromatina en: *A. selloanus*, *A. macrothrix*, *A. gyrans*, *A. gayanus*, *A. barretoj*, *A. glaucophyllus*, *A. exaratus* y *A. gerardii*, revelando la presencia de bandas en todos los cromosomas de las especies diploide y en la mayoría de los cromosomas de las especies hexaploides. En general, los patrones de bandas detectados se presentan en forma homomórfica. Dentro del grupo diploide, se observaron patrones de bandas característico para cada una de las especies permitiendo su identificación, compartiendo entre ellas uno de los patrones. El tetraploide *A. gayanus* presentó tres patrones de bandas diferentes y en las especies hexaploides se repitieron los mismos patrones de bandas. Los patrones de distribución de la heterocromatina observados en las entidades diploides coinciden con los que se describieron para las especies poliploides del género, lo que podría estar indicando, que estos diploides podrían estar involucrados en el origen de estos poliploides. La similitud en los patrones de bandas podría deberse a la existencia de un origen común ancestral entre las distintas especies, y la diferencia en cuanto al número y posición de las bandas en cada cromosoma podría deberse a una consecuencia de las divergencias que hubo entre ellas.

- El análisis de la composición de la heterocromatina, reveló patrones de bandas en forma homomórficas para todas las especies analizadas. *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans*, mostraron mayor número de regiones heterocromaticas ricas en AT y GC y la presencia de brazos heterocromáticos (AT-GC) sugiriendo la existencia del mismo tipo de composición de la heterocromatina a lo largo de todo el brazo cromosómico.

- En *A. gayanus*, *A. barretoj*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*, se detectaron diferentes patrones de composición de la heterocromatina, siendo la mayoría regiones heterocromáticas rica en AT y GC. La mayor variación de composición de la heterocromatina, se observó en *A. barretoj*; en cambio *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*, presentaron, cada una, solo un patrón de composición de la heterocromatina. Los patrones de composición de la heterocromatina observados en las entidades diploides o alguna variante de éstos, se repiten en las especies poliploides analizadas.

- De acuerdo a los resultados obtenidos, se presentan en esta tesis, evidencias citológicas por lo que se propone mantener a *A. barretoj* y *A. glaucophyllus* como

entidades independientes ya que poseen diferencias en parámetros citogenéticos como el cariotipo y la distribución de la composición de la heterocromatina.

Considerando los resultados más destacables del análisis del tamaño del genoma, se podría mencionar que:

- El contenido de ADN (2C) en *A. selloanus*, *A. macrothrix*, *A. gyrans*, *A. gayanus*, *A. barretoii*, *A. exaratus* y *A. glaucophyllus* es explorado por primera vez en esta tesis, detectándose diferencias significativas entre las especies diploides, entre diploides y la especie tetraploide, y entre ésta con las hexaploides. Sin embargo, no se detectó diferencias significativas entre las especies hexaploides entre sí.

- Se observó una tendencia general al aumento del contenido de ADN (2C) y de la disminución del contenido de ADN por genoma básico (C) a medida que aumentó el nivel de ploidía.

- Las especies poliploides analizadas, poseen un valor C más bajo que las entidades diploides analizadas, sugiriendo que, en la evolución de estos poliploides, se produjo algún mecanismo de pérdidas de secuencias repetidas de ADN.

- Se detectó una alta correlación positiva directa entre el incremento del tamaño del genoma (2C) y la longitud total del cariotipo (LTC) y entre el contenido de ADN por genoma básico (C) y la longitud media del cariotipo (LMC).

### **Sobre estudios de citogenética molecular**

Como resultado del empleo de técnicas de citogenética molecular en las especies analizadas del género, se puede concluir que:

- El empleo de la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) permitió por primera vez, el mapeo físico de las regiones de ADN ribosomal en las especies diploides, poliploides e híbridos analizados. En las especies diploides, el análisis reveló la presencia de un par de *loci* de ADNr 45S localizados en los extremos distales de los brazos cortos de dos cromosomas metacéntricos mostrando una alta homomorfía en el patrón FISH de cromosomas homólogos. En *A. gayanus*, se observaron cuatro señales de hibridación.

- En las especies hexaploides *A. barretoii*, *A. exaratus*, *A. glaucophyllus* y *A. gerardii*, se detectaron dos *loci* de ADNr 45S, este resultado podría estar indicando que,

mediante un mecanismo epigenético de metilación, se silenciaron los organizadores nucleolares de una de las especies involucradas en la formación del híbrido.

La técnica de Hibridación *in situ* Genómica (GISH), permitió comparar la homología entre genomas de diferentes niveles de ploidía y secciones:

- Según los resultados obtenidos, se sugiere que las especies diploides *A. selloanus*, *A. macrothrix* y *A. gyrans* podrían constituir un grupo homomórfico que comparten un genoma ancestral.

- Se propone para *A. gyrans*, la fórmula genómica SgSg, teniendo en cuenta que, de acuerdo con los patrones de hibridación observados, existiría cierto grado de divergencia genómica con *A. selloanus*, quizá producto de reestructuraciones cromosómicas.

- Los resultados de las experiencias de GISH, estarían indicando que, en la formación del triploide sudamericano *A. ternatus*, ha participado alguna variante del genoma "S", presente en los diploides aquí analizados. Estos resultados validarían los estudios citogenéticos previamente realizados por Norrmann (1985) y Norrmann y Quarin (1987).

- Las hibridaciones realizadas, indicarían que las especies poliploides aquí analizadas, pertenecientes a la sección *Notosolen* tienen un origen aloploiploide.

- Alguna forma del genoma "S" estaría involucrado en la formación del tetraploide norteamericano *A. ternarius* (sección *Leptopogon*) y del hexaploide *A. gerardii* (sección *Andropogon*).

- Los resultados obtenidos al analizar la hipótesis de Stebbins (1975) mediante GISH, sugieren que *A. gerardii*, podría haberse formado a partir de eventos ancestrales de poliploidización de una especie diploide norteamericana que habría originado al tetraploide *A. ternarius*. Los resultados de este trabajo, darían sostén a la primera premisa de dicha hipótesis.

- Los resultados mostraron la presencia de un genoma relacionado con el genoma "S", por lo que, hasta que se lleven a cabo experiencias de GISH adicionales para proporcionar más información sobre otros posibles genomas involucrados en la formación de los hexaploides, se proponen las siguientes fórmulas genómicas a cada una de esas entidades:

-Para *A. barretoii* ( $S_{barr}S_{barr}X_1X_1X_2X_2$ ) con un genoma relacionado a *A. selloanus* (SS), y otros genomas aún desconocidos ( $X_1 X_1$ ) y ( $X_2X_2$ ).

- Para *A. exaratus* ( $S_{ex}S_{ex}X_3X_3X_4X_4$ ) con un genoma relacionado a *A. selloanus* (SS), y otros genomas aún desconocidos ( $X_3 X_3$ ) y ( $X_4 X_4$ ).

- Para *A. glaucophyllus* ( $S_{glau}S_{glau}X_5X_5X_6X_6$ ) con un genoma relacionado a *A. selloanus* (SS), y otros genomas aún desconocidos ( $X_5X_5$ ) y ( $X_6X_6$ ).

# **Bibliografía**

## A

- Ali, H. B. M., Fransz, P., & Schubert, I. 2000. Localization of 5S RNA genes on tobacco chromosomes. *Chromosome Research*, 8 (1), 85-87.
- Ambros, P. F., Matzke, M.A., & A. J. M. Matzke. 1986a. Detection of a 17 kb unique sequence (T DNA) in plant chromosomes by *in situ hybridization*. *EMBO J.* 5:2073-2077.
- Anton, A. M., & A. E., Cocucci. 1984. The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Plant systematics and Evolution*, 146(1-2), 117-121.
- Anton, A. 1987. Grass gametophytes: their origin, structure and relation with the sporophyte. Soderstrom TR, and others ed (s). *Grass Systematics and Evolution: an International Symposium held at the Smithsonian Institution, Washington, DC, 27-31 July 1986*. Washington, DC London, Smithsonian Institution Press.
- Arber, A. 1934. *The Gramineae: a study of cereal, bamboo and grass*. Cambridge University Press. 480 pp.
- Axelrodd, I. 1981. Rise of the grassland biome, central North America. *Bot. Rev.* 51: 163-201.

## B

- Barber, H. N. 1955. Adaptive gene substitutions in *Tasmanian eucalypts*: I. Genes controlling the development of glaucousness. *Evolution*, 9(1), 1-14.
- Barkworth, M. E. 2003. *Andropogoneae Dumort. Magnoliophyta: Commelinidae (in Part): Poaceae, Part, 2*, 602-606.
- Barnes, P. W. 1985. Adaptation to water stress in the big bluestem-sand bluestem complex. *Ecology* 66:1908-1920.
- Barnes, P. W. 1986. Variation in the big bluestem (*Andropogon gerardii*)-sand bluestem (*Andropogon halii*) complex along a local dune/meadow gradient in the Nebraska Sandhills. *Am. J. Bot.* 73:172-184.
- Barthlott, W. 198). Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany*, 1(3), 345-355.
- Bejarano, E. R., Khashoggi, A., Witty, M., & Lichtenstein, C. 1996. Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), 759-764.

- 
- Benabdelmouna, A., Y Shi, M., Abirached-Darmency & H. Darmency. 2001. Genomic *in situ* hybridization (GISH) discriminates between the A and the B genomes in diploid and tetraploid *Setaria* species. *Genome*, 44(4): 685-690.
  - Benavente, E., Fernández-Calvín, B., & Orellana, J. 1996. Relationship between the levels of wheat-rye metaphase I chromosomal pairing and recombination revealed by GISH. *Chromosoma*, 105(2), 92-96.
  - Benavente, E., Orellana, J., & Fernandez-Calvin, B. 1998. Comparative analysis of the meiotic effects of wheat ph1b and ph2b mutations in wheat× rye hybrids. *Theoretical and applied genetics*, 96(8), 1200-1204.
  - Bennett, M. D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New phytologist*, 106, 177-200.
  - Bennett, M.D. 1995. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: P.E. Brandham & M. D. Bennett (editors). Kew Chromosome Conference IV. Kew: *Royal Botanic Gardens*. 167-183.
  - Bennett S.T. and Bennett M.D. 1992. Spatial distribution of ancestral genomes in the wild grass *Milium montianum*. *Par1. Ann. Bot.* 70:111-118.
  - Bennett M.D. and Leitch I.J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* 76: 113-176.
  - Bennett M. D., A. V. Cox & I. J. Leitch. 1997. Angiosperm DNA C-values Database (release 1.0, April 1997).
  - Bennett, M. D., Hanson, L., & Leitch, I. J. 1998, January. Chromosome evolution in polyploid plants. In *Cytogenetics and Cell Genetics* (Vol. 81, No. 2, pp. 124-124). ALLSCHWILERSTRASSE 10, CH-4009 BASEL, SWITZERLAND: KARGER.
  - Bennett, M. D., Leitch, I. J., & Hanson, L. 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany*, 82, 121-134.
  - Bennett, M. D., Bhandol, P., & Leitch, I. J. 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates. *Annals of botany*, 86(4), 859-909.
  - Bennett, M. D., & Leitch, I. J. 2003. Angiosperm DNA C-values database (release 4.0, January 2003).



- Bennett, M. D., & Leitch, I. J. 2005. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany*, 95(1), 45-90.
- Bennetzen, J. L., San Miguel, P., Chen, M., Tikhonov, A., Francki, M., & Avramova, Z. 1998. Grass genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 1975-1978.
- Bennetzen, J. L., Ma, J., & Devos, K. M. 2005. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of botany*, 95(1), 127-132.
- Bocquet, G., & J. D., Bersier. 1960. The systemic value of the ovule: Teratological developments. *Arch. Sci.*, 13, 475-496.
- Bowden B. N. 1963b. The Root Distribution of *Andropogon Gayanus* Var. *Bisquamulatus*, East African Agricultural and Forestry Journal, 29:2, 157-159.
- Bowden, B. N. 1964. Studies on *Andropogon gayanus* Kunth: III. An outline of its biology. *The Journal of Ecology*, 255-271.
- Bowden, B. N. 1971. Studies on *Andropogon gayanus* Kunth: VI. The leaf nectaries of *Andropogon gayanus* var. *bisquamulatus* (Hochst.) Hack. (Gramineae). *Botanical journal of the Linnean Society*, 64(1), 77-80..
- Brammer, S. P., Zanotto, M., & Caverzan, A. 2007. Citogenética vegetal: da era clássica à molecular. *Embrapa Trigo. Documentos Online*.
- Brasileiro-Vidal A.C. and Guerra M. 2002. Citogenética Molecular em Cereais. In: Atualização em Técnicas Celulares e Moleculares Aplicadas ao Melhoramento Genético Vegetal (Brammer SP and Iorzeski EJ, Org.). Embrapa Trigo, Passo Fundo, 277-298.
- Bridges, E. L., & S. L., Orzell. 1982. Revision of the *Andropogon ternarius* complex of sect. *Leptopogon* (Poaceae) with two new species from peninsular Florida. *Genus*, 1983, 1986-2003.

## C

- Cámara Hernández. J. & S., Gambino. 1990. Ontogeny and morphology of *Zea diploperennis* inflorescences and the origin of Maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Maydica* 35: 113-124.
- Cámara Hernández, J., & G. H. Rúa. 1991. The synflorescence of Poaceae. *Beitr. Biol. Pfl*, 66, 297-311.

- 
- Cámara Hernández, J., & A. M., Miente Alzogaray. 1994. Polyteley: a general character in Poaceae. *Beitr. Biol. Pfl*, 68, 249-261.
  - Campbell, C. S. 1982. Cleistogamy in *Andropogon* L.(Gramineae). *American Journal of Botany*, 69(10), 1625-1635.
  - Campbell, C.S. 1982a. "Hybridization between *Andropogon glomeratus* var. *pumilus* and *A. longiberbis* (Gramineae) in Central Florida", *Brittonia*, vol. 34, pp. 146–150.
  - Campbell, C.S. 1982b. Cleistogamy in *Andropogon* L. (Gramineae). *Amer. J. Bot.* 69 (10): 1625-1635.
  - Campbell, C. S. 1983a. Wind dispersal of some North American species of *Andropogon* (Gramineae). *Rhodora*, 65-72.
  - Campbell, C. S. 1983b. Systematics of the *Andropogon virginicus* complex (Gramineae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 64(2), 171-254.
  - Campbell C. S. & P. Windisch. 1986. Chromosome numbers and their taxonomic implication for eight Brazilian *Andropogons* (Poaceae). *Brittonia* 38(4):411-414.
  - Cao, M., Sleper, D. A., Dong, F., & Jiang, J. 2000. Genomic *in situ* hybridization (GISH) reveals high chromosome pairing affinity between *Lolium perenne* and *Festuca mairei*. *Genome*, 43(2), 398-403.
  - Carlson, A. R., Letarte, J., Chen, J. & K.J. Kasha. 2001. Visual screening of microspore derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green fluorescent protein. *Plant. Cell. Rep.* 20:331-337.
  - Cass, D. D., & W. A., Jensen. 1970. Fertilization in barley. *American Journal of Botany*, 57(1), 62-70.
  - Cass et al., 1984. Citado en Anton. 1987.
  - Celarier, R. P. 1957. Cytotaxonomy of the Andropogoneae II Subtribes Ischaeminae, Rottboelliinae, and the Maydeae. *Cytologia*, 22(2), 160-183.
  - Church, R. P. 1940. Cytotaxonomy studies in the *Gramineae*. *Amer. J. Bot.* 27:263-271.
  - Clayton, W. D. 1964. Studies in the *Gramineae*: V. New species of *Andropogon*. *Kew Bull.* 17:465-470. Clayton, W. D. 1966. A revision of the genus *Hyparrhenia*. *Kew Bull.* 2:196 pp.

- 
- Clayton, W. D. 1969. A revision of the genus *Hyparrhenia*. *Kew Bull.* 2:196 pp.
  - Clayton, W. D. 1972a. *Gramineae: Andropogoneae: Andropogon*. 482-489. In Hepper, F. N. (Ed. 2°) *Fl. of West of Trop. África*.
  - Clayton, W. D. 1972b. The awned genera of Andropogoneae. *Studies in the Gramineae: XXXI. Kew Bull* 27(3):457-474.
  - Clayton, W.D. 1987. Andropogoneae. In: Soderstrom, T.R., Hilu, K.W., Campbell, C.S. & Barkworth, M.E. (eds.) *Grass systematics and evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp. 307–309.
  - Clayton, W. D. & S. A. Renvoize. 1982. Gramineae. In: Polhill, R. M. (ed.). *Flora of Tropical east Africa*. Rotterdam, Balkema. Part 3. p. 767-782.
  - Clayton, W.D. & S.A. Renvoize. 1982. *Flora of Tropical East Africa: Gramineae*. Part. 3, pág. 451-898. Rotterdam: A. A. Balkema.
  - Clayton, W.D. & S.A. Renvoize. 1986. *Genera graminum. Grasses of the World*. Kew Bull. Add. Ser. 13. 389 pp. Her Majesty's Stationery Office Books, London, UK.
  - Clifford, H. T. 1987. Spikelet and floral morphology. In: Söderström, T. R. et al. (eds.). *Grass Systematics and Evolution*. Washington, Smithsonian Institution Press, p. 21-30.
  - Connor, H. E. 1979. Breeding systems in the grasses: a survey. *New Zealand journal of botany*, 17(4), 547-574.
  - Connor, H. E. 1981. Evolution of reproductive systems in the Gramineae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 48-74.
  - Connor, H. 1987. Reproductive biology in the grasses. En: T. Soderstrom, K. Hilu, C. Campbell & M. Barkworth (eds.), *Grass systematics and evolution*: 117-132.
  - Comai, L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Gene Silencing*, 267-279.
  - Comai, L., Tyagi, A.P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S.H., Stevens, Y., and Byers, B. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* 12, 1551–1567.
  - Cuadrado A. & N. Jouve. 1994. Mapping and organization of highly repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x-triticale. *Chromosome Research* 3:331-338.

- Cuadrado A. & N. Jouve. 1995. Fluorescent *in situ* hybridization and C-banding analyses of highly repetitive DNA sequences in the heterochromatin of rye (*Secale montanum* Guss.) and wheat incorporating *S. montanum* chromosome segments. *Genome* 38: 795-802.

## D

- Davidse, G. & R.W. Pohl. 1972. Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on some grasses from Central America and The West Indies. *Can.J. Bot.* 50 : 1441-1452.
- Davidse, G. Hoshino, T. & B. K. Simon. 1986. "Chromosome counts of Zimbabwean grasses (Poaceae) and an analysis of polyploidy in the grass flora of Zimbabwe." *South African Journal of Botany*, vol. 52, pp. 521–528.
- Davidse, G., & Pohl, R. W. 1992. New taxa and nomenclatural combinations of Mesoamerican grasses (Poaceae). *Novon*, 81-110.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21.
- Dellaporta, S. L., & A., Calderon-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1241-1251.
- De Melo N.F., Guerra M. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. *Ann Bot* 92(2): 309-316.
- Deumling, B., & Greilhuber, J. 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma*, 84(4), 535-555.
- De Wet, J.M. 1960. Chromosome numbers and some morphological attributes of various South African grasses. *Amer. J. Bot.* 47:44-49.
- De Wet, J. M. J. 1968. Biosystematics of the *Bothriochloa barbinodis* complex (Gramineae). *American Journal of Botany*, 55(10), 1246-1250.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW (2009) InfoStat version 2013. Grupo InfoStat, Facultad Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

- Doležel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 51(2), 127-8.
- Doležel, J., & Bartoš, J. A. N. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of botany*, 95(1), 99-110.
- Dujardin, M. 1978. Chromosome numbers of some tropical African grasses from western Zaire. *Canad. J. Bot.* 57:864-876.

## F

- Fedak, G., Chen, Q., Conner, R. L., Laroche, A., Petroski, R., & Armstrong, K. W. 2000. Characterization of wheat-Thinopyrum partial amphiploids by meiotic analysis and genomic in situ hybridization. *Genome*, 43(4), 712-719.
- Feldman, M., Liu, B., Segal, G., Abbo, S., Levy, A.A., and Vega, J.M. 1997. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147, 1381–1387.
- Feldman, M., & Levy, A. A. 2005. Allopolyploidy—a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and genome research*, 109(1-3), 250-258.
- Fernández, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. *Bol. Soc. Argent. Bot*, 15(2-3), 287-290.
- Ferrari M.R, Greizerstein E.J., Paccapelo H.A., Naranjo C.A., Cuadrado A, Jouvé N., Poggio L. 2005. The genomic composition of *Tricepiro*, a synthetic forage crop. *Genome* 48:154-159.
- Finch, R. A., Smith, J. B., & Bennett, M. D. 1981. *Hordeum* and *Secale* mitotic genomes lie apart in a hybrid. *Journal of cell science*, 52(1), 391-403.
- Font Quer, P. 1953. *Diccionario de botánica* (No. 04; C, QK9 F6.).
- Foster, W. H. 1962. Investigations preliminary to the production of cultivars of *Andropogon gayanus*. *Euphytica*, 11(1), 47-52.
- Flavell, R. B. 1982. Sequence amplification, deletion, and rearrangement-major source of variation during species divergence. *Genome evolution*, 301-323.
- Flavell, R. B. 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 312(1154), 227-242.

- *Flora Argentina: flora vascular de la República Argentina*. Instituto de Botánica Darwinion (San Isidro, Argentina). 2012. Anton, A. M. R., Zuloaga, F. O., Al-Shehbaz, I. A., Barboza, G. E., Belgrano, M. J., Freire, S. E., ... & Arbo, M. M.
- Fransz, P.F., Stam, M., Montijn, B.M., Hoopen, R.T., Wiagant, J., Kooter, J.M., Oud, O. & N. Nanninga. 1996. Detection of single copy genes and chromosome rearrangements in *Petunia hybrida* by fluorescence *in situ* hybridization. *Plant. J.* 9:676-774.
- Fukui, K., Nakayama, S., Ohmido H., Yoshiaki, H. & M. Yamabe. 1998. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 325-330.
- Furuta, Y. & Nishikawa, K. 1991. Variation in nuclear and individual chromosomal DNA content and its role in evolution of plants. In *Developments in Plant Genetics and Breeding* (Vol. 2, pp. 71-85). Elsevier.

## G

- Galdeano, F., & Norrmann, G. 2000. Natural hybridization between two South American diploid species of *Andropogon* (Gramineae). *Journal of the Torrey Botanical Society*, 101-106.
- Garriga-Calderé, F., Huigen, D. J., Filotico, F., Jacobsen, E., & Ramanna, M. S. 1997. Identification of alien chromosomes through GISH and RFLP analysis and the potential for establishing potato lines with monosomic additions of tomato chromosomes. *Genome*, 40 (5), 666-673.
- Gaut, B. S. 2002. Evolutionary dynamics of grass genomes. *New phytologist*, 154(1), 15-28.
- Gill, B. S., y Kimber, G. 1974. Giemsa C-banding and the evolution of wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 4086-4090.
- Goebel, K., & K. Goebe. 1931. Blütenbildung und Sprossgestaltung. (*Anthokladien und Infloreszenzen*). Zweiter Ergänzungsband zur Organographie der Pflanzen. Cita tomada de Parodi (1958).
- González, G. E. 2004. *Afinidades genómicas y mapeo cromosómico en maíz y especies relacionadas, a través de estudios de citogenética clásica y de hibridación in*

*situ* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

- Gould, F.W. 1956. Chromosome counts and cytotaxonomic notes on grasses of the tribe Andropogoneae. *Amer. J. Bot.* 43 (6):395-404.
- Gould, F.W. 1967. The genus *Andropogon* in the United States. *Brittonia* 19: 70-76.
- Gould, F. W. 1968. Grass systematics. Grass systematics.
- Grant, V. 1978. Genetics of flowering plants. Columbia University Press. 514 pp.
- Greilhuber, J., Doležel, J., Lysák, M. A., & Bennett, M. D. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of botany*, 95(1), 255-260.
- Grime, J. P., & Mowforth, M. A. 1982. Variation in genome size—an ecological interpretation. *Nature*, 299(5879), 151-153.
- Guala, G. F. G., & Filgueiras, T. S. 1995. *Andropogon crispifolius* (Poaceae: Andropogoneae): a new species from the cerrado of central Brazil. *Nordic Journal of Botany*, 15(1), 59-62.
- Guerra, M. 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and molecular biology*, 23(4), 1029-1041.

## H

- Hagemann, W. 1990. Comparative morphology of acrogenous branch system and phylogenetic considerations. II. Angiosperms. *Acta Biotheor.* 38: 207-242.
- Hanson, L., McMahon, K. A., Johnson, M. A., & Bennett, M. D. 2001a. First nuclear DNA C-values for 25 angiosperm families. *Annals of Botany*, 87(2), 251-258.
- Hanson, L., Mahon, K. A. M., Johnson, M. A., & Bennett, M. D. 2001b. First nuclear DNA C-values for another 25 angiosperm families. *Annals of Botany*, 88(5), 851-858.
- Hanson, L., Brown, R. L., Boyd, A., Johnson, M. A., & Bennett, M. D. 2003. First nuclear DNA C-values for 28 angiosperm genera. *Annals of Botany*, 91(1), 31-38.
- Hamon P., Siljak-Yakovlev S., Srisuwan S., Robin O., Poncet V., Hamon S., de Kochko A. 2009. Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Res* 17: 291-304.

- Hattersley, P. W., & Watson, L. 1992. Diversification of photosynthesis. In 'Grass evolution and domestication'. (Ed. GP Chapman) pp. 38–116.
- Heslop-Harrison, J. S. 1992. Molecular cytogenetics, cytology and genomic comparisons in the Triticeae. *Hereditas*, 116, 93-99.
- Hervé, A. M. B., & J. F. M., Valls. 1980. The genus *Andropogon* L. (Gramineae) in Rio Grande do Sul. Anuario Tecnico do Instituto de Pesquisas Zootecnicas" Francisco Osorio", 7, 317-410.
- Hidalgo, M. I. M., Caponio, I., & G. A., Norrmann. 2007. Citogenética y biología reproductiva de *Anthaenantia lanata* (Poaceae: Panicoideae). Cytogenetics and reproductive biology of *Anthaenantia lanata*. *Kurtziana*. Tomo 33 (2): 27-33.
- Hidalgo, M. I., Greizerstein, E. J., & Norrmann, G. A. 2019. Cytogenetic studies in three diploid species of *Andropogon* (Andropogoneae), section Leptopogon. *Rodriguésia*, 70.
- Hilu, K. W. 1984. Leaf epidermes of *Andropogon* sect. *Leptopogon* (Poaceae) in North America. *Systematic botany*, 247-257.
- Hinnisdaels S., Mouras A.S., Veuskens J., Taylor C., Gharti-Chhetri T., Negrutiu I. and Jacobs M. 1992. Translocation events demonstrated by molecular in situ hybridization and chromosome pairing analysis in highly asymmetric somatic hybrid plants. *Transgenic Res.* 1:170-176.
- Hoopen, R.T.; Robbins, T.P.; Fransz, P.F.; Montijn, B.M.; Oud, O.; Gerats, A.G.M. & N. Nanninga. 1996. Localization of T-DNA insertions in *Petunia* by fluorescence *in situ* hybridization: physical evidence for suppression of recombination. *Plant Cell* 8:823–830.

## I

- Innes, R. R., & Clayton, W. D. 1977. A manual of Ghana grasses. *Ministry of Overseas Development*.
- Irigoyen M.L., Linares C., Ferrer E., Fominaya A. 2002. Fluorescence *in situ* hybridization mapping of *Avena sativa* L. cv. *SunII* and its monosomic lines using cloned repetitive DNA sequences. *Genome* 45:1230–1237.

## J

- Jacobsen, E., De Jong, J. H., Kamstra, S. A., Van den Berg, P. M. M. M., & Ramanna, M. S. 1995. Genomic *in situ* hybridization (GISH) and RFLP analysis for the identification



of alien chromosomes in the backcross progeny of potato (+) tomato fusion hybrids. *Heredity*, 74 (3), 250-257.

- Jacques Félix, H. 1962. Les graminées (Poaceae) d'Afrique tropicale. 1. Généralités, classification, description des genres. Bull Sci. Inst. des Recherches Agronomiques Tropicales 8. I.R.A.T. París. Citado en Veggeti & Weberling (1996).

- Jirásek, V. & M. Jozífivá. 1968. Morphology of lodicules, their variability and importance in the taxonomy of the Poaceae family. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 12: 324-349. En Clifford (1987).

- John, B. 1990. Meiosis. Cambridge Univ. Press.

## K

- Kannenberg, L. W., & Allard, R. W. 1967. Population studies in predominantly self-pollinated species. VIII. Genetic variability in the *Festuca microstachys* complex. *Evolution*, 21(2), 227-240.

- Kenton, A., Parokonny, A. S., Gleba, Y. Y., & Bennett, M. D. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG*, 240(2), 159-169.

- Keeler, K. H. 1990. Distribution of polyploid variation in big bluestem (*Andropogon gerardii*, Poaceae) across the tallgrass prairie region. *Genome*, 33(1), 95-100.

- Keeler, K. 1992. Local polyploid variation in the native prairie grass *Andropogon gerardii*. *American Journal of Botany* 79 : 1229 – 1232.

- Keeler-Grein & Rainer Schultze-Kraft. 1989. *Andropogon gayanus* Kunth: a grass for tropical acid soils-CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical. ISBN 84-89206-80-5.

- Kellogg, E.A. & C.S. Campbell. 1987. Phylogenetic Analyses of the Gramineae (310-324). In: Soderstorm, T. et al. (eds). *Grass Systematics & Evolution*, Smithsonian Institution Press, Washington, D.

- Kellogg, E. A., & Bennetzen, J. L. 2004. The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *American journal of botany*, 91(10), 1709-1725.

- Kenton, A., Parokonny, A. S., Gleba, Y. Y., & Bennett, M. D. 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG*, 240(2), 159-169.

- Killeen, T. J. 1990. The grasses of Chiquitanía, Santa Cruz, Bolivia. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 125-201.
- King, I.P.; Morgan, W.G.; Armstead, I.P.; Harper, J.A.; Hayward, M.D.; Bollard, A.; Nash, J. V.; Forster, J. W. and Thomas, H.M. 1998. Introgression mapping in the grasses I. Introgression of *Festuca pratensis* chromosomes and chromosome segments into *Lolium perenne*. *Heredity*. 81: 462–467. doi:10.1046/j.1365-2540.1998.00437.x
- Klapp, E. 19833. Manual de las Gramíneas. Reconocimiento y determinación, lugar y establecimiento de asociaciones, valoración y usos. Ed. Omega.
- Klein, R. M. 1984. Aspectos dinâmicos da vegetação do sul do Brasil. *Sellowia*, 36(36), 5-54.
- Knight, C. A., Molinari, N. A., & Petrov, D. A. 2005. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany*, 95(1), 177-190.
- Kosina, R., & Heslop-Harrison, J. S. 1996. Molecular Cytogenetics of an amphiploid trigeneric hybrid between *Triticum durum*, *Thinopyrum distichum* and *Lophopyrum elongatum*. *Annals of Botany*, 78(5), 583-589.

## L

- Laurie, D. A., & Bennett, M. D. 1985. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. *Heredity*, 55(3), 307-313.
- Leggett, J. M., & Markhand, G. S. 1995. The genomic identification of some monosomics of *Avena sativa* L. cv. Sun II using genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 38(4), 747-751.
- Leitch A.R., Mosgöller W., Schwarzacher T., Bennett M.D. and Heslop-Harrison J.S. 1990. Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *J. Cell. Sci.* 95:335-341.
- Leitch, I. J., & Heslop-Harrison, J. S. 1992. Physical mapping of the 18S–5.8 S–26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome*, 35(6), 1013-1018.
- Leitch, I. J., & Hanson, L. 2002. DNA C-values in seven families fill phylogenetic gaps in the basal angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140(2), 175-179.

- Leitch, I. J., & Bennett, M. D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological journal of the Linnean Society*, 82(4), 651-663.
- Leitch I. J., Bennett M. D. 2005. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651–663.
- Leitch, I. J., & Leitch, A. R. 2013. Genome size diversity and evolution in land plants. In *Plant Genome Diversity Volume 2* (pp. 307-322). Springer, Vienna.
- Le Long, M. G. 1965. Studies of reproduction and variation in some *Panicum* subgenus *Dichanthelium*. Iowa State University of Science and Technology-Ph.D., Botany.
- Leopolde, B. y Dentonm, F. 1987. Comparative age of grassland and steppe east and west of the northern Rocky Mountains. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 74: 841-867.
- Le Roux, L. G., & E. A., Kellogg. 1999. Floral development and the formation of unisexual spikelets in the Andropogoneae (Poaceae). *American Journal of Botany*, 86(3), 354-366.
- Levan A, Fredga K, Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 52, 201-220.
- Linde-Laursen, I. B., & Jensen, J. 1991. Genome and chromosome disposition at somatic metaphase in a *Hordeum* × *Psathyrostachys* hybrid. *Heredity*, 66(2), 203-210.
- Lim, K. B., Wennekes, J., Jong, J. H. D., Jacobsen, E., & Van Tuyl, J. M. 2001. Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridisation. *Genome*, 44(5), 911-918.
- Lima De Faria, A. 1976. The chromosome field: I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas*, 83(1), 1-22.
- Liu, B., Vega, J. M., Segal, G., Abbo, S., Rodova, M., & Feldman, M. 1998. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops. I. Changes in low-copy noncoding DNA sequences. *Genome*, 41(2), 272-277.
- Liu, C. Z., Yang, J. T., Yoon, J. W., Walterhouse, D., & Iannaccone, P. 1998. Characterization of the promoter region and genomic organization of GLI; a member of the Sonic hedgehog-Patched signaling pathway. *Gene*, 209(1-2), 1-11.
- Liu, B., & Wendel, J. F. 2002. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Current Genomics*, 3(6), 489-505.

- Liu, Q., Zhao, N.X., Hao, G. 2005. Inflorescence structures and evolution in subfamily *Chloridoideae* (Gramineae). *Plant Syst. Evol.* 251, 183–198.
- Liu, B., Vega, J.M., Segal, G., Abbo, S., Rodova, M., and Feldman, M. 1998a. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences. *Genome* 41, 272–277.
- Liu, B., Vega, M.J., and Feldman, M. 1998b. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome* 41, 535–542.
- Liu, B., and Wendel, J.F. 2002. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Curr. Genomics*, 3: 489–506.

### M

- Ma, X. F., & Gustafson, J. P. 2006. Timing and rate of genome variation in triticales following allopolyploidization. *Genome*, 49(8), 950-958.
- Markova, M., & Vyskot, B. 2009. New horizons of genomic *in situ* hybridization. *Cytogenetic and genome research*, 126(4), 368-375.
- Mason-Gamer, R. J. 2001. Origin of North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences. *Systematic botany*, 757-768.
- Mathews, S., Tsai, R. C., & Kellogg, E. A. 2000. Phylogenetic structure in the grass family (Poaceae): evidence from the nuclear gene phytochrome B. *American journal of botany*, 87(1), 96-107.
- Maze, J. 1977. The vascular system of the inflorescence axis of *Andropogon gerardii* (Gramineae) and its bearing on concepts of monocotyledon vascular tissue. *American Journal of Botany*, 64(5), 504-515.
- Maze, J., & Scagel, R. K. 1982. Morphogenesis of the spikelets and inflorescence of *Andropogon gerardii* Vit. (Gramineae) and the relationship between form, information theory, and thermodynamics. *Canadian Journal of Botany*, 60(6), 806-817.
- McAllister, C. A., & Miller, A. J. 2016. Single nucleotide polymorphism discovery via genotyping by sequencing to assess population genetic structure and recurrent polyploidization in *Andropogon gerardii*. *American journal of botany*, 103(7), 1314-1325.

- McClure, F. A. 1966. The bamboos: a fresh perspective. The Bamboos: a fresh perspective. 347 pp. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Moffett, A. A., & Hurcombe, R. U. T. H. 1949. Chromosome numbers of South African grasses. *Heredity*, 3(3), 369-373.
- Moore, K. J., & Moser, L. E. 1995. Quantifying developmental morphology of perennial grasses. *Crop Science*, 35(1), 37-43.
- Morgan, M. T. 2001. Transposable element number in mixed mating populations. *Genetics Research*, 77(3), 261-275.
- Moscone, E.A.; Matzke, M.A. & A.J.M. Matzke. 1996. The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105:231-236.
- Moscone, E. A., Klein, F., Lambrou, M., Fuchs, J., & Schweizer, D. 1999. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome*, 42(6), 1224-1233.
- Mouras, A., Saul, M. W., Essad, S., & Potrykus, I. 1987. Localization by *in situ* hybridization of a low copy chimaeric resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. *Molecular and General Genetics MGG*, 207(2), 204-209.
- Mouras, A. & Negrutiu, I. 1989. Localization of the T DNA on marker chromosomes in transformed tobacco cells by *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 78:715-720.

## N

- Nagahama, N. 2012. Relaciones filogenéticas en el complejo *Andropogon lateralis* (sect. *Leptopogon*, Andropogoneae, (POACEAE). (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA).
- Nagahama, N., Vegetti, A. C., ANTON, A., & G. A., Norrmann. 2013. Synflorescence analysis in South American species of *Andropogon* section *Leptopogon* (Andropogoneae, Poaceae): a tool to identify different ploidy levels. *Phytotaxa*, 82(2), 45-63.
- Nickol, M. G. 1995. Phylogeny and inflorescences of Berberidaceae—a morphological survey. In *Systematics and Evolution of the Ranunculiflorae* (pp. 327-340). Springer, Vienna.

- 
- Nicora, E. G. & Z. E. Rúgolo de agrasar. 1987. Los géneros de Gramíneas de América Austral. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 611 pp.
  - Norrmann, G.A. 1985. Estudios citogenéticos en especies argentinas de *Andropogon* (Gramineae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 24: 137–149.
  - Norrmann, G. 1999. Biosistemática y relaciones filogenéticas de especies hexaploides sudamericanas de *Andropogon* (Gramineae). Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 98p.
  - Norrmann, G. 1999. Citotaxonomía y relaciones filogenéticas en especies hexaploides de *Andropogon* (Poaceae) de Sudamérica. Universidad Nacional de Córdoba (Argentina).
  - Norrmann, G. A. 2009. Natural hybridization in the *Andropogon lateralis* complex (Andropogoneae, Poaceae) and its impact on taxonomic literature. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159(1), 136-154.
  - Norrmann, G.A. & Quarin, C.L. 1987. Permanent odd polyploidy in a grass: *Andropogon ternatus*. *Genome* 29: 340–344. <http://dx.doi.org/10.1139/g87-056>.
  - Norrmann, G. A., & Quarin, C. L. 1991. Biología reproductiva de especies sudamericanas de *Andropogon* (Gramineae). Breeding systems in South American species of *Andropogon* (Gramineae) *Bol. Soc. Argent. Bot.* 27(1-2), 85-90.
  - Norrmann, G. A., Quarin, C. L., & Keeler, K. H. 1997. Evolutionary implications of meiotic chromosome behavior, reproductive biology, and hybridization in 6x and 9x cytotypes of *Andropogon gerardii* (Poaceae). *American Journal of Botany*, 84(2), 201-207.
  - Norrmann, G. A., & F., Scarel. 2000. Biología reproductiva de cuatro especies sudamericanas hexaploides de *Andropogon* (Gramineae, Andropogoneae).
  - Norrmann, G. A., & Quarín, C. L. 2001. *Andropogon barretoii*, una nueva especie de Poaceae del sur de Brasil. *Darwiniana*, 171-174.
  - Norrmann, G. A., & Keeler, K. H. 2003. Cytotypes of *Andropogon gerardii* Vitman (Poaceae): Fertility and reproduction of aneuploids. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141(1), 95-103.

- Norrmann, G., Hanson, L., Renvoize, S., & Leitch, I. J. 2004. Genomic relationships among diploid and hexaploid species of *Andropogon* (Poaceae). *Genome*, 47(6), 1220-1224.
- Norrmann, G. A. & I., Caponio. 2012. *Andropogon*. Flora Argentina. Tomo X. Vol. X. 474-481.

## O

- Okoli BE y Olorode O. 1983. Cytogenetic studies in the *Andropogon gayanus*-*A. tectorum* complex (Graminae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 87: 263-271.
- Olorode, O. 1972. Cytological studies in some Nigerian Andropogoneae. *Nigerian Journal of Science*, 6, 13-19.
- Ozkan, H., Levy, A. A., & Feldman, M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *The Plant Cell*, 13(8), 1735-1747.
- Ozkan, H., Tuna, M., & Arumuganathan, K. 200. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Journal of Heredity*, 94(3), 260-264.

## P

- Pardue, M. L., & Gall, J. G. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64(2), 600-604.
- Parodi, L. 1958. Gramíneas bonaerenses. Clave para la determinación de los géneros y enumeración de las especies. 5° ed.-ACME AGENCY, S.R.L.
- Parodi, L. R. 1961. La taxonomía de las Gramineae Argentinas a la luz de las investigaciones más recientes. University of Toronto Press.
- Peart, M. H. 1984. The effects of morphology, orientation and position of grass diaspores on seedling survival. *The Journal of Ecology*, 437-453.
- Pedersen, C., Zimny, J., Becker, D., Jahne-Gartner & H. Lorz. 1997. Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by *fluorescence in situ hybridization*. *Theor Appl Genet* 94:749–757
- Peichoto, M. C. 2007. Estudios sistemáticos en las especies sudamericanas de *Schizachyium* (Poaceae: Andropogoneae). Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.

- 
- Peichoto, M. C. 2010. Revisión taxonómica de las especies del género *Schizachyrium* (Poaceae: Andropogoneae) de Sudamérica. *Candollea*, 65(2), 301-345.
  - Peichoto, M. C., & A. C., Vegetti. 2007. Synflorescences of species related to *Schizachyrium condensatum* (Poaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional, Ecology of Plants*, 202(7), 503-512.
  - Peichoto, M. C., Mazza, S. M., & V. G. S., Neffa. 2008. Morphometric analysis of *Schizachyrium condensatum* (Poaceae) and related species. *Plant Systematics and Evolution*, 276(3-4), 177-189.
  - Perthuy, G. Y., Martínez, S., Greizerstein, E. J., & Poggio, L. 2010. Genomic relationships among diploid and polyploid species of the genus *Eryngium* L. using genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 53(10), 824-831.
  - Perreta, M.G., Ramos, J.C. & A.C., Vegetti. 2009. Development and structure of the grass Inflorescence. *Botanical Review* 75: 377–396. <http://dx.doi.org/10.1007/s12229-009-9038-8>.
  - Peters, L.C. & L.V. Newell. 1961. Hybridization between divergent types of big bluestem, *Andropogon gerardii* Vitman, and sand bluestem, *Andropogon hali* E. Hackel. *Crop Sci* 1:359-363.
  - Poggio, L., Molina, M. D. C., & Naranjo, C. A. 1990. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. *Theoretical and applied genetics*, 79(4), 461-464.
  - Poggio, L., Confalonieri, V., Comas, C., Cuadrado, A., Jouve, N., & Naranjo, C. A. 1999a. Genomic *in situ* hybridization (GISH) of *Tripsacum dactyloides* and *Zea mays* ssp. *mays* with B chromosomes. *Genome*, 42(4), 687-691.
  - Poggio, L., Confalonieri, V. A., Comas, C., Gonzalez, G., & Naranjo, C. A. 1999b. Genomics affinities among *Zea luxurians*, *Zea perennis* and *Zea diploperennis*: meiotics behaviour in the F1 and genomics *in situ* hybridization (GISH). *Genome*, 42, 993-1000.
  - Poggio, L., Confalonieri, V., Comas, C., Gonzalez, G., & Naranjo, C. A. 2000a. Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 1021-1027.
  - Poggio, L., Confalonieri, V., Gonzalez, G., Comas, C., & Naranjo, C. A. 2000b. Aportes de la citogenética molecular al análisis de divergencias genómicas crípticas en el género *Zea* (Poaceae). *Bol Soc Argent Bot.* 2000b, 35, 297-304



- Poggio, L. & C. Naranjo. 2004. Citogenética en Biotecnología y Mejoramiento vegetal (V. Echenique; C. Rubinstein y L. Mroginski editores Ediciones INTA. ArgenBio. 69-79.
- Poggio, L., Gonzalez, G., & Naranjo, C. A. 2007. Chromosome studies in *Hippeastrum* (Amaryllidaceae): variation in genome size. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155(2), 171-178.
- Poggio, L., Realini, M. F., Fourastié, M. F., García, A. M., & González, G. E. 2014. Genome downsizing and karyotype constancy in diploid and polyploid congeners: a model of genome size variation. *AoB Plants*, 6.
- Pohl, R. W. 1980. Gramineae. In: Burger, W. (ed.). *Flora costaricensis*. Fieldiana Bot. 4:41- 46; 172-174; 267-268
- Pohl, R. W. & G. Davidse. 1994. *Andropogon* L. In: Davidse, G.; M. Sousa & A. O. Chater (eds.). *Flora Mesoamericana*. México, Universidad Nacional Autónoma.
- Price, H. J. 1988a. Nuclear DNA content variation within angiosperm species.
- Price, H. J. 1988b. DNA content variation among higher plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1248-1257.

## R

- Raina, S.N.; Mukai, Y. and Yamamoto M. 1998. *in situ* hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theoretical and Applied Genetics*. 97(8): 1204-1209. <https://doi.org/10.1007/s001220051011>
- Raina, S. N., & Rani, V. 2001. GISH technology in plant genome research. *Methods in cell science*, 23(1), 83-104.
- Rambo, B. 1951a. O elemento andino no pinhal riograndense [araucaria, pinheiro, Rio Grande do Sul, Brasil].
- Rambo, B. 1951b. A imigracao da selva higrofila no Rio Grande do Sul [Brasil].
- Rambo, B. S. J. 1954a. *Análise historica de flora de porto Alegre*.
- Rambo, B. 1954b. História da flora do litoral riograndense. *Sellowia*, 6(6), 113-172.
- Ramzan, F., Younis, A., & Lim, K. B. 2017. Application of genomic *in situ* hybridization in horticultural science. *International journal of genomics*.

- 
- Raven, P. H., & Axelrod, D. I. 1974. Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61(3), 539-673.
  - Rayburn, A. L., Price, H. J., Smith, J. D., & Gold, J. R. 1985. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays*. *American Journal of Botany*, 72(10), 1610-1617.
  - Rayburn, A. L., & Gill, B. S. 1985. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *Journal of Heredity*, 76(2), 78-81.
  - Reeves, A. 2001. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*, 44(3), 439-443.
  - Rosengurtt, B. y B. Arrillaga. 1958. Algunos caracteres de las gramíneas de ciclo invernal y estival de Uruguay. *Revista Asoc. Ing. Agr.* 30 (103): 38-47.
  - Rosengurtt, B., B. R. Arrillaga & B. Sierra de Soriano. 1960. Caracteres vegetativos y forrajeros de 175 gramíneas del Uruguay. *Revista Facultad Agronomía, Montevideo*. 47: 1-168.
  - Rosengurtt, B., Arrelliga, B. R., & P., Izaguirre. 1970. Gramíneas uruguayas. Universidad de la República. Departamento de publicaciones. Montevideo, Uruguay.
  - Rosengurtt, B. 1982. Puerto O del, Arrillaga de Maffer B, Lombardo A. 1982 Gramíneas. Montevideo, Universidad de la Republica, Facultad de Agronomía, 1-7.
  - Rozen & Skaletsky. 2000. para el White Institute for Biomedical Research & Howard Hughes Medical Institute, USA ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)).
  - Rua, G. 1999. Inflorescencias: Bases teóricas para su análisis. *Sociedad Argentina de Botánica*. Buenos Aires. 100 pp.
  - Rua, G. 2003. Growth forms, branching patterns, and inflorescence structure in *Digitaria* sect. *Trichachne* (Poaceae: Paniceae). *Flora* 198, 178–187.
  - Rua, G. H., & F., Weberling. 1998. Growth form and inflorescence structure of *Paspalum* L. (Poaceae, Paniceae): a comparative morphological approach. *Beitr. Biol. Pfl.* 69(3), 363-431.
  - Rua, G. H., & S. S., Aliscioni. 2002. A morphology-based cladistic analysis of *Paspalum* sect. *Pectinata* (Poaceae). *Systematic Botany*, 489-501.

## S

- Salvo-Garrido, H., Travell, S., Schwarzacher, T., Harwood, W.A. & J.W. Snape. 2001. An efficient method for physical mapping of transgenes in barley using *in situ* hybridization. *Genome*. 44:104–110.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sasakuma, T., Ogihara, Y., and Tsujimoto, H. (1995). Genome rearrangement of repetitive sequences in processes of hybridization and amphiploidization in Triticinae. In 8th International Wheat Genetics Symposium, Z. Li and Z. Xin, eds (Beijing: China Agricultural Sciencetech Press), pp. 563–566.
- Schmidt, T., Kubis, S., Katsiotis, A., Jung, C., & Heslop-Harrison, J. S. 1998. Molecular and chromosomal organization of two repetitive DNA sequences with intercalary locations in sugar beet and other Beta species. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5-6), 696-704.
- Schneider, M. del Pilar, & A. C. Vegetti. 1992. The synflorescence in species of *Sorghinae* (Andropogoneae-Poaceae). *Beitr. Biol. Pfl*, 67(2), 225-239.
- Schubert, I., Shi, F., Fuchs, J., & Endo, T. R. 1998. An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *The Plant Journal*, 14(4), 489-495.
- Schwarzacher, T., Ambros, P., & Schweizer, D. 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 134(3), 293-297.
- Schwarzacher, T. 2003. DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome*, 46(6), 953-962.
- Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D., & Heslop-Harrison, J. S. 1989. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, 64(3), 315-324.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. S., Anamthawat-Jonsson, K., Finch, R. A., & Bennett, M. D. 1992a. Parental genome separation in reconstructions of somatic and premeiotic metaphases of *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum*. *Journal of Cell Science*, 101(1), 13-24.
- Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, P. 2000. *Practical in situ hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd.

- 
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58(4), 307-324.
  - Seijo J.G., Lavia G.I., Fernández A., Krapovickas A., Ducasse D., Moscone E.A. 2004. Physical mapping of 5S and 18S-25S rRNA genes evidences that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid species involved in the origin of *A. hypogaea* (Leguminosae). *Am J Bot* 91:1294-1303.
  - Seijo J.G., Lavia G.I., Fernández A., Krapovickas A., Ducasse D., Bertoli D.J., Moscone E.A. 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *Am J Bot* 94:1963-1971.
  - Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M., and Levy, A.A. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell*, 13: 1749–1759.
  - Silva, G. S., & Souza, M. M. 2020. Origin of the cultivated passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and genomic relationships among species of the subgenera *Decaloba* and *Passiflora*. *Plant Biology*, 22(3), 533-540.
  - Singh, D. N. 196). Supernumerary chromosomes in some grasses. *Caryologia*, 18(3), 547-553.
  - Singh, D. N., & Godward, M. B. E. 1960. Cytological studies in the Gramineae. *Heredity*, 15, 193-197.
  - Silva, G. S., & Souza, M. M. 2013. Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genet Mol Res*, 12(3), 2953-2965.
  - Snowdon, R.J; Koehler W. and Koehler, A. 1997. Chromosomal localization and characterization of rDNA loci in the *Brassica* A and C genomes. *Genome* 40(4): 582-587. <https://doi.org/10.1139/g97-076>.
  - Song, K., Lu, P., Tang, K., and Osborn, T.C. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7719–7723.
  - Soltis, D. E., & P. S. Soltis. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in ecology & evolution*, 14(9), 348-352.

- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Bennett, M. D., & Leitch, I. J. 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany*, 90(11), 1596-1603.
- Spies, J. J., & Du Plessis, H. (1987). Miscellaneous note: CHROMOSOME STUDIES ON AFRICAN PLANTS. 3. Bothalia, 17(1), 131-135.
- Stapf, O. 1917. Gramíneae. In Prain, D. (Ed.). Flora of Tropical Africa. Vol. IX. Part. 1. L. Reeve & CO. LTD. London.
- Stapf, O. 1919. Gramineae. In Prain, D. Flora of tropical Africa, Vol. IX. Part.3. L. Reeve & CO. LTD. London.
- Stebbins, G. L. 1957. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, 91(861), 337-354.
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. *Chromosomal evolution in higher plants*.
- Stebbins, G. L. 1975. The role of polyploid complexes in the evolution of North American grasslands. *Taxon* 24:91-106.
- Stebbins, G. L. 1981. Coevolution of grasses and herbivores. *Ann. Mo.Bot. Gard.* 68: 75-86.
- Stebbins, G. L. 1982. Major trends of evolution in the Poaceae and their possible significance. En Estes, J. R. & al. (Eds.). *Grasses and Grasslands*: pp. 3-36. University of Oklahoma Press, Norman.
- Stebbins, G. L., & Crampton, B. 1961. A suggested revision of the grass genera of temperate North America. *Recent advances in botany*, 1, 133-145.
- Stebbins, G. 2013. Flowering Plants: Evolution Above the Species Level. Cambridge, MA and London, England: Harvard University Press.  
<https://doi.org/10.4159/harvard.9780674864856>
- Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M., & Levy, A. A. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *The Plant Cell*, 13(8), 1749-1759.

## T

- Thomas, H.M.; Harper, J.A.; Meredith, M.R.; Morgan, W.G. and Thomas, I.D. 1996. Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence *in situ*

---

hybridization. Chromosome Research, 4(7): 486-490.  
<https://doi.org/10.1007/BF02261775>

- Tito, C. M., Poggio, L., & Naranjo, C. A. 1991. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(1), 58-64.
- Trinius, C.B. 1832. Andropogineorum genera. Mém. Académie Impériale des Sciences de Saint- Petersburg ser. 6, Sci. Math. Nat. 2: 239-290.
- Troll, W. 1964. Die Infloreszenzen; Typologie und Stellung im Aufbau des Vegetationskörpers.
- Troll, W. 1969: Botanischer Teil. - In: Kornm.biol. Forsch., Ber. - Akad. Wiss. Lit. Mainz, Jahrb. 1969: 88-105.

## U

- USDA. 2014. The PLANTS Database. Website <http://plants.usda.gov> [accessed 15 January 2014].

## V

- Vaio, M., Mazzella, C., Porro, V., Speranza, P., López-Carro, B., Estramil, E., & Folle, G. A. 2007. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Systematics and Evolution*, 265(1), 109-121.
- Vega, A. S. 1997. Revisión sistemática de las especies americanas del género *Bothriochloa* (Poaceae: Panicoideae: Andropogoneae) (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
- Vegetti, A. C. 1986. Contribución al conocimiento de las inflorescencias en *Chloris* y *Cynodon* (Poaceae). *Kurtziana* 18: 109-120.
- ----- 1987. Anabiosis tipológico de la inflorescencia en *Paspalum* (Poaceae). *Kurtziana* 19: 155-160.
- ----- 1991. Sobre la politelia en las inflorescencias de Poaceae. *Kurtziana* 21: 275-278. *FLORA*.
- ----- 1992a. Contribution to the study of the synflorescence in *Themeda* Forssk. (Andropogoneae-Poaceae). *Beitr. Biol. Pfl*, 67(2), 251-258.
- ----- 1992b. La sinflorescencia en *Schizachyrium tenerum* y *S. salzmanii*. *Darwiniana* 31: 341-344.

- ----- 1993. Tipología de la sinflorescencia en *Hemarthia altissima*. Parodiana 8: 69–75.
- ----- 1994. Tipología de la sinflorescencia en Andropogoneae. PhD dissertation, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 205 pp.
- ----- 1997. Sobre la estructura de la inflorescencia en especies de *Anthistiriinae* (Poaceae: Andropogoneae). On the inflorescence structure in *Anthistiriinae* species (Poaceae: Andropogoneae.) *Candollea*, 52(1), 87-103.
- ----- 1999. Typology of synflorescence of Andropogoneae (Poaceae), additional comments. Feddes Repertorium 110: 111–126.  
<http://dx.doi.org/10.1002/fedr.19991100119>
- Vegetti A. C. & J.C. Tivano. 1991: Inflorescence in *Schizachyrium microstachyum* (Poaceae). *Beitr. Biol. Pflanzen* 66: 165 -178.
- Vegetti, A., & A. M., Anton. 1991. Interpretación morfológica del par de espiguillas en *Schizachyrium microstachyum* (Poaceae). *Kurtziana*, 21, 267-74.
- Vegetti, A., & A. M., Anton. 1995. Some evolution trends in the inflorescence of Poaceae. *Flora*, 190(3), 225-228.
- Vegetti, A. C., & F., Weberling. 1996. The structure of the paracladial zone in Poaceae. *Taxon*, 453-460.
- Vegetti, A. C., & Anton, A. M. 2000. The grass inflorescence. *Grasses: Systematics and evolution*, 29-31.
- Vegetti, A. & D., Müller-Doblies. 2004. The inhibition areas within the synflorescence of Poaceae. *Beitr. Biol. Pflanz.* 73. 51-74.

## W

- Watson, L. 1990. The grass family. Poaceae. En G.P. Chapman (ed.) Reproductive versatility in the grasses. Pág. 1-31. Cambridge, Univ. Press., Cambridge.
- Watson, L. & J.M. Dallwitz 1992. The grass genera of the world. CAB International, Wallingford, UK.
- Weaver, J.E. & T.J. Fitzpatrick, 1934. The Prairie. Ecological Monographs. 4:109-295.
- Weaver, J. E. 1954. A seventeen-year study of plant succession in prairie. *American Journal of Botany*, 31-38.

- Weberling, F. 1989a: Structure and evolutionary tendencies of inflorescences in the Leguminosae.-In: C. H. STIRTON & J. L. ZARUCCHI (eds.), *Advances in legume biology.-Monogr. Syst. Bot. Missouri Card.* 29: 35-58.
- Weberling, F. 1989b. *Morphology of flowers and inflorescences.* Cambridge Univ. Press: Cambridge, 405, 236-7.
- Weberling, F. 1965. Typology of Inflorescences. *Journal of the Linnean Society of London, Botany.* 59. 215 - 221.
- Wells, P.V. 1970. Historical factors controlling vegetation patterns and floristic distributions in the Central Plains region of North America. In *Pleistocene and Recent environments of the central Great Plains.* Edited by W. Dort, Jr., and J.K. Jones, Jr. University of Kansas Press, Lawrence, KS. pp. 211-224.
- Wendel, J.F., Schnabel, A., and Seelanan, T. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 280–284..
- Wendel, J. F. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant molecular evolution,* 225-249.
- Wipff, J.K. 1996. Nomenclatural combinations in *A. gerardii* complex (Poaceae, Andropogoneae). *Phytologia* 80(5):343-347.
- Wright, S. I., & Schoen, D. J. 1999. Transposon dynamics and the breeding system. *Genetica*, 107(1), 139-148.

## Z

- Zanin, A. 2001. Revisão de *Andropogon* L. (Poaceae–Panicoideae–Andropogoneae) no Brasil. PhD dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, 404 pp.
- Zanin, A., & Longhi-Wagner, H. M. 2011. Revision of *Andropogon* (Poaceae-Andropogoneae) from Brazil. *Rodriguésia*, 62(1), 171-202.
- Zarco, C. R. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, 35(3), 526-530.



# **ANEXOS**

---

## ANEXO I: Soluciones de trabajo

### Viabilidad de los granos de polen

#### Colorante de Alexander.

##### Preparación:

- En una botella color caramelo, agregar:
  - 10 ml de alcohol etílico al 96 %.
  - 10 mg de verde de Malaquita (1 ml sol. al 1% en alcohol 95%)
  - 50 ml de agua destilada.
  - 25 ml de glicerol.
  - 5 gr de fenol.
  - 5 gr de Hidrato de cloral.
  - 50 mg de Fucsina ácida (5ml sol 1% en agua).
  - 5 mg de Orange G (0.5 ml sol 1% en agua).
  - Ácido acético glacial hasta concentración del 4% (1-4 ml).
- Conservar en oscuridad.

### Estudios de Citogenética clásica

#### Mitosis

##### Mezcla Farmer-Mezcla alcohol / ácido acético

Esta solución se preparó justo antes de usarla, debido a que si se prepara con mucho tiempo de antelación se esterifica y disminuye su eficiencia como fijadora.

- En el tubo de ensayo donde se fijarán las raicillas se colocan 3 partes (3 ml) de alcohol etílico absoluto y se adhiere 1 parte (1 ml) de ácido acético glacial (proporción 3:1).
- Se mezcla con una pipeta y se traspasan las raicillas.
- Las raicillas quedan en el fijador, por, al menos 15 minutos y a temperatura ambiente. Se recomienda hacer por lo menos un cambio con solución fijadora fresca a los 15 min. a temperatura ambiente.
- Se renueva la mezcla fijadora y pueden quedar en ella hasta que sean utilizadas.
- Se puede conservar el material a 0° C. Si no se dispone de refrigerador se aconseja pasar a alcohol etílico 70° C.

---

**Colorante de Feulgen**

- 0.7 gr. de Fucsina Básica.
- 3.8 gr. de Metabisulfito de sodio.
- 200 ml de ácido clorhídrico 0,5 Normal.
- 1 gr. de Carbón activado (o más).

**Preparación:**

- En un Erlenmeyer o vaso de precipitados envuelto en papel aluminio, se colocan 200 ml HCl 0,5 N.
- Se agita en agitador magnético.
- Se agregan 3,8 gr meta bisulfito sódico y se continúa agitando.
- Una vez disuelto se agregan 0,7 gr de fucsina básica.
- Tapar para que no entre la luz y se continúa agitando 2 horas.
- Se agrega 1 gr de carbón activado, agitar y filtrar en un frasco color caramelo.
- Se conserva en heladera.

**Orceína acética****Solución estándar**

- Se mezclan 2,2 gr de orceína en 100 c.c. de ácido acético glacial.
- Se hierve a reflujo durante 30-45 min, se deja enfriar y se filtra.
- Luego, se diluye a ácido acético 45% adicionando agua destilada requerida, llevando la solución a una concentración de 1%.

**Meiosis****Mezcla alcohol etílico/ácido láctico (Fernández, 1973).**

- Mezclar 5 partes de alcohol etílico absoluto : 1 parte de ácido láctico.
- Se pueden dejar las anteras o espiguillas a 18-20 °C, durante 24 hrs

Es una mezcla fijadora para cualquier tipo de coloración y tejido.

- a) Es una solución estable; puede prepararse y conservarse más de un mes antes de usar.
- b) Es un buen conservador del material fijado.
- c) Puede usarse en su preparación alcohol etílico 96% sin disminuir su eficiencia (A. Fernández, comunicación personal).

### **Carmín acético al 2%**

- Mezclar 2 gr de carmín con 100 ml de ácido acético glacial al 45%.
- Se hierve suavemente durante 30-45 minutos en un balón condensador a reflujo.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y filtrar.

#### **Procedimiento:**

- Colocar una antera en un portaobjetos y agregar una gota de carmín acético.
- Con una lanceta histológica cortar transversalmente y vaciar la antera, presionando desde el ápice no cortado hasta el lugar del corte.
- Quitar los restos de las paredes de la antera.
- Observar con el microscopio con bajo aumento (10x) sin cubrir el portaobjetos con el cubreobjetos.
- Si no hay células en división ensayar de nuevo con otra antera o botón floral de distinto tamaño.
- Si hay microsporocitos en división colocar rápidamente el cubreobjetos.
- Calentar suavemente el portaobjetos, sin que llegue a hervir el líquido.
- Aplastar la preparación con un trozo de papel absorbente (o de filtro) de manera tal que el cubreobjeto no se desplace lateralmente sobre el portaobjeto. Para ello pueden aplicarse con presión los dedos índice y mayor de una mano en dos ángulos del cubreobjeto, mientras que con un dedo de la otra mano se efectúa la presión sobre todo el cubreobjeto.
- Sellar.

### **Bandeo C/DAPI fluorescente**

#### **Soluciones para Tratamiento de raicillas para Bandeo C-DAPI, CMA<sub>3</sub>/DAPI fluorescente e Hibridaciones *in situ***

##### **Buffer ácido cítrico-citrato de sodio, pH 4,8.**

- Solución A: 0,1 M ácido cítrico monohidratado. Pesar 0.84 g y disolver en 40 ml de agua destilada estéril.
- Solución B: 0,1 M citrato trisódico bihidratado. Pesar 1,76 g y disolver en 60 ml de agua destilada estéril.

Solución stock (10 x): 40 ml de solución A + 60 ml de solución B.

Solución de trabajo (1 x): diluir la solución stock 1 ml + 9 ml de agua destilada.

### **Solución enzimática de Celulasa/Pectinasa**

Soluciones en tampón ácido cítrico-citrato de sodio.

► Solución A: Celulasa al 2% (p/v).

Pectinasa al 20% (v/v).

- Mezclar 1,6 g de Celulasa + 16 ml de Pectinasa + 64 ml de buffer Ácido Cítrico-Citrato de Sodio, pH 4,8 (ver punto anterior).

► Solución B: Celulasa al 2% (p/v) (Ozonuka RS).

Pectinasa al 20% (v/v) (Sigma).

- Mezclar 0,4 g de Celulasa Onozuka RS + 4 ml de Pectinasa + 16 ml de buffer Ácido Cítrico-Citrato de Sodio, pH 4,8 (ver punto anterior).

Solución de trabajo:

- Unir 4 partes de sol. A + 1 parte de sol. B.
- Mezclar agitando con agitador magnético.
- Alicuotar y guardar en microtubos tipo “eppendorf” a -20° C.

### **Ba (OH)<sub>2</sub>**

Se utiliza una solución al 5% sobresaturada, diluida en agua destilada.

Preparación de 150 ml de Ba (OH)<sub>2</sub>.

- Pesar 9 gr de Ba (OH)<sub>2</sub>.
- Disolver en 150 ml de agua destilada estéril.
- Mezclar la solución agitando en agitador magnético.
- Filtrar en un vaso coplin, cuidando que no se forme una película de CO<sub>4</sub>Ba.
- Enrasar la superficie de la solución con cuidado.
- Taparlo hasta usarlo.

### **Buffer 20 x SSC (solución stock)**

- Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- Ajustar a pH 7 con gotas de solución 10 M de NaOH.
- Llevar el volumen a 1 litro con agua destilada.
- Fraccionar en alicuotas y esterilizarlas por autoclavado.

**Buffer 2 x SSC:** (para vaso coplin de 100 ml):

- En una probeta de 100 ml colocar 10 ml de 20 x SSC y llevar a volumen.

**DAPI 4'6'diamidino-2-phenylindole.2HCL.**

Solución stock: 0.2 mg en 1 ml de agua bidestilada (0.2 mg/ml).

Solución colorante: (0,001 mg/ml)

- Se diluyen 25 µl de la solución stock

Conservar las soluciones en el freezer a -20 °C y siempre en oscuridad.

### **Cubreobjetos de plásticos**

- Se corta papel de acetato con las dimensiones de un cubreobjeto de 24 x 50 mm.

Los cubreobjetos de plástico o acetato son más blandos y se pueden manejar con mayor facilidad evitando la formación de burbujas de aire, además entre lavado y lavado se pueden eliminar fácilmente.

### **Bandeo CMA<sub>3</sub>/DAPI fluorescente**

#### **Buffer Mc Ilvaine: (pH 7)**

► Solución A: 0.1 M ácido cítrico monohidratado: 2.101g/100 ml. PM=210.1

► Solución B: Elegir:

- |   |                |
|---|----------------|
| • 28.4 g PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>                       | PM= 141.96   ó |
| • 35.6 g PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O  | PM= 177.96   ó |
| • 71.6 g PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> . 12 H <sub>2</sub> O | PM= 357.80     |

en 1000 ml de agua bidestilada.

► Mezclar en el momento de usar:

- 8.8 ml de la Solución A + 41.2 ml Solución B   ó
- 17.6 ml de la Solución A + 82.4 ml Solución B.

### **CMA**

Cromomicina A<sub>3</sub>.

► Solución colorante: 0.6 mg/ml en Buffer B\*

Preparación:

- 10 mg CMA + (1:1 Mc Ilvaine diluido) \*\*

**\* Buffer B**

Buffer Mc Ilvaine con 10 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- 1M de  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  PM= 202.80
- 5.07g/25 ml de agua destilada
- Calentar durante 2-3 minutos hasta que hierva.
- Conservar a 40C.

**\*\*** 10 ml Mc Ilvaine + 10 ml agua bidestilada + 0.1 ml  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1M.

- Poner la CMA en un erlenmeyer pequeño forrado con papel de aluminio, agregar el buffer diluido con cuidado de NO AGITAR.
- Guardarlo en la heladera sin moverlo mucho.
- Dejarlo estacionar como mínimo una semana antes de usar.

**Medio de montaje:** glicerina : McIlvaine (pH 7) con  $\text{Cl}_2 \text{Mg} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

- 1 parte de glicerol (25 ml) + 1 parte de buffer Mc Ilvaine (25 ml) con 1M de  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (125  $\mu\text{l}$ ).
- Guardar en un erlenmeyer y usar con pipeta pasteur.

#### **II.4. Estudios de Citogenética molecular**

**Obtención de las sondas: Extracción de ADNg total:**

Protocolo de extracción según Dellaporta et al. (1983):

#### **EDTA (0,5 M, pH 8.0)**

Peso molecular: 372,24 gr

- Disolver 186,1 gr de EDTA dihidratado ( $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 800 ml de agua destilada.
- Agitar vigorosamente con agitador magnético.
- Ajustar el pH a 8.0 con perlas de NaOH. El EDTA no se disuelve completamente hasta que el pH no se ajustó a 8.0.
- Completar con agua destilada estéril hasta un volumen 1000 ml.
- Separar en alícuotas, esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente.

**Tris-CIH 1Mv**

Peso molecular: 121,1 gr/mol

• Disolver 121,1 gr de Trisma base en 800 ml de agua destilada. Si la solución 1M tiene color amarillo se debe descartar.

- Ajustar el pH al valor deseado agregando CIH concentrado según la tabla

pH	CIH
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml
8.5	20-25 ml

- Se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente antes de realizar los últimos ajustes de pH.
- Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
- Separar en alícuotas y esterilizar en autoclave.

El pH de las soluciones de Tris son temperaturas dependientes y disminuyen aproximadamente 0.03 unidades de pH con cada incremento de 1°C de temperatura.

**Buffer de extracción:** [Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), EDTA 50 mM (pH 8), NaCl 500 mM, SDS 2% y Polivinilpirrolidona (PVP)1% PM 360.000].

**Preparación:**

- En una probeta de 500 ml agregar:
  - 2 gr de SDS.
  - 5 gr de PVP.
  - 50 ml de EDTA 0,5 M (pH 8).
  - 50 ml de Tris-HCl 1 M (pH 7,5).
  - 50 ml de ClNa 5 M.
- Llevar a volumen de 500 ml con agua destilada.

**Polivinilpirrolidona (PVP)1%**

Peso molecular: 360.000

- Pesar 5 gr de PVP.



**ClNa 1M: Solución stock**

Peso molecular: 58,44gr/mol

- Pesar 58.44 gr de ClNa.
- Disolverlos en 800 ml de agua destilada.
- Ajustar el volumen a 1000 ml.
- Alicuotar y esterilizar en autoclave.

**Acetato de potasio (AcK)**

Peso molecular: 98,15 gr

Para preparar 100 ml de AcK:

- Disolver 49,01 gr de AcK en 75 ml de agua ultra pura.
- Ajustar el pH a 6,5.
- Llevar a volumen de 100 ml con agua ultra pura.

**Buffer TE pH 8 [Tris-HCl 10 mM (pH 8) y EDTA 1 mM (pH 8)]**

Para preparar 200 ml:

- Mezclar 2 ml sol. stock Tris - ClH 1M, pH 8.0 con 0.4 ml sol. stock EDTA 0,5M, pH 8.0 en 198,6 ml de agua destilada.
- Autoclavar y guardar a 4°C.

**ARNasa A (10 mg/ml)**

- Disolver 100 mg de ARNasa A en 10 ml de Tris 10 mM (pH 7,5) y ClNa 15 mM.
- Calentar a ebullición en baño María durante 15 minutos.
- Dejar enfriar lentamente a temperatura ambiente.
- Alicuotar y conservar a -20 °C.

**ClNa 5M**

Para preparar 100 ml:

- Pesar 29,22 gr de solución stock ClNa.
- Llevar a volumen de 100 ml con agua destilada.
- Conservar en la heladera.

**Agua ultra pura**

- Agua destilada autoclavada y conservada en la heladera en botella de vidrio.

**Cuantificación del ADN en gel de agarosa**

**Buffer TAE (50 x)** (400 mM Tris; 50 mM NaOAc; 7,7 mM EDTA).

Solución stock: 1 litro

Tris Base (PM=121, 10)	242 gr
0,5 M EDTA pH 8	100 ml
Ácido acético glacial	57,1 ml
H <sub>2</sub> O ultra pura	a volumen

- Disolver en agua destilada: 242 gr de Tris base y 37,2 gr de EDTA disódico dihidratado en 900 ml de agua deionizada.
- Agregar 57,1 ml de Ácido acético glacial y llevar hasta un volumen de 1000 ml con agua deionizada.
- Ajustar el pH a 8.3 con ClH.
- Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

**Buffer TAE (10 X)**

Tris 0.04M-----48.4 gr

EDTA disódico 0.001M-----3.722 gr

Ácido Acético-----11.4 ml

Se lleva a 1 litro con agua destilada, pH 8.3.

- Disolver en agua destilada: 48.4 gr de Tris-HCl (0.04M), 3.722 gr de EDTA disódico (0.001M) y 11.4 ml de Ácido Acético Glacial.
- Llevar hasta un volumen de 1000 ml con agua destilada y ajustar el pH a 8.3 con ClH.
- Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

**Buffer TAE (1 x)**

En una probeta de 1000 ml colocar: 20 ml de TAE 50x y llevar a volumen con agua destilada.

- Mezclar 10 mM Tris-ClH pH 8.0 con 1 mM EDTA pH 8.0.
- Para preparar 200 ml mezclar: 2 ml sol. stock Tris-ClH 1M, pH 8.0 + 0,4 ml sol. stock EDTA 0,5M, pH 8.0 y 198.6 ml de agua destilada.
- Autoclavar y guardar a 4°C.

### GelRed™

#### GelRed Nuclei Acid Gel Stain, 10,000x en agua (Biotium)

- Diluir la solución stock de GelRed® 10,000x, en agua destilada 3,300 veces, para obtener una solución de tinción 3x.
- Alicuotar en microtubos de 1.5 ml.
- Conservar a temperatura ambiente.

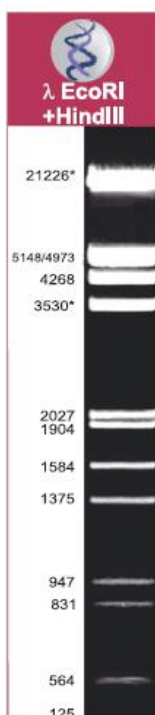
### Buffer de siembra

- Mezclar Azul bromofenol (0.25 %) con Sacarosa 40 % (p/v) diluida en agua.
- Guardar a 4°C.

**Marcador de peso molecular utilizado:** ambos de PB-L. Productos Bio-Lógicos®

\*  $\lambda$  EcoRI+HindIII Marker

\* Ladder 100 pb precision Marker



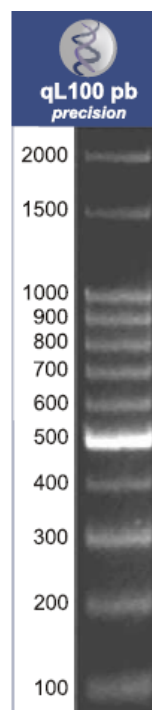
Condiciones de uso según fabricante:

Siembra: 5  $\mu$ l.

Gel de agarosa: 0.8 %

Corrida: 1 hora a 90 V

Buffer de corrida: TAE 1x



**SDS 10%**

- Disolver 100 gr de SDS (Sodio Dodecil Sulfato) (Sigma) en 900 ml de agua destilada estéril.
- Calentar hasta 68°C para ayudar a disolver.
- Ajustar el pH a 7.2 agregando de unas gotas de HCl concentrado.
- Llevar hasta un volumen de 1000 ml con agua destilada estéril.
- Separar en alícuotas y guardar a temperatura ambiente.
- No autoclavar.

**SDS 2%**

Para 500 ml:

- Pesar 10 gr de SDS.

**Para estudios de FISH**

***Obtención de sondas ribosomales 5S y 45S de Trigo c.v. SRM2330 Sursem:***

**Amplificación de las sondas por PCR:**

Mezcla para PCR:

Buffer	(10 x)
MgCl <sub>2</sub>	(15 mM)
dNTPs	(10 mM)
5Sright	(20 µM)
5S left	(20 µM)
Taq	(1U/µl)
ADN	(20 ng/µl)
H <sub>2</sub> O	

**Cuantificación de la sonda en gel de agarosa:****Gel de agarosa al 0.8% en Buffer TAE 1x**

En una probeta de 500 ml, se agregan 180 ml de agua destilada y 20 ml de TAE 1x.

**Marcado de las sondas**

*Kit de marcación de la sonda con BioNick™ Labelling System*

**Componentes:**

10 x dNTP	0.2 mM each dCTP, dGTP, dTTP
Mix	0.1 mM dATP
	0.1 mM biotin-14-dATP
	500 mM Tris-HCl (pH 7.8)
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	100 mM $\beta$ -mercaptoethanol
	100 $\mu$ g/ml nuclease-free BSA
10 x Enzima	0.5 U/ $\mu$ l DNA Polymerase I
Mix	0.007 U/ $\mu$ l DNase I
	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	5 mM magnesium chloride
	0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride
	50% (v/v) glycerol
	100 $\mu$ g/ml nuclease-free BSA
AND Control	pBR322, 250 $\mu$ g/ml in
	10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
	0.1 mM EDTA, 5 mM NaCl
Stop Buffer	0.5 M EDTA (pH 8.0)
Agua destilada	

#### Kit de marcación de la sonda con DIG-High Prime

##### **Componentes:**

5 x conc. random primer mix:

1U/ $\mu$ l Klenow polimerasa, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG-11-dUTP, álcali, y 5 x buffer estabilizador en 50% (v/v) glicerol.

#### **Estimación del rendimiento de la marcación por *Dot Blot***

**Buffer 1:** 100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 15 mM NaCl.

A partir de Tris-HCl 1M (pH 7,5) y ClNa 5 M

---

**Para 350 ml:**

- En una probeta de 500 ml, colocar 35 ml de Tris-HCl y agregar 10,5 ml ClNa.
- Llevar a volumen con agua destilada.
- Autoclavar.

**Buffer 2:** 0,5 % (w/v) reactivo bloqueante (Roche) en Buffer 1.

- En un vaso de precipitado, se agregan 0,5 gr del reactivo bloqueante en 100 ml de Buffer 1.
- Disolver calentando la solución a 60 °C, con agitador magnético, durante 1 hora.
- Conservar hasta a 4 °C (hasta 1 mes).

**Buffer 3:** 100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>**Para 350 ml:**

- En una probeta de 500 ml, colocar 35 ml de Tris-HCl (pH 9,5), 7 ml ClNa y 17,5 ml de MgCl<sub>2</sub>.
- Llevar a volumen con agua destilada.
- Autoclavar.

**Streptavidin-AP-conjugate:**

Para detección de biotina utilizar dilución 1:1000 (concentración final 0,75 unidades ml<sup>-1</sup>) de anti-biotin conjugado fosfatasa alcalina, en Buffer 1.

**Anti-Digoxigenin-AP-Fab fragments:**

Para detección de digoxigenina utilizar dilución 1:1000 (concentración final 0,75 unidades ml<sup>-1</sup>) de anti-digoxigenina conjugado fosfatasa alcalina, en Buffer 1.

**Agente de detección (*BCIP*<sup>®</sup>/*NBT Sigma FAST*<sup>™</sup>):**

- Disolver 1 tableta de *BCIP*<sup>®</sup>/*NBT* en 10 ml de agua ultra pura. Se trabajó con un tubo Falcon<sup>™</sup> de 15 ml, envuelto en papel aluminio.
- Se conservó en oscuridad.

## Hibridación *in situ*

### ARNasa libre de ADNasa:

Solución stock:

- Disolver la ARNasa A (Sigma) hasta una concentración de 10 mg/ml en acetato de sodio 0,01M pH 5.2.
- Calentar a 100 °C durante 15 minutos.
- Llevar a temperatura ambiente.
- Ajustar el pH a 7.4 agregando 0.1 volúmenes de Tris-CIH 1M.
- Separar en alícuotas y guardar a -20 °C.

La ARNasa precipita cuando las soluciones concentradas se las calienta a 100 °C.

Se utilizan diluciones 1:100 en 2 x SSC a partir de una solución stock (10 mg/ml):

- Por cada preparado se utilizan 2 µl de la solución stock en 198 µl de SSC. Conviene preparar en un tubo tipo “eppendorf” una cantidad ligeramente en exceso sobre el número de preparados a hibridar.

### Paraformaldehído (4%):

- Se pesaron 4 g de paraformaldehído y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.
- Se calentó la solución bajo campana, hasta llegar a 60°C con agitador magnético (aspecto lechoso).
- Se continuó agitando a temperatura ambiente y se agregó 2 ml de NaOH 1M, continuando con la agitación hasta que esté transparente.

### Tris-CIH 1M.

- Disolver 121,1 gr de Trisma base (Sigma) en 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Si la solución 1M tiene color amarillo descartarla.
- Ajustar el pH al valor deseado agregando CIH concentrado según la siguiente tabla:

pH	CIH
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml
8.5	20-25 ml

- Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de hacer el último ajuste de pH.

- Llevar el volumen a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

- Separar en alícuotas y esterilizar en autoclave.

El pH de las soluciones de Tris son temperatura dependiente y decrecen aproximadamente 0,03 unidades de pH con cada incremento de 1 °C de temperatura.

#### **Formamida deionizada al 20% en 0.1 x SSC:**

Para 100 ml de solución:

- En una probeta de 100 ml, colocar 80 ml de 0.1 x SSC.
- Agregar 20 ml de formamida deionizada.

#### **SDS 10%.**

- Disolver 100 gr. de SDS en 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- Calentar a 68 °C para ayudar a que se disuelva.
- Ajustar a pH 7,2 con el agregado de unas gotas de CIH concentrado.
- Ajustar el volumen a 1000 ml y separar en alícuotas.

No se autoclava.

#### **Solución de BSA (albúmina de suero bovino) al 5% (p/v) en 4 x SSC/Tween 20 (0.2%):**

Para 1 preparado:

- Disolver 0,01 gr de BSA (Sigma) en 200 µl de 4 x SSC/Tween 20.
- Mezclar bien con vortex hasta la máxima disolución.
- De esta preparación se utilizan 100 µl en cada preparado.

#### **Para detección visual de los sitios de hibridación**

► Para detectar sondas marcadas con biotina. Se utilizó una solución *Texas Red* o *Streptavidine-Cy3* (Sigma). Se preparó un ligero exceso sobre la cantidad adecuada al número de preparados.

- En un tubo tipo “eppendorf” envuelto en papel aluminio (para no exponerlo a la luz), se colocó 150 µl de BSA al 5% y 0.5 µl de Streptavidin-Cy3 conjugado (cantidad preparada para 3 preparados).



► Para detectar sonda marcadas con digoxigenina. Se utilizó una solución anti-digoxigenina-FITC (*Boehringer Mannheim, Germany*). La solución que se utilizó es 1/40 antidigoxigenina BSA al 5% y se preparó un ligero exceso sobre la cantidad adecuada al número de preparados.

- En un tubo tipo “eppendorf” envuelto en papel aluminio (para no exponerlo a la luz), se colocó 150 µl de BSA al 5% y 3 µl de anti-digoxigenina-FITC (cantidad preparada para 3 preparados).

► Para experiencias de doble hibridación, utilizando sondas marcadas con biotina y digoxigenina:

- En un tubo tipo “eppendorf” envuelto en papel aluminio (para no exponerlo a la luz), se colocó 150 µl de BSA al 5% + 3 µl de anti-digoxigenina-FITC + 0.5 µl de Streptavicin-Cy3 conjugado (cantidad preparada para 3 preparados).

#### **Para contratinción:**

#### **DAPI (4'6'diamidino-2-phenylindole)**

Solución stock: (0.2 mg/ml):

- Disolver 0.2 mg de DAPI (Sigma) en 1 ml de agua bidestilada estéril.

Solución colorante (0.001 mg/ml):

- Diluir 25 µl de la solución stock en 5 ml de tampón McIlvaine.
- Conservar ambas soluciones a 4°C ó a -20°C.

#### **Medio de montaje**

Como medio de montaje, en este trabajo se utilizó: *DABCO* (1,4-diazobizyclo (2,2,2) octane) Antifade, Sigma, Cat. # D2522 Glycerol, 86% Tris-HCl, 1 M pH 8.0

Preparación:

- DABCO 0.233 g
- Tris-HCl, 1M pH 8.0 200 µl
- Agua destilada 800 µl
- Glicerina 86% 9 ml

Procedimiento:

- Se combinaron los componentes y fueron disueltos por calentamiento a 70 °C.
- Con agitador magnético se agitó la solución hasta homogeneizar la mezcla.

- Se alicuotó en tubos tipo “eppendorf” y se conservó a -20 °C.

Una vez usado se guarda en la heladera.

## ANEXO 2

### Índice de Tablas

Tabla 1.....	114
Tabla 2.....	114
Tabla 3.....	120
Tabla 4.....	123
Tabla 5.....	140
Tabla 6.....	140
Tabla 7.....	148
Tabla 8.....	157
Tabla 9.....	174
Tabla 10.....	175
Tabla 11.....	182
Tabla 12.....	307
Tabla 13.....	310

### Índice de Figuras

Figura 1.....	43
Figura 2.....	44
Figura 3.....	45
Figura 4.....	46/47
Figura 5.....	78
Figura 6.....	79
Figura 7.....	115
Figura 8.....	117
Figura 9.....	118
Figura 10.....	119
Figura 11.....	123
Figura 12.....	124
Figura 13.....	124
Figura 14.....	125
Figura 15.....	126
Figura 16.....	127
Figura 17.....	128
Figura 18.....	129
Figura 19.....	131
Figura 20.....	134
Figura 21.....	135
Figura 22.....	136
Figura 23.....	137
Figura 24.....	138
Figura 25.....	139
Figura 26.....	141
Figura 27.....	144
Figura 28.....	145

---

Figura 29.....	146
Figura 30.....	147
Figura 31.....	151
Figura 32.....	152
Figura 33.....	153
Figura 34.....	154
Figura 35.....	157
Figura 36.....	158
Figura 37.....	159
Figura 38.....	160
Figura 39.....	161
Figura 40.....	162
Figura 41.....	163
Figura 42.....	166
Figura 43.....	166
Figura 44.....	167
Figura 45.....	167
Figura 46.....	168
Figura 47.....	168
Figura 48.....	169
Figura 49.....	169
Figura 50.....	170
Figura 51.....	170
Figura 52.....	175
Figura 53.....	176
Figura 54.....	176
Figura 55.....	177
Figura 56.....	177
Figura 57.....	179
Figura 58.....	181
Figura 59.....	184
Figura 60.....	185
Figura 61.....	188
Figura 62.....	189
Figura 63.....	190
Figura 64.....	191
Figura 65.....	193
Figura 66.....	194
Figura 67.....	195
Figura 68.....	196
Figura 69.....	198/199
Figura 70.....	201
Figura 71.....	203/204
Figura 72.....	205/206
Figura 73.....	207
Figura 74.....	208/209
Figura 75.....	210/211

---

Figura 76.....	213/214
Figura 77.....	215
Figura 78.....	294
Figura 79.....	294
Figura 80.....	297
Figura 81.....	298
Figura 82.....	300/301
Figura 83.....	303
Figura 84.....	304
Figura 85.....	306
Figura 86.....	306
Figura 87.....	309
Figura 88.....	311
Figura 89.....	311
Figura 90.....	313
Figura 91.....	314
Figura 92.....	315
Figura 93.....	315
Figura 94.....	316

## ANEXO 3

### Imágenes del material vegetal utilizado



*A. selloanus* (Hack.) Hack.



*A. macrothrix* Trin.



*A. gyrans* Ashe



*Andropogon gayanus*



*Andropogon barrettoi*





*Andropogon exaratus*



*Andropogon glaucophyllus*



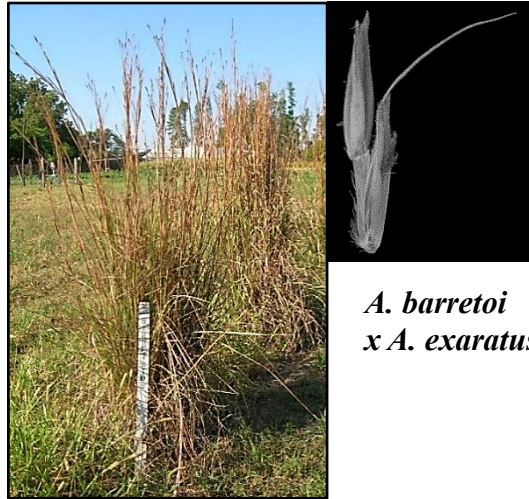






Ilustración: María Irma de las Mercedes Hidalgo