



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**AMPLIACIÓN DE LA BASE GENÉTICA DEL  
GERMOPLASMA TETRAPLOIDE SEXUAL DE *Paspalum  
notatum*: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y  
REPRODUCTIVA DE UNA POBLACIÓN SINTÉTICA**

**Ing. Agr. ALEX LEONEL ZILLI**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGRARIAS**

**DIRECTOR: Dr. Eric Javier Martínez**

**CO- DIRECTOR: Dr. Carlos Alberto Acuña**

**2017**

**AMPLIACIÓN DE LA BASE GENÉTICA DEL GERMOPLASMA TETRAPLOIDE SEXUAL  
DE *Paspalum notatum*: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y REPRODUCTIVA DE UNA  
POBLACIÓN SINTÉTICA**

Alex Leonel Zilli

Ingeniero Agrónomo – Universidad Nacional del Nordeste

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Botánica del Nordeste (CONICET-UNNE), durante el período comprendido entre el 01 de Abril de 2012 y el 30 de Octubre de 2016, bajo la dirección del Ing. Agr. (Dr.) Eric Javier Martínez y co-dirección del Ing. Agr. (MSc., PhD.) Carlos Alberto Acuña.



Ing. Agr. Alex Leonel Zilli



Ing. Agr. (Dr.) Eric Javier Martínez



Ing. Agr. (M.S., Ph.D.) Carlos Alberto Acuña

Defendida: 29 de Marzo de 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría en primer lugar agradecer a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste y a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario que fueron las que permitieron mi formación Académica de grado y posgrado respectivamente. En segundo lugar, a las instituciones que financiaron y/o brindaron sus infraestructuras, equipamiento y personal técnico para que pueda desarrollar el presente trabajo de Tesis Doctoral, entre las cuales se encuentran: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (FCA-UNNE), Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE, CONICET-UNNE), Secretaría General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste (SGCyT-UNNE), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT).

Agradecer a mi director, el Dr. Eric Martínez quien fue mi guía y orientador en la investigación desde mis inicios siendo auxiliar de docencia como alumno de grado, dándome su apoyo y confianza durante tantos años y ayudándome además en lo personal con su respaldo, consejos y experiencia. A mi co-director, el Dr. Carlos Acuña quien desde su regreso de EEUU me ha orientado con su amplia experiencia en lo académico y en la investigación, siendo su contribución de fundamental importancia en el desarrollo este trabajo y en mi formación tanto profesional como personal.

Al Ing. Agr. (Dr.) Camilo Quarín, quien fue mi co-director de Beca Doctoral, y contribuyó de forma constante y considerable con su vasta experiencia en la temática.

Agradecer además a todo el personal docente, no docente, técnicos e investigadores de las Cátedras de Genética y Forrajicultura de la FCA-UNNE, Dr. Mario Urbani, Dra. María Esperanza Sartor, Dr. Francisco Epinoza, Ing. Agr. Florencia Galdeano, Ing. Agr. María de las Mercedes Hidalgo, Lic. Irene Caponio, Sr. Edmundo Barrios, por brindarme su constante apoyo y experiencias durante tantos años.

A mis compañeros de laboratorio, que además de eso son grandes amigos, Dra. Andrea Brugnoli, Dra. Patricia Novo, Ing. Agr. Mara Schedler, Ing. Agr. Florencia Marcón, Lic. Verena Reutemann, por haberme brindado su respaldo, apoyo y predisposición en todo momento.

A los alumnos de grado y varios hoy ya graduados, que no me atrevo a mencionar por miedo a olvidarme de alguno, por haber colaborado en muchas de las actividades tanto de campo como de laboratorio.

Y por último, y para nada menos importante, a mi novia María José Garrido, y a toda mi familia por todo su apoyo, respaldo y confianza durante todos estos años.

A mis padres Graciela y Juan Carlos

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Parte de los resultados descritos en esta Tesis fueron dados a conocer previamente en las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos, simposios, jornadas y reuniones científicas:

### Revistas científicas

**Zilli A.L.**, Brugnoli E.A., Marcón F., Billa M.B., Rios E.F., Quarín C.L., Martínez E.J., Acuña C.A. 2015. Heterosis and expressivity of apospory in tetraploid Bahiagrass hybrids. *Crop Science* 55: 1189-1201.

### Congresos

**Zilli A.L.**, Barone J.O., Rios E.F., Quarín C.L., Acuña C.A., Martínez E.J. 2012. Ampliación de la base genética en el germoplasma tetraploide sexual de *Paspalum notatum*. XV Congreso Latinoamericano de Genética, XLI Congreso Argentino de Genética, XLV Congreso de la Sociedad Genética de Chile, II Reunión Regional SAG-Litoral. Rosario, Santa Fe, Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics* Vol. XXIII (Supl.1). Pág. 234. ISSN: BAG 1666-0390.

**Zilli A.L.**, Rios E.F., Quarín C.L., Martínez E.J. 2013. Obtención de una población tetraploide sexual sintética de *Paspalum notatum*. XLII Congreso Argentino de Genética y III Reunión SAG-NOA. Salta, Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics* Vol. XXIV (Supl.1). Pág. 166. ISSN: BAG 1666-0390.

**Zilli A.L.**, Acuña C.A., Quarín C.L., Martínez E.J. 2014. Variabilidad genética de una población tetraploide sexual sintética de *Paspalum notatum*. XLIII Congreso Argentino de Genética, IV Reunión Regional SAG La Pampa Patagonia. S.C. de Bariloche, Rio Negro. *Journal of Basic & Applied Genetics* Vol. XXV (Supl.1). Pág. 209. ISSN: BAG 1666-0390.

Marcón F., **Zilli A.L.**, Brugnoli E.A., Ferrari Usandizaga S.C., Martínez E.J., Acuña C.A. 2014. Niveles de expresión de la apomixis en híbridos tetraploides de *Paspalum notatum*. XLIII Congreso Argentino de Genética, IV Reunión Regional SAG La Pampa Patagonia. S.C.

de Bariloche, Rio Negro. Journal of Basic & Applied Genetics Vol. XXV (Suppl.1). Pág. 210. ISSN: BAG 1666-0390.

**Zilli A.L.**, Guidalevich V., Schulz R.R., Quarin C.L., Acuña C.A., Martínez E.J. 2014. Caracterización reproductiva de una población tetraploide sexual sintética de *Paspalum notatum*. XLIII Congreso Argentino de Genética, IV Reunión Regional SAG La Pampa Patagonia. S.C. de Bariloche, Rio Negro. Journal of Basic & Applied Genetics Vol. XXV (Suppl.1). Pág. 211. ISSN: BAG 1666-0390.

**Zilli A.L.**, V. Guidalevich, Schulz R.R., Acuña C.A., Martínez E.J. 2015. Fertilidad de una población tetraploide sexual sintética de *Paspalum notatum*. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Buenos Aires. Journal of Basic & Applied Genetics Vol. XXVI (Suppl.1). Pág. 188. ISSN: BAG 1666-0390.

Schulz R.R., **Zilli A.L.**, Acuña C.A., Martínez E.J. 2015. Hibridación y segregación de la apomixis en un test cross de *Paspalum notatum*. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Buenos Aires. Journal of Basic & Applied Genetics Vol. XXVI (Suppl.1). Pág. 189. ISSN: BAG 1666-0390.

### **Presentaciones en Jornadas, Seminarios, Simposios y Reuniones Científicas**

**Zilli A.L.**, Barone J.O., Rios E.F., Acuña C.A., Martínez E.J. 2012. Obtención de variabilidad genética en los tetraploides sexuales de *Paspalum notatum* a partir de los ecotipos tetraploides apomícticos. Reuniones de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE 2012 (Área: Agronomía). Corrientes, Argentina. 27 al 29 de junio de 2012. CA009. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2012/agrarias.php>.

**Zilli A.L.**, Barone J.O., Rios E.F., Quarin C.L., Acuña C.A., Martínez E.J. 2012. Obtención de variabilidad genética en los tetraploides sexuales de *Paspalum notatum* a partir de los ecotipos tetraploides apomícticos. III Ciclo de seminarios sobre el avance en la caracterización genética y molecular de la apomixis en gramíneas forrajeras. Escuela de Postgrado FCA-UNR. Zavalla, Santa Fe. 25 y 27 de octubre de 2012. Revista Ciencias Agronómicas N° XX 12/2012. Pág. 59. ISSN 1853-4333.

**Zilli A.L.**, Barone J.O., Rios E.F., Acuña C.A., Martínez E.J. 2012. Obtención de variabilidad genética en los tetraploides sexuales de *Paspalum notatum* a partir de los ecotipos

tetraploides apomícticos. XX Jornada de Jóvenes Investigadores. Curitiba, Brasil, 3, 4 y 5 de octubre de 2012.

**Zilli A.L.**, Acuña C.A., Martínez E.J. 2013. Clasificación reproductiva de familias híbridas (F1) y generación de una población sexual sintética en *Paspalum notatum*. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE 2013 (Área: Agronomía). Resistencia, Chaco, Argentina. CA020.

<http://www.unne.edu.ar/trabajando/com2013/index.php>

Guidalevich V., **Zilli A.L.**, Martínez E.J. 2015. Caracterización reproductiva de una población tetraploide sexual sintética de *Paspalum notatum*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE 2015 (Área: Ciencias Agropecuarias). Corrientes, Argentina. CA01. <http://www.unne.edu.ar/trabajando/com2015/agropecuarias.php>

**Zilli A.L.**, Brugnoli E.A., Marcón F., Martínez E.J., Acuña C.A. 2015. Is it possible to generate fast germinating and productive apomictic bahiagrass hybrids? 5th International Symposium of Forage Breeding. 19 al 21 de Octubre de 2015. Buenos Aires, Argentina.

## **OTRAS PUBLICACIONES DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS**

### **Revistas científicas**

**Zilli A.L.**, Brugnoli E.A., Hojsgaard D.H., Acuña C.A., Quarín C.L., Martínez E.J. 2014. Genetic relationship among *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris*: taxonomic and evolutionary implications. *Flora* 209: 604-612.

Brugnoli E.A., Urbani M.H., Quarín C.L., **Zilli A.L.**, Martínez E.J., Acuña C.A. 2014. Diversity in apomictic populations of *Paspalum simplex* Morong. *Crop Science* 54: 1656-1664.

Ferrari Usandizaga S.C., Brugnoli E.A., **Zilli A.L.**, Acuña C.A., Pagano E.M., Martínez E.J. 2015. Genetic and morphological characterization of *Acroceras macrum* Stapf. *Grass and Forage Science* 70: 695-704.

## Congresos

Ferrari Usandizaga S.C., Schedler M., Brugnoli E.A., **Zilli A.L.**, Martínez E.J., Acuña C.A. 2013. Diversidad genética en *Acroceras macrum* Stapf. XLII Congreso Argentino de Genética y III Reunión SAG-NOA. Salta, Argentina, 20 al 23 de octubre de 2013. Journal of BASIC & APLLIED GENETICS Vol. XXIV (Suppl.1). Pág. 162. ISSN: BAG 1666-0390.

Schedler M., Ferrari Usandizaga S.C., Brugnoli E.A., **Zilli A.L.**, Weiss A.I., Acuña C.A., Martínez E.J. 2013. Sistema de polinización, fertilidad e hibridación en *Acroceras macrum* Stapf. XLII Congreso Argentino de Genética y III Reunión SAG-NOA. Salta, Argentina. Journal of BASIC & APLLIED GENETICS Vol. XXIV (Suppl.1). Pág. 161. ISSN: BAG 1666-0390.

Marcón F., **Zilli A.L.**, Brugnoli E.A., Ferrari S.C., Martínez E.J., Acuña C.A. 2014. Niveles de expresión de la apomixis en híbridos tetraploides de *Paspalum notatum*. XLIII Congreso Argentino de Genética, IV Reunión Regional SAG La Pampa Patagonia. S.C. de Bariloche, Rio Negro. Journal of BASIC & APLLIED GENETICS Vol. XXV (Suppl.1). Pág. 210. ISSN: BAG 1666-0390.

Schedler M., **Zilli A.L.**, Acuña C.A., Honfi A.I., Martínez E.J. 2014. Niveles de ploidía en poblaciones naturales de especies sexuales y apomícticas del género *Paspalum*. XLIII Congreso Argentino de Genética, IV Reunión Regional SAG La Pampa Patagonia. S.C. de Bariloche, Rio Negro. Journal of BASIC & APLLIED GENETICS Vol. XXV (Suppl.1) Pág. 246. ISSN: BAG 1666-0390.

## Presentaciones en Reuniones Científicas

Brugnoli E.A., Zilli A.L., Acuña C.A. 2014. Domesticación de una especie forrajera nativa: evaluación molecular, morfológica y nutricional de ecotipos de *Paspalum simplex*. Argentina. Resistencia-Chaco. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE 2014. CA051.  
<http://www.unne.edu.ar/trabajando/com2014/agropecuarias.php>



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	i
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS .....	iii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS .....	xi
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1
1. Potencial impacto de las especies forrajeras en la producción ganadera del norte de Argentina .....	1
2. El género <i>Paspalum</i> .....	2
3. <i>Paspalum notatum</i> .....	3
4. Mejoramiento genético en <i>Paspalum notatum</i> tetraploide.....	6
OBJETIVOS .....	9
Objetivo general:.....	9
Objetivos específicos: .....	9
CAPITULO I .....	10
I.1 INTRODUCCIÓN.....	10
I.1.1 La apomixis en <i>Paspalum notatum</i> .....	10
I.1.2 Mejoramiento en especies forrajeras apomícticas .....	13
I.2 HIPÓTESIS .....	16
I.3 OBJETIVOS .....	17
I.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
I.4.1 Material Vegetal .....	18
I.4.2 Cruzamientos y obtención de las progenies F <sub>1</sub> .....	20
I.4.3 Determinación del origen híbrido de las progenies .....	21
I.4.3.1 Obtención del ADN.....	22
I.4.3.2 Amplificaciones por PCR y detección de los marcadores.....	22
I.4.4 Determinación del modo de reproducción.....	23

I.4.4.1 Análisis molecular.....	24
I.4.4.2 Análisis citoembriológico .....	24
I.4.5 Análisis de la segregación por modo de reproducción .....	26
I.4.6 Obtención de la Población Tetraploide Sintética Sexual .....	26
I.4.7 Determinación del modo de reproducción de la PTSS.....	27
I.4.7.1 Determinación por medio de marcadores moleculares.....	27
I.4.7.2 Determinación por análisis citoembriológico.....	28
I.4.8 Determinación del nivel de ploidía de la PTSS .....	28
I.5 RESULTADOS .....	30
I.5.1 Cruzamientos y obtención de las progenies $F_1$ .....	30
I.5.2 Origen híbrido de las progenies .....	31
I.5.3. Clasificación reproductiva de las progenies $F_1$ s .....	32
I.5.3.1 Análisis molecular.....	32
I.5.3.2 Análisis citoembriológico .....	34
I.5.4 Segregación por modo de reproducción en familias $F_1$ s .....	36
I.5.5 Población tetraploide sintética sexual .....	37
I.5.5.1 Obtención de la PTSS .....	37
I.5.5.2 Determinación del modo de reproducción de la PTSS .....	39
I.5.5.3 Determinación del nivel de ploidía de la PTSS .....	41
I.6 DISCUSIÓN .....	43
I.6.1 Eficiencia en la hibridación.....	43
I.6.2 Segregación por el modo de reproducción en progenies $F_1$ .....	44
I.6.3 Obtención de la población tetraploide sintética sexual.....	48
I.7 CONCLUSIONES.....	50
CAPÍTULO II .....	51
II.1 INTRODUCCIÓN.....	51
II.1.1 Variabilidad genética en poblaciones apomícticas .....	51
II.1.2 Fertilidad .....	54

II.2 HIPÓTESIS .....	58
II.3 OBJETIVOS .....	59
II.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	60
II.4.1 Material vegetal.....	60
II.4.1.1 Material vegetal para análisis de la variabilidad molecular .....	60
II.4.1.2 Material vegetal para análisis de la variabilidad morfo-agronómica.....	60
II.4.1.3. Material vegetal para evaluación de la fertilidad .....	60
II.4.2 Análisis de la variabilidad molecular .....	61
II.4.3 Análisis de la variabilidad morfo-agronómica .....	62
II.4.4 Evaluación del grado de fertilidad .....	63
II.4.5 Análisis estadístico .....	64
II.4.5.1 Variabilidad molecular .....	64
II.4.5.2 Variabilidad morfo-agronómica.....	64
II.4.5.3. Producción de semillas.....	65
II.5 RESULTADOS .....	66
II.5.1 Variabilidad molecular.....	66
II.5.2 Variabilidad morfo-agronómica .....	71
II.5.3 Análisis de la producción de semillas.....	82
II.6. DISCUSIÓN .....	86
II.6.1 Variabilidad molecular.....	86
II.6.2 Variabilidad morfo-agronómica .....	90
III.6.3 Fertilidad .....	95
II.7 CONCLUSIONES.....	101
CAPITULO III .....	103
III.1. INTRODUCCIÓN.....	103
III.2 HIPÓTESIS .....	107
III.3 OBJETIVOS .....	108
III.4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	109

III.4.1 Material vegetal.....	109
III.4.2 Cruzamientos entre genotipos de la PTSS y cultivares apomícticos.....	109
III.4.3 Determinación del origen híbrido de las progenies de los cruzamientos PTSS x cvs. apomícticos.....	111
III.4.4 Análisis de segregación del modo de reproducción en híbridos de PTSS x cvs. apomícticos.....	112
III.4.5 Determinación del nivel de expresión de la apomixis en híbridos apomícticos de PTSS x cvs. apomícticos .....	113
III.5 RESULTADOS .....	114
III.5.1 Cruzamientos por el cv. Boyero UNNE .....	114
III.5.2 Cruzamientos por el cv. Argentine .....	116
III.5.3 Segregación del modo de reproducción en híbridos entre genotipos de la PTSS x cvs. apomícticos .....	117
III.5.3.1 Familias de PTSS x cv. Boyero UNNE .....	117
III.5.3.2 Familias de PTSS x cv. Argentine .....	119
III.5.4 Nivel de expresión de la apomixis en híbridos apomícticos .....	120
III.5.4.1 Híbridos apomícticos de PTSS x cv. Boyero UNNE .....	122
III.5.4.2 Híbridos apomícticos de PTSS x cv. Argentine .....	125
III.6 DISCUSIÓN .....	130
III.6.1 Segregación del modo de reproducción en cruzamientos de prueba.....	130
III.6.2 Expresividad de la apomixis.....	133
III.7 CONCLUSIONES.....	137
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139
BIBLIOGRAFÍA .....	141
ANEXO.....	157

## **ABREVIATURAS Y SIMBOLOS**

**%:** Por ciento

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**A. hoja:** Ancho de hoja

**A. inflo.:** Altura del eje floral

**AFLP:** Amplified fragment length polymorphism

**BM:** Bandas monomórficas

**BP:** Bandas polimórficas

**BT:** Bandas totales

**°C:** Grados Celsius

**cm:** Centímetros

**CTAB:** Cetyltrimethylammonium bromide

**cv.:** Cultivar

**cvs.:** Cultivares

**CV:** Coeficiente de variación

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DIC:** Differential interference contrast

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato

**EDTA:** Ácido etilendiamino-tetracético

**FAA:** Formaldehido – Ácido acético – Alcohol Etanol

**F<sub>1</sub>:** Primera filial de un cruzamiento

**F<sub>2</sub>:** Segunda filial de un cruzamiento

**g:** gramos

**GTAN:** Genotipos tetraploides apomícticos naturales

**GTSE:** Genotipos tetraploides sexuales experimentales

**H<sup>2</sup>:** Heredabilidad en sentido amplio

**ha:** Hectárea

**h:** hora

**HCl:** Ácido clorhídrico

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Agua oxigenada

**IBONE:** Instituto de Botánica del Nordeste

**ISSR:** Inter simple sequence repeat

**Kg:** Kilogramo

**Kg/ha:** Kilogramos por hectárea

**M:** Molar

**m:** metro

**min:** minuto

**ml:** mililitro

**mm:** milímetro

**mM:** milimolar

**MS:** Materia seca

**MS visual:** Estimación visual de producción de materia seca

**ng:** nanogramos

**ng/ml:** nanogramos por mililitro

**ng/μl:** nanogramos por microlitro

**NaCl:** Cloruro de sodio

**l:** litro

**L. racimo:** Longitud del racimo

**pb:** pares de bases

**PCR:** Polymerase chain reaction

**pH:** potencial de hidrógeno

**PIC:** Polymorphic information content

**PLP:** Porcentaje de *loci* polimórficos

**PTSS:** Población tetraploide sintética sexual

**p/v:** peso sobre volumen

**RAPD:** Random amplified polymorphic DNA

**Reb. Inv.:** Rebrote acumulado durante el invierno

**RFLP:** Restriction fragment length polymorphism

**rpm:** revoluciones por minuto

**SEA:** Saco embrionario apospórico

**Seg.:** Segundos

**SEM:** Saco embrionario meiótico

**SEab:** Saco embrionario abortado o inmaduro

**SSR:** Simple sequence repeat

**TAE:** Tris-ácido acético-EDTA

**Taq polimerasa:** Enzima polimerizante del ADN

**TBE:** Tris-ácido bórico-EDTA

**TE:** Tris-EDTA

**Tol. Frío:** Tolerancia al frío

**Tris:** N-Tris-(hidoximetil)-aminoetano

**U/μl:** Unidades internacionales por microlitro

**μg:** microgramos

**μg/μl:** microgramos por microlitro

**μl:** microlitro

**μm:** micrometro

**μM:** micromolar

**V:** Voltios

**vs:** Versus

**v/v:** volumen sobre volumen



## RESUMEN

*Paspalum notatum* Flüggé es una gramínea rizomatosa perenne, nativa del continente Americano y particularmente predominante en los campos de pastoreo del sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y nordeste de Argentina. Es una forrajera bien adaptada al clima subtropical y a los sistemas de pastoreo continuo. La especie presenta citotipos diploides ( $2n=2x=20$ ) alógamos y de reproducción sexual, y citotipos tetraploides ( $2n=4x=40$ ) apomícticos yseudógamos. Unos pocos individuos tetraploides sexuales experimentales fueron generados por duplicación cromosómica de diploides naturales. Sin embargo, la obtención de estos individuos tetraploides artificiales es un proceso laborioso y poco eficiente, además, las plantas obtenidas por este método presentan escaso vigor y fertilidad y en algunos casos resultan apomícticos facultativos. Es por ello que el germoplasma tetraploide sexual de *P. notatum* se encuentra acotado a unos pocos individuos, con una base genética muy estrecha, lo que restringe su uso en programas de mejoramiento.

La variabilidad existente en *P. notatum* se encuentra presente en los tetraploides apomícticos que poseen una amplia distribución geográfica en todo el continente americano y una gran variación fenotípica. Una muestra representativa de esa variabilidad se halla depositada en el Banco de Germoplasma del IBONE. Esta variabilidad presente en los apomícticos puede ser transferida al germoplasma tetraploide sexual, mediante cruzamientos intra-específicos entre los pocos genotipos 4x sexuales existentes y varios genotipos apomícticos naturales, de tal manera de generar luego una población sexual con una base genética más amplia.

El objetivo de este trabajo fue la ampliación del pool génico del germoplasma tetraploide sexual de *P. notatum*, a partir de la obtención de híbridos tetraploides sexuales, y su posterior uso para generar una población tetraploide sexual sintética con caracterización genética y reproductiva.

Se obtuvo un total de 12 familias  $F_1$ , a partir de cruzamientos controlados entre 3 genotipos tetraploides sexuales experimentales (GTSE) y 10 genotipos tetraploides apomícticos naturales (GTAN). Se confirmó el origen híbrido de una muestra representativa de cada progenie, a partir de un test de paternidad con marcadores moleculares. Se determinó el modo de reproducción de todas las progenies híbridas, mediante marcadores moleculares ligados a la aposporia y posterior corroboración por métodos citoembriológicos. Todas las progenies resultaron ser de origen híbrido, con excepción de dos plantas que fueron

producto de autofecundación de la madre. El modo de reproducción en las familias mostró un rango de segregación entre sexuales:apomícticos de 1:1 a 8,6:1 ( $\bar{x}= 3,4:1$ ). Se observaron proporciones muy similares en aquellas familias que compartían el mismo padre apomíctico, lo que sugiere una influencia paterna en las proporciones esperables entre sexuales y apomícticos.

Un total de 29 híbridos  $F_1$  sexuales, provenientes de 10 familias, fueron intercruzados para generar una Población Tetraploide Sintética Sexual (PTSS) de 306 individuos. La PTSS fue caracterizada desde el punto de vista citológico, reproductivo, fertilidad, variabilidad molecular y morfo-agronómica. Se comprobó que los individuos de la PTSS son tetraploides ( $2n=4x=40$ ) y se reproducen exclusivamente en forma sexual. La fertilidad medida a partir de la producción de semillas en autopolinización forzada y polinización abierta demostró que la PTSS se comporta como alógama, aunque con niveles variables de autogamia. Se observaron niveles variables de fertilidad entre los individuos de la PTSS, aunque en promedio con valores similares a los obtenidos en los GTSE y los diploides. El análisis de la variabilidad molecular, evaluada con marcadores de SSR, y la morfo-agronómica a partir de 9 caracteres, demostró que la PTSS posee una variabilidad similar a la observada en los GTAN y considerablemente superior a los GTSE. Esto demuestra que se logró transferir la variabilidad presente en los GTAN a la PTSS, ampliando el pool génico del germoplasma tetraploide sexual de la especie.

Se generaron familias híbridas entre individuos de la PTSS y dos cultivares apomícticos de *P. notatum*. Se determinó la segregación por el modo de reproducción, mediante marcadores moleculares 100% ligados a la aposporia. A su vez, se estimaron los niveles de expresividad de la aposporia en los híbridos apomícticos, a partir de la observación de sacos embrionarios maduros. Se obtuvieron 22 familias, a partir de cruzamientos entre 11 individuos de la PTSS y los cvs. Argentine y Boyero UNNE. El modo de reproducción mostró un rango de segregación entre sexuales:apomícticos de 1:0 a 1,3:1 ( $\bar{x}= 3,5:1$ ) y 1:0 a 1,5:1 ( $\bar{x}= 4:1$ ) para las familias del cv. Argentine y cv. Boyero, respectivamente. La expresividad de la aposporia fue estimada en 55 y 28 híbridos apomícticos provenientes de los cruzamientos por cv. Argentine y Boyero UNNE, respectivamente. Los niveles de expresividad de la aposporia en los híbridos apomícticos mostraron un rango de 12,5-97% (CV= 33,6%) y 3,0-100% (CV= 53,1%) para el cv. Argentine y Boyero UNNE, respectivamente. Se observó una alta proporción de híbridos apomícticos con niveles de expresividad superiores al 80%, los cuales podrán ser evaluados como potenciales nuevos cultivares.

## ABSTRACT

### **Widening the Gene Pool of the Sexual Tetraploid Germplasm of *Paspalum notatum*: Genetic and Reproductive Characterization of a Sexual Synthetic Tetraploid Population**

*Paspalum notatum* Flüggé is a warm-season perennial grass, native from the New world, growing from north of Mexico to centre of Argentina. The species presents two different cytotypes, the diploid race ( $2n=2x=20$ ) which is sexual and cross-pollinated, inhabits in a very narrow area on northeast of Argentina. The tetraploid race ( $2n=4x=40$ ), is the predominant cytotype, and reproduces by pseudogamous apomixis. Some experimental sexual tetraploid plants have been generated through chromosome doubling. However, these artificial tetraploids are difficult to obtain and plants generated by this method tend to exhibit low vigor and fertility, and some of them reproduce by facultative apomixis. Therefore, the sexual tetraploid germplasm available is restricted to a few plants with a very narrow genetic pool. The objective of this thesis was to transfer the genetic variability from a highly diverse apomictic tetraploid germplasm to the sexual tetraploid germplasm. A total of 12 hybrid families, segregating for mode of reproduction, were generated crossing 10 naturally occurring apomictic tetraploids (NATG) with three experimental sexual tetraploid genotypes (ESTG). The mode of reproduction segregated in a distorted way in almost all families with the exception of family E in which the proportion sex:apo was equivalent. The results suggest that the degree of distortion depends on which male progenitor was used, instead of the parental combination. A sexual synthetic tetraploid population (SSTP) was generated intercrossing 29 sexual  $F_1$  hybrids. Sexual reproduction and tetraploid level were corroborated on the population. SSR molecular markers and morphological and agronomical traits were used to measure the genetic variability of SSTP, NATG and ESTG. Genetic variability in the SSTP was similar to NATG, and both showed considerably higher genetic variability than ESTG. These results indicate that gene pool of NATG was successfully transferred to the SSTP. The SSTP reproduced by cross-pollination, but with variable levels of self-fertility. This was concluded from seed set under self- and open-pollination. A total of 22 segregating families for mode of reproduction were generated crossing 11 individuals from the SSTP as females with two apomictic cultivars as male parents. Segregation for mode of reproduction and expressivity of apomixis were evaluated. Both traits were highly variable, and there was not significant correlation between those traits and the progenitor used in crosses. The high genetic diversity present in the SSTP will be useful for breeding programs of this species.

# INTRODUCCIÓN

## **1. Potencial impacto de las especies forrajeras en la producción ganadera del norte de Argentina**

La cadena de ganados y carnes en la Argentina tiene un alto impacto social y económico ya que se estima que genera cerca de 550 mil puestos de trabajo directos e indirectos y representa alrededor del 18% del producto bruto interno agroindustrial (Vázquez Platero, 2010). La producción ganadera Argentina se basa en gran parte en el aprovechamiento de pasturas naturales, lo que si bien representa una ventaja desde el punto de vista de la conservación de los recursos florísticos, implica a su vez una baja eficiencia productiva, una subutilización de los recursos y por ende un menor volumen de producción y menores resultados económicos (Arelovich et al., 2011; Feldkamp, 2011).

El avance de la frontera agrícola en la región pampeana ha causado dos eventos importantes desde el punto de vista productivo. En primer lugar, ha llevado a la ganadería de la región pampeana a un nivel de mayor intensificación, a partir de la adopción de nuevas tecnologías de procesos e insumos, que permitieron captar parte del stock ganadero que fue desplazado por la agricultura (Feldkamp, 2011). En segundo lugar, la otra parte del stock que perdió su lugar en esa región, se fue desplazando al norte del país (Canosa et al., 2009; Feldkamp, 2011), donde la ganadería se realizó tradicionalmente en sistemas de tipo extensivo, sobre pasturas naturales con bajo nivel de adopción de tecnologías (Vázquez et al., 2007, Rearte, 2010). Esta situación ha llevado a una sobrecarga de estos sistemas productivos y a su posterior deterioro, generando una disminución de su eficiencia, como queda reflejado en los bajos índices reproductivos y productivos de la región (Arelovich et al., 2011; Feldkamp, 2011).

Una de las alternativas para solucionar este problema es la adopción de sistemas de producción que incorporen especies forrajeras, adaptadas a la región de cultivo, las cuales otorguen un adecuado balance entre productividad y estabilidad. La utilidad de esta tecnología fue claramente demostrada por Brasil, donde la adopción de esta herramienta (junto a otras) permitió en pocos años prácticamente duplicar su receptividad y producción pecuaria, posicionándolo como el mayor exportador de carne vacuna del mundo (Jank et al., 2011; 2014).

Uno de los principales problemas de la producción pecuaria en el norte argentino, desde el punto de vista forrajero, es que la región presenta prácticamente en su totalidad un clima subtropical, donde las pasturas tropicales si bien logran sobrevivir, no alcanzan a expresar el potencial productivo expresado en ambientes tropicales. La misma situación se presenta cuando se intentan incorporar pasturas templadas perfectamente adaptadas, por ejemplo a la región centro y sur de nuestro país. Solo unos pocos cultivares han sido desarrollados para ambientes subtropicales en otros países del mundo como Australia y Estados Unidos (Moser et al., 2004). De esta manera, queda en evidencia la necesidad de obtener germoplasma que se adapte a esta región y que a su vez manifieste adecuados niveles de producción y calidad para la producción ganadera. Afortunadamente, la región presenta numerosas especies nativas con gran potencial forrajero, las cuales pueden ser mejoradas y seleccionadas como potenciales nuevos cultivares.

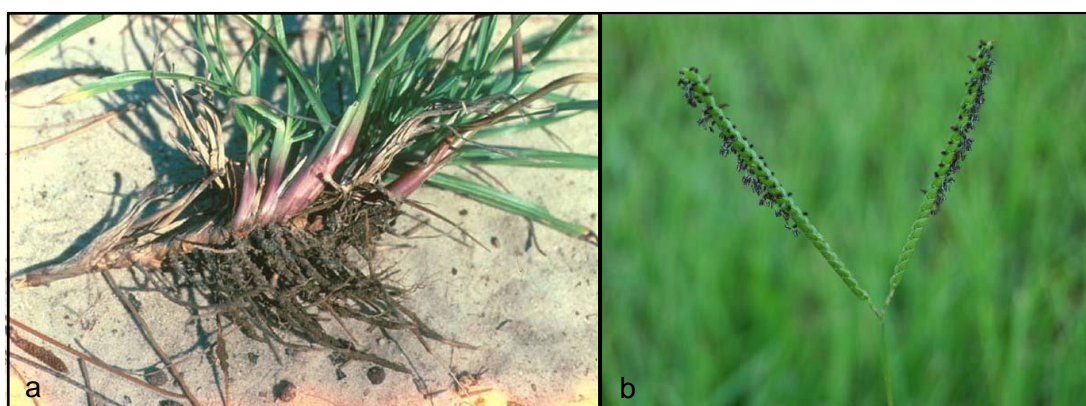
## **2. El género *Paspalum***

*Paspalum* L. es un género perteneciente a la familia Poaceae, subfamilia Panicoideae, Tribu Panicea, Subtribu Paspalinae, compuesta por 310 especies de origen americano según la última revisión realizada por Morrone et al. (2012). El género posee su centro de origen en América del Sur tropical, estando su mayor diversidad distribuida en la zona del Cerrado de Brasil, campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (Zuloaga y Morrone, 2005; Ortiz et al., 2013). Este género se encuentra representado en nuestro país por alrededor de 80 especies (Quarin, 1992), las cuales se distribuyen desde el norte hasta el sur de la región pampeana. La poliploidía está presente en aproximadamente el 75% de las especies del género y la mayoría son tetraploides (Ortiz et al., 2013). Por otro lado, la mayoría de los tetraploides son apomícticos y la aposporia es el tipo de apomixis predominante (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013).

Las especies con mayor potencial forrajero de este género son *P. notatum*, *P. dilatatum*, *P. guenoarum*, *P. atratum* y *P. nicorae*, sin embargo solo las dos primeras han sido ampliamente cultivadas en el mundo.

### 3. *Paspalum notatum*

*Paspalum notatum* Flüggé (pasto horqueta o bahiagrass) es una gramínea perenne, que se extiende mediante fuertes rizomas superficiales o sub-superficiales, de crecimiento horizontal, formados por entrenudos cortos, generalmente cubiertos por hojas secas (Figura 1a). Las hojas son generalmente glabras o con pilosidad a lo largo de los márgenes. Las láminas son lineares y lanceoladas, de 3 a 30 cm de longitud y 3 a 12 mm de ancho. Las inflorescencias presentan dos racimos, con un eje común casi imperceptible (Figura 1b), eje que se hace evidente en las raras oportunidades en que se presentan tres racimos. Los racimos pueden ser ascendentes o recurvos, de 3 a 14 cm de longitud. El raquis es glabro de color verde o púrpura. Las espiguillas son solitarias y se ubican en dos hileras a un lado del raquis, son ovadas u obovadas, brillantes y glabras, con una longitud de entre 2,5 y 4 mm y un ancho de entre 2 y 2,8 mm. Las anteras y estigmas son púrpuras, el fruto es oval de alrededor de 1,8 mm de largo y 1,2 mm de ancho (Gates et al., 2004).



**Figura 1.** Detalle de un rizoma (a) y de una inflorescencia (b) de *P. notatum*.

*Paspalum notatum* es una especie multiploide con modos de reproducción asociados a los niveles de polidía. Al igual que la extensa mayoría de la especies del género, presenta un número básico de 10 cromosomas (Gates et al., 2004). El citotipo diploide ( $2n=2x=20$ ), conocido como *P. notatum* var. *Saurae* Parodi (Pensacola), es de reproducción sexual y alógamo debido a un sistema de auto-incompatibilidad polen-pistilo, aunque produce escasamente semillas y con variaciones genotípicas en autopolinización (Burton, 1955; Acuña et al., 2007). El citotipo tetraploide ( $2n=4x=40$ ), conocido como *P. notatum* tetraploide, se reproduce por apomixis gametofítica de tipo apospórica y es seudógamo (Burton, 1948; Acuña et al., 2007). Este modo de reproducción implica la formación del embrión por partenogénesis, mientras que para el desarrollo del endospermo es necesaria

la polinización y fecundación de la célula central. En la especie también se han registrado individuos con citotipo triploide ( $2n=3x=30$ ) y pentaploide ( $2n=5x=50$ ) (Gould, 1966; Quarín et al., 1989; Tischler & Burson, 1995), aunque estos fueron hallados en escasas ocasiones y no representan más del 2% de las colecciones documentadas hasta la fecha (Tischler & Burson, 1995; Pozzobon & Valls, 1997).

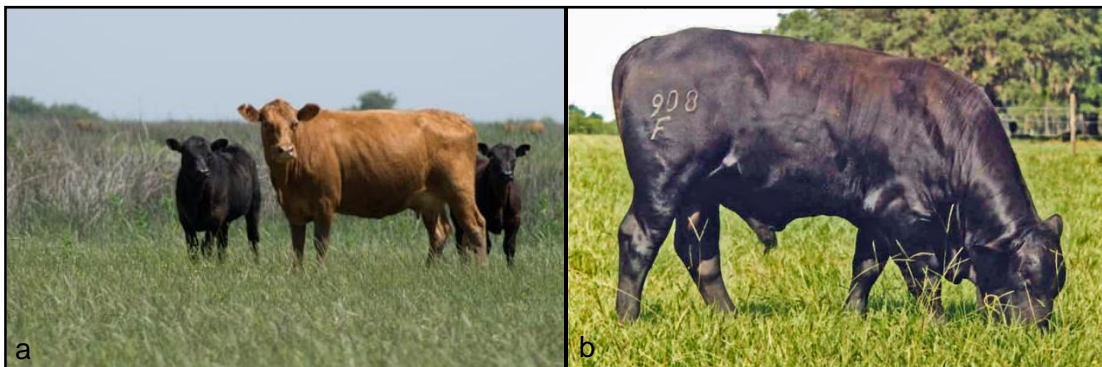
El citotipo tetraploide presenta una amplia distribución natural en el continente americano, extendiéndose desde el centro de México hasta el norte de Argentina y a lo largo de las Islas del Caribe (Chase, 1929), siendo particularmente predominante en los pastizales del sudeste de Brasil, Paraguay, Uruguay y nordeste de Argentina (Figura 2; 3a). En contraste con esto, el citotipo diploide se encuentra restringido a una región acotada del nordeste argentino, cerca de la costa este del río Paraná (Gates et al., 2004) (Figura 2). Considerando que la variante tetraploide es de origen autotetraploide y que además comparten cromosomas homólogos con el citotipo diploide, es aceptado que esta región representa el centro de origen de la especie, siendo además considerado el centro de diversificación debido a la alta diversidad genética presente en la región (Gates et al., 2004).



**Figura 2.** Mapa de distribución geográfica de *P. notatum*. En celeste la distribución del citotipo tetraploide ( $2n=4x=40$ ) y en rojo del citotipo diploide ( $2n=2x=20$ ). Figura adaptada de Daurelio et al. (2004).

Debido a que la especie presenta numerosas características de interés forrajero, la misma ha sido introducida para su cultivo en muchos países alrededor del mundo. Probablemente uno de los primeros fue Estados Unidos, donde se registran las primeras introducciones ya en 1913 (Scott, 1920), y es en el sudeste de este país donde *P. notatum* representa uno de los cultivos forrajeros perennes más importantes con alrededor de 2 millones de hectáreas cultivadas (Blount & Acuña, 2009; Newman et al., 2010) (Figura 3b), además de ser usada como césped y fijadora de suelos (Gates et al. 2004). Otros países como Australia (Gates et al., 2004), Japón (Sugimoto et al., 1995), Taiwán (Jean y Juang, 1979) y Zimbabue (Mills y Boulwood, 1978) han incorporado a la especie como forrajera, césped y como cultivo de cobertura.





**Figura 3.** *P. notatum* bajo pastoreo en un campo natural de la provincia de Santa Fe (Argentina) (a) y en una pastura implantada en el sur de la Florida, EEUU (b).

La apomixis es un tipo de reproducción asexual a través de semillas (Asker y Jerling, 1992) que ocurre en alrededor de 400 especies de plantas distribuidas en 40 familias (Carman, 1997). La falta de recombinación genética en las especies apomícticas ha sido vista por algunos autores (e.g. Jessup, 2005) como un impedimento para el mejoramiento. Sin embargo, muchos otros autores (e.g. Hanna y Bashaw, 1987; Hanna, 1995; Savidan, 2000) citan numerosas ventajas de este modo de reproducción para el mejoramiento vegetal, siendo probablemente una de las mayores, la posibilidad de fijar la heterosis en híbridos a través de sucesivos ciclos de cultivo. Esta ventaja podría ser explotada en el germoplasma tetraploide apomíctico de *P. notatum*, a partir de alguno de los esquemas de mejoramiento propuestos para especies de reproducción apomíctica.

#### **4. Mejoramiento genético en *Paspalum notatum* tetraploide**

Al igual que en otras especies apomícticas, los primeros cultivares de *P. notatum* fueron producto de selección y multiplicación de genotipos naturales coleccionados en diferentes regiones. Los mayores esfuerzos en el mejoramiento genético de la especie fueron realizados en Tifton, Georgia en el sudeste de Estados Unidos y se encuentran resumidos en Burton (1992). En Burton (1948) se encuentran los primeros trabajos de evaluación de progenies originadas a partir de individuos tetraploides, reportándose la ausencia de variabilidad en la descendencia de esos individuos, y determinando de esa manera que éstos presentaban reproducción apomíctica, lo que constituiría una barrera a la recombinación de caracteres mediante hibridaciones.

A partir de la obtención de los primeros individuos tetraploides sexuales, mediante duplicación cromosómica de diploides (Burton y Forbes, 1960), fue posible la obtención de los primeros híbridos tetraploides. Desde entonces, fueron numerosos los intentos de generar cultivares híbridos, a partir de la generación de grandes familias segregantes para el modo de reproducción y la posterior selección de los híbridos de mejores características, que se mantendrían como tales en sucesivos ciclos de cultivo gracias a la reproducción apomíctica. A pesar de estos esfuerzos, este esquema de mejoramiento fue poco eficiente en esta especie, principalmente debido a la baja proporción de híbridos altamente apomícticos (Acuña et al., 2009; 2011).

En busca de aumentar la eficiencia en los programas de mejoramiento, un esquema alternativo fue abordado en las últimas décadas por el Dr. G.W. Burton en Tifton, Georgia (EEUU). Este esquema planteaba la generación de poblaciones sintéticas, y su mejoramiento a partir de selección fenotípica recurrente. Bajo esa metodología se generaron dos poblaciones base de reproducción principalmente sexual, una en 1974 y la otra en 1983, sin embargo, a pesar de haberse realizado varios ciclos de selección, nunca se llegó a liberar cultivares al mercado, y desafortunadamente aquellas poblaciones fueron abandonadas. Probablemente, el fracaso de ese programa se debió a la escasa comprensión de los mecanismos de control de la apomixis en la época (Miles, 2007).

Posteriormente, investigadores de la Universidad de Florida, EEUU, obtuvieron 310 genotipos tetraploides sexuales, a partir de duplicación cromosómica de diploides (Quesenberry et al., 2010), dando lugar a la continuación del programa de mejoramiento genético de *P. notatum* iniciado por el Dr. Burton. Algunos de estos genotipos tetraploides sexuales inducidos fueron seleccionados por ser altamente sexuales y autoincompatibles (Acuña et al., 2007), los cuales fueron cruzados con el cultivar apomíctico Argentine y algunos de los clones apomícticos experimentales del programa del Dr. Burton. Los híbridos resultantes mostraron un alto grado de variabilidad y heterosis (Acuña et al., 2009; 2011), sin embargo estos híbridos tampoco fueron liberados al mercado hasta la fecha, y la mayoría del germoplasma sexual fue abandonado.

Uno de los genotipos sexuales del programa de mejoramiento del Dr. Burton fue incorporado al banco de germoplasma del IBONE (CONICET-UNNE) (Quarin et al., 1984). Esta planta fue cruzada con un ecotipo apomíctico natural y entre los híbridos obtenidos se seleccionó uno apomíctico, que fue recientemente inscripto en el INASE como cultivar Boyero UNNE (RNPC N° 3213). Este es el primer cultivar apomíctico de *P. notatum* obtenido por un método de hibridación (Urbani et al., 2016).

En la actualidad, el IBONE cuenta con uno de los bancos de germoplasma de *P. notatum* más importantes por el número de introducciones, proveniente de distintos puntos de colección dentro de toda el área de distribución natural de la especie. Sólo a nivel tetraploide, el banco de germoplasma (plantas y semillas) del IBONE cuenta con alrededor de 60 accesiones provenientes de países como Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Cuba, México, Paraguay, Perú y Uruguay (Quarin, com. pers.). Sin embargo, el germoplasma tetraploide sexual disponible está acotado a unos pocos genotipos de bajo desempeño y de base genética muy estrecha, lo que los hace inadecuados e insuficientes para llevar adelante un programa de mejoramiento para la especie.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- ✓ Incrementar el acervo génico del germoplasma tetraploide sexual de *Paspalum notatum*, a partir de la obtención de híbridos tetraploides sexuales y su posterior uso para generar una población tetraploide sexual sintética.

### Objetivos específicos

1. Generar híbridos tetraploides sexuales de *P. notatum* que contengan la mayor variabilidad genética transferida desde los ecotipos tetraploides apomícticos (Capítulo I).
2. Obtener una población tetraploide sintética sexual de *P. notatum*, a partir del inter cruzamiento entre híbridos F<sub>1</sub>s sexuales de las diferentes familias (Capítulo I).
3. Caracterizar la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum*, desde el punto de vista citológico, modo de reproducción y con respecto a su fertilidad (Capítulo II)
4. Determinar la variabilidad genética de la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum*, a partir de marcadores moleculares y morfo-agronómicos, para conocer el avance genético logrado con respecto a sus progenitores sexuales y apomícticos (Capítulo II).
5. Generar progenies de origen híbrido, a partir de cruzamientos entre individuos de la población tetraploide sintética sexual y cultivares tetraploides apomícticos (Capítulo III)
6. Determinar la segregación por el modo de reproducción, en las diferentes familias híbridas, obtenidas del cruzamiento entre genotipos tetraploides sintéticos sexuales y cultivares tetraploides apomícticos (Capítulo III).
7. Establecer los niveles de expresividad de la aposporia, en los híbridos apomícticos generados de los cruzamientos entre genotipos tetraploides sintéticos sexuales y cultivares tetraploides apomícticos (Capítulo III).

# CAPITULO I

## OBTENCIÓN DE UNA POBLACIÓN TETRAPLOIDE SINTÉTICA SEXUAL

### I.1 INTRODUCCIÓN

#### I.1.1 La apomixis en *Paspalum notatum*

La barrera a la recombinación genética, inherente a la reproducción apomíctica, fue superada en numerosas especies gracias a la obtención de individuos tetraploides sexuales experimentales, a partir de la duplicación cromosómica de diploides sexuales naturales, como son los casos de *Paspalum notatum* (Burton y Forbes, 1960; Quarin et al., 2001; Quesenberry et al., 2010), *P. simplex* (Cáceres et al., 1999), *P. plicatulum* (Sartor et al., 2009), *Brachiaria bryzantha* (Pinheiro et al., 2000; Guerra Araujo et al., 2005), *B. ruziziensis* (Swenne et al., 1981; Lutts et al., 1994; De Oliveira Timbó et al., 2014), *Panicum maximum* (Savidan, 1975), entre otras especies. Esto posibilitó la liberación de la variabilidad genética presente en los tetraploides apomícticos, a partir de la hibridación entre éstos y los tetraploides sexuales experimentales.

Sin embargo, estos genotipos tetraploides inducidos presentan algunas limitantes para su uso en programas de mejora. En primer lugar, la obtención de estos individuos no es una tarea sencilla, ya que involucra el uso de sustancias nocivas para la salud, y además la eficiencia en la generación de plantas autotetraploides inducidas es muy baja ya que en la mayoría de los intentos no se logra la duplicación de los diploides y en otros es común obtener mixoploides (quimeras) y multiploides. En segundo lugar, estos individuos presentan un escaso vigor que en muchos casos implica que no lleguen a la etapa reproductiva, y cuando lo hacen, presentan una floración desuniforme y baja producción de semillas. Por último, la obtención de genotipos tetraploides por duplicación cromosómica no implica necesariamente la obtención de individuos de reproducción sexual. Quarin et al. (2001) reportó que dos de tres individuos obtenidos por duplicación cromosómica (colchiploides) se comportaron como apomícticos facultativos, mostrando una proporción variable de sacos de origen apospórico y de individuos de origen materno en la progenie. Acuña et al. (2009)

determinaron el modo de reproducción de un grupo de 20 individuos obtenidos por duplicación cromosómica, encontrando que dos de ellos presentaban potencial para apomixis, debido a la presencia de sacos embrionarios de origen apospórico. Estos reportes indican que el potencial genético para la reproducción apomíctica podría encontrarse en el nivel diploide, pero que sería necesario un efecto de dosage (ya sea del propio locus de la apomixis o de factor/es complementarios) para la expresión de dicho carácter (Quarin et al., 2001), lo que además podría ser explicado con la teoría de la expresión asincrónica de genes duplicados, lo que podría desencadenar los procesos de reproducción apomíctica (Carman, 1997). Otra hipótesis que podría explicar este hecho plantea un control epigenético del carácter (epialelos), indicando que la duplicación del número cromosómico desencadenaría los procesos de expresión génica (Hörandl y Hojsgaard, 2012). Cambios epigenéticos manifestados después de duplicación cromosómica ya fueron reportados para otros caracteres en neopoliploides (Comai, 2005), lo que estaría apoyando esta hipótesis. Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido probada, por lo que aún se desconocen las causas de este fenómeno. Este hecho tiene ciertas implicancias desde el punto de vista aplicado, debido a que la duplicación cromosómica de individuos diploides sexuales no garantiza la obtención de individuos tetraploides de reproducción exclusivamente sexual, lo que llevaría por un lado a erróneas interpretaciones de la herencia del carácter, y por otro a pérdidas de eficiencia en los programas de mejora, debido a la posibilidad de obtener descendencia de origen clonal (Blount y Acuña, 2009), siendo necesaria en este último caso la determinación del modo de reproducción de las progenies obtenidas en cada ciclo, lo que implica gastos de tiempo y recursos.

La obtención de algunos individuos tetraploides experimentales de reproducción sexual, al mismo nivel de ploidía de los individuos apomícticos, permitió el estudio de la herencia del carácter apomixis. Como resultado de ello, Martínez et al. (2001) lograron realizar un estudio en profundidad de la herencia de la apomixis en *P. notatum*, mediante evaluación de la segregación del carácter aposporia en  $F_1$ s,  $F_2$ s y retrocruzas, en el cual demostraron que la aposporia se hereda como un factor mendeliano simple y dominante, pero con distorsiones en la segregación, probablemente debidas a algún mecanismo de letalidad propio del locus de la apomixis o de algún factor ligado al mismo. Un estudio posterior de Martínez et al. (2007) demostró que el carácter no es capaz de transmitirse a través de gametos masculinos monoploides ( $n=x$ ), apoyando de esa forma la hipótesis planteada por Nogler (1984a) de que la apomixis sólo puede ser transmitida en condición heterocigótica; por lo tanto, no es posible obtener individuos apomícticos diploides.

La elaboración de mapas de ligamiento en la especie permitieron la identificación de la región genómica responsable del carácter apomixis (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007). A su vez, se determinó que la región presenta una fuerte represión a la recombinación, probablemente debida a rearrreglos cromosómicos como inversiones o translocaciones (Pupilli et al., 2004; Stein et al., 2004, Podio et al., 2012) lo que podría explicar las distorsiones en la segregación de la aposporia.

Otro hecho de interés fue la identificación de varios marcadores moleculares ligados a la región genómica responsable de la apomixis en la especie (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007; Rebozio et al., 2012), algunos de ellos 100% ligados. Esto posibilitó la identificación temprana de individuos apomícticos en progenies segregantes, permitiendo de esa manera avanzar más rápido y un ahorro de recursos en programas de mejoramiento y selección. En un estudio reciente, Worthington et al. (2016) reportan que la región genómica responsable de la apomixis se encuentra muy conservada entre las especies de la tribu Paniceae (a la cual *P. notatum* pertenece), y encuentran evidencia de que el gen candidato para partenogénesis en *Pennisetum squamulatum* ASGR–BBML podría ser el mismo entre las especies de dicha tribu. Este hecho constituye un avance más en la caracterización genética y molecular de la apomixis, que tiene como uno de sus principales objetivos el aislamiento y transferencia del carácter a los cultivos mayores.

En los primeros estudios sobre apomixis se postulaba que éste era un modo de reproducción totalmente independiente de la sexualidad y que los individuos podrían reproducirse solo por una de estas dos vías (Darlington, 1939; Stebbins, 1950). Sin embargo, más recientemente se ha demostrado que la apomixis implica más bien una desregulación de los procesos de la reproducción sexual (Horandl y Hojsgaard, 2012), hecho que se puede evidenciar debido a que la mayoría, si no es la totalidad, de las especies que se reproducen por apomixis son en realidad apomícticas facultativas (Ozias-Akins y van Dijk 2007), es decir, que un mismo individuo genera (o tiene el potencial de generar) descendencia por la vía apomíctica, o por la vía sexual. *Paspalum notatum* no es la excepción a esto, debido a que prácticamente todos los genotipos apomícticos evaluados tienen el potencial de producir cierta parte de su descendencia por vía sexual, debido a que éstos exhiben una proporción variable de sacos embrionarios de origen meiótico, aunque en muchos casos las evaluaciones de progenie reporten únicamente descendencia de origen materno (Blount y Acuña, 2009).

La determinación del modo de reproducción en *P. notatum* puede realizarse mediante distintas técnicas. En primer lugar, es posible clasificar a los individuos en estadios

tempranos del desarrollo vegetativo a partir de marcadores moleculares ligados a la reproducción apomítica (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007; Rebozio et al., 2012). En segundo lugar, es posible su determinación en distintas etapas del proceso reproductivo (óvulo, semilla o progenie). La observación directa de sacos embrionarios maduros a partir de pistilos diafanizados (Quarin et al., 1984; 2001; Ortiz et al., 1997; Martínez et al., 2001; Acuña et al., 2009; 2011) permite distinguir la estructura diferencial de los sacos de origen meiótico (tipo *Polygonum*) de aquellos de origen apospórico (tipo *Paspalum*) (Ortiz et al., 2013). También es posible determinar el modo de reproducción en la etapa de semillas, a partir de la técnica de citometría de flujo (Matzk et al., 2000; Siena et al., 2008), permitiendo diferenciar las semillas originadas de procesos sexuales de aquellas de origen apomítico, por diferencias en la relación de ploidía embrión/endospermo entre ambas. Por último, es posible determinar el modo de reproducción a partir de pruebas de progenie con marcadores moleculares (Ortiz et al., 1997) o fenotípicos (Burton & Forbes, 1960). Sin embargo, estas últimas requieren mayor tiempo y recursos que las anteriores, y en el caso de las fenotípicas no permiten diferenciar a individuos apomíticos facultativos de aquellos sexuales ya que ambos pueden generar descendientes por la vía sexual.

## **I.1.2 Mejoramiento en especies forrajeras apomíticas**

El mejoramiento genético de especies apomíticas se llevó a cabo tradicionalmente mediante la selección de genotipos apomíticos superiores presentes en la naturaleza (Vogel y Burson, 2004; Miles, 2007). Sin embargo, este enfoque si bien fue exitoso en especies con elevada diversidad, se ve limitado en el corto o mediano plazo, debido a la dificultad de encontrar genotipos que reúnan naturalmente numerosos caracteres de interés (Zilli et al., 2015).

La apomixis es un modo de reproducción que impide la recombinación y por lo tanto la generación de nuevas variantes genéticas. Se han propuesto varios esquemas de mejoramiento en especies apomíticas, tales como los citados por Pernés et al. (1975), Gobbe et al. (1983), Savidan et al. (1989), Hanna (1995), Miles et al. (2006), entre otros. La mayoría se encuentran enfocados en la obtención de grandes familias segregantes, para el modo de reproducción, y la posterior búsqueda de híbridos superiores con alta expresividad de la apomixis (Miles, 2007). Sin embargo, este enfoque presenta ciertas limitaciones, como ser la dificultad de reunir varios caracteres de interés en un mismo individuo, mediante un



cruzamiento simple (Miles et al., 2007). En el caso particular de *P. notatum* a esto se agrega la baja proporción de híbridos apomícticos obtenidos en los cruzamientos entre sexuales y apomícticos, debido a las distorsiones en la segregación de la apomixis (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Acuña et al. 2009; 2011) y dentro de ellos, a la baja proporción de individuos con alta expresión del carácter (Acuña et al., 2009; 2011). Inclusive, en los casos donde los genotipos apomícticos superiores se encuentran en la naturaleza, se necesitan muchos años para su evaluación y liberación al mercado, lo que podría implicar fácilmente entre 15 y 20 años (Miles, 2007).

Uno de los esquemas propuestos para combinar los caracteres de interés dispersos en el germoplasma tetraploide apomíctico es la generación de poblaciones segregantes, y a partir de ellas la recombinación genética, a partir del intercruzamiento entre individuos sexuales del primer ciclo (Miles & Escandon, 1997), generando en el segundo ciclo una población sexual sintética de amplia base genética, que permita la selección de progenitores femeninos de alto desempeño, para ingresar en programas de cruzamientos y selección. Este enfoque fue utilizado con éxito en el germoplasma de *Brachiaria*, mediante cruzamientos inter-específicos entre tres especies emparentadas, logrando luego de sucesivos ciclos de selección recurrente una población sexual sintética resistente a tres especies de cicádidos, una de las principales plagas del trópico y subtrópico americano (Miles et al., 2006). Un enfoque similar podría ser apropiado para el mejoramiento del germoplasma tetraploide de *P. notatum*, con la ventaja no menor de que se dispone de germoplasma sexual (diploide natural y tetraploide experimental) dentro de la misma especie.

Los mayores esfuerzos en el mejoramiento de *P. notatum*, mediante el uso de poblaciones sintéticas, fueron realizados en Tifton, Georgia (EEUU), y son resumidos por Burton (1992). En las últimas décadas, se han generado dos poblaciones base de reproducción principalmente sexual para el mejoramiento de la especie, una en 1974 y la otra en 1983, sin embargo, a pesar de que se realizaron varios ciclos de selección fenotípica recurrente en cada una de ellas, llegando a obtenerse mejoras en algunos caracteres de interés, no se lograron liberar híbridos apomícticos al mercado, quedando estos en etapa experimental y aquellas poblaciones abandonadas. Probablemente, la falla en estos programas se debió a la escasa comprensión de los mecanismos de control de la apomixis en la época (Miles, 2007) y a la inexistencia de herramientas que permitan una rápida y adecuada determinación del modo de reproducción.

Desde aquel entonces se han realizado significativos avances en la caracterización de la apomixis en *P. notatum*. En primer lugar, se determinó la herencia del carácter, estableciéndose que la aposporia se hereda como un factor mendeliano simple, dominante y que segrega de manera distorsionada debido a un posible factor de letalidad con penetrancia incompleta, ya sea del propio locus de la apomixis o a factores ligados a éste (Martínez et al., 2001). Se realizaron mapas de ligamiento, identificando la región genómica que gobierna el carácter (Martínez et al. 2003; Stein et al., 2007). Se identificaron varios marcadores moleculares ligados a la aposporia, algunos de ellos 100 % ligados al carácter (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007; Rebozio et al., 2012). Estos avances permitieron un mayor entendimiento de los mecanismos de control de la apomixis, además de generar herramientas útiles en la identificación rápida de híbridos apomícticos. Debido a que la reproducción sexual (al igual que en *Brachiaria*) se comporta como un carácter recesivo, es posible generar y mantener una población sexual sintética de base genética amplia que se mantenga como tal a través de sucesivos ciclos de cultivo.

Uno de los esquemas de mejoramiento más moderno y probablemente más apropiado para esta especie es el propuesto por Miles (2007) donde se proponen cruzamientos de prueba, entre individuos de la población sintética sexual con genotipos apomícticos superiores como probadores, obteniéndose un doble beneficio, por un lado se generan híbridos apomícticos que podrían ser potenciales nuevos cultivares, y por el otro se genera información sobre la aptitud combinatoria de las madres sexuales, las cuales siguen un esquema de selección recurrente recíproca, ya sea por aptitud combinatoria general (Comstock et al., 1949) o específica (Hull, 1945), lo que lleva a un nuevo ciclo de recombinación entre aquellas madres que generen una descendencia de mayor desempeño, logrando en cada ciclo una acumulación progresiva de efectos genéticos aditivos y/o no aditivos en la población base.

El IBONE cuenta con un extenso germoplasma tetraploide apomíctico de *P. notatum*, colectado en diferentes sitios dentro del área de distribución natural de la especie, representado en buena medida la variabilidad genética presente en la misma. Por otra parte, también se cuenta con unos pocos individuos tetraploides sexuales de origen experimental, entre ellos uno de los obtenidos por el Dr. G.W. Burton en Tifton (Georgia, EEUU), los cuales podrán ser utilizados como parentales femeninos con el fin último de transferir la variabilidad genética del germoplasma apomíctico a un nuevo germoplasma tetraploide sintético sexual que servirá de base para el programa de mejoramiento de la especie.

## I.2 HIPÓTESIS

1. Es posible generar varias familias recombinantes de *P. notatum*, a partir de la hibridación entre unos pocos genotipos tetraploides sexuales experimentales y múltiples genotipos tetraploides apomícticos naturales.
2. Los marcadores moleculares permiten clasificar las progenies segregantes, para el modo de reproducción, en etapas tempranas del desarrollo.
3. Es posible generar una población tetraploide sexual sintética de *P. notatum*, a partir de inter cruzamientos entre híbridos sexuales provenientes de familias F<sub>1</sub>s con origen genético diverso.

### **I.3 OBJETIVOS**

1. Obtener varias familias de *P. notatum*, a partir cruzamientos intraespecíficos entre unos pocos genotipos tetraploides sexuales y múltiples genotipos tetraploides apomícticos naturales.
2. Determinar el modo de reproducción de las progenies híbridas, a partir de la utilización de marcadores moleculares y posterior corroboración por análisis embriológico de sacos embrionarios maduros.
3. Generar una población tetraploide sintética sexual (PTSS) de *P. notatum*, a partir del intercruzamiento entre diferentes híbridos F<sub>1</sub>s sexuales, provenientes de familias generadas por cruzamientos entre unos pocos genotipos tetraploides sexuales experimentales y varios genotipos tetraploides apomícticos naturales.

## **I.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I.4.1 Material Vegetal**

Los genotipos tetraploides sexuales usados como progenitores femeninos fueron obtenidos de manera experimental ya que en la naturaleza nunca fueron encontrados (Tabla 1). De los tres genotipos empleados, dos de ellos (SWSB y Q4205) tienen un origen genético en común y el otro (C4-4x) se obtuvo por duplicación cromosómica de un individuo diploide sexual. El genotipo SWSB fue obtenido por cruzamiento entre un diploide sexual duplicado y un tetraploide apomíctico de estigmas blancos (WSB) (Burton y Forbes, 1960); mientras que el genotipo Q4205 fue obtenido por autopolinización de SWSB (Quarin et al. 2003), portando ambos el carácter recesivo de estigmas blancos. La información detallada del origen y modo reproductivo de cada uno de los genotipos utilizados se encuentra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Identificación, modo de reproducción y origen de los genotipos tetraploides de *P. notatum* usados en los cruzamientos para la generación de las familias F<sub>1</sub>.

<b>Accesión</b>	<b>Modo de Reproducción</b>	<b>Origen</b>
SWSB	Sexual	Híbrido, obtenido por cruzamiento entre un tetraploide sexual experimental y un apomíctico natural con estigmas blancos, WSB (Burton y Forbes, 1960). Introducida a Argentina en 1979 (Quarin, 1984).
Q4205	Sexual	Obtenido por autofecundación de SWSB (Quarin et al., 2003).
C4-4x	Sexual	Tetraploide experimental, obtenido por duplicación cromosómica de una planta diploide colectada en Cayastá, Santa Fe, Argentina (Quarin et al., 2001).
C&A1556	Apomíctico	Ruta 35, Km. 364 cerca Fortín Olavarría, Buenos Aires, Argentina.
Q3838	Apomíctico	Riachuelo, Corrientes, Argentina.
V14327	Apomíctico	Capivari, RS, Brasil.
Q3775	Apomíctico	Tamaulipas, México.
Q4064	Apomíctico	Saladas, Corrientes, Argentina.
SV2893	Apomíctico	El Huayo, Dpto. de Cajamarca, Prov. de Cajabamba, Perú.
Q3776	Apomíctico	Villa Tunari, región del Chapare, Bolivia.
Q4294	Apomíctico	Los Algarrobos, Santa Rosa de Calamuchita, Córdoba Argentina.
B229	Apomíctico	Itaqui, RS, Brasil.
TB86	Apomíctico	Ruta 26, Km. 389, Dpto. de Cerro Largo, Uruguay.

Los genotipos tetraploides apomícticos empleados como progenitores masculinos fueron seleccionados de una amplia colección de germoplasma de *P. notatum* que existe en el Grupo de Genética de Pastos del IBONE (Tabla 1). Se seleccionaron 10 genotipos, teniendo en cuenta la diversidad morfológica existente en el banco de germoplasma y el origen

geográfico, de tal manera de tener representada la mayor diversidad y el área de distribución natural de la especie (Figura 4).



**Figura 4.** Mapa de los sitios de colección de los genotipos apomícticos utilizados en esta tesis.

## **I.4.2 Cruzamientos y obtención de las progenies $F_1$**

Los cruzamientos fueron realizados de forma controlada, mediante emasculación previa del parental femenino, y de acuerdo a la metodología descrita por Burton (1948). A partir de las plantas sexuales utilizadas como madres se colectaron inflorescencias con una porción de rizomas, el día previo al comienzo de la floración, las cuales fueron depositados en contenedores de 1 l de capacidad con agua limpia. La tarde previa al inicio de la floración, los recipientes con las inflorescencias unidas a sus rizomas fueron colocados dentro de una cámara de cruzamientos, la cual está conectada a un humidificador que genera una niebla de agua, manteniendo el ambiente con una humedad relativa cercana al 100%. A la mañana siguiente, en el momento que se produce la antesis de las espiguillas (alrededor de las 6 am), las anteras permanecen sin abrirse (se impide la dehiscencia) debido a que el ambiente está saturado de humedad. De esa manera, es posible eliminar las anteras

(emasculación), mediante una pinza de puntas finas, para evitar la autopolinización. Por otra parte, se colectó el polen del progenitor masculino apomítico, en sobres de papel sulfito, la misma mañana en la cual se produjo la emasculación de las flores del progenitor femenino. El sobre conteniendo el polen del progenitor masculino fue colocado sobre la inflorescencia del progenitor femenino, previamente emasculado, para que se produzca la polinización cruzada. Este procedimiento se repitió por 3 o 4 días hasta completar la floración de todas las espiguillas de la inflorescencia. Una vez finalizada la floración y polinización de todas las espiguillas, las inflorescencias fueron mantenidas ensobradas, y se ubicaron en un sector húmedo y sombreado del invernadero para su maduración. Entre los 25 y 30 días de finalizada la polinización se procedió a la cosecha, secado en estufa a 37 °C durante 48 h, y posterior trilla y separación de las espiguillas con cariósides (semillas) de las sin ellos (vacías). Para esto, se utilizó un equipo “soplador de semillas” (Seedburo Equipment Company 1022W) que separa las espiguillas con semillas de las vacías por diferencia de peso.

En el mes de agosto de 2012, las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico (98%) durante diez minutos, enjuagadas con agua y puestas a germinar en turba estéril dentro del invernadero. Una vez que las plántulas desarrollaron 3 hojas verdaderas fueron repicadas individualmente a bandejas plásticas individuales (*speedlings*) donde continuaron su desarrollo durante un mes. Luego de transcurrido ese tiempo fueron trasplantadas al campo en un marco de 0,8 x 0,8 m dentro del predio del Campus de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.

### **I.4.3 Determinación del origen híbrido de las progenies**

Se evaluó la eficiencia del método de cruzamiento, en una muestra del 20% de los individuos de cada familia. Se recurrió a una prueba de paternidad, mediante la detección de marcadores moleculares específicos del padre apomítico y posterior análisis de co-segregación en la descendencia. Para ello, se utilizó la técnica de marcadores denominada ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). El criterio para considerar si un descendiente se originó por hibridación consistió en que al menos dos marcadores específicos del padre apomítico estuvieran presentes en el hijo. Los descendientes que no compartieron ningún marcador con el padre fueron considerados que se originaron por autofecundación de la madre sexual.



### **I.4.3.1 Obtención del ADN**

Se empleó la técnica de micro-extracción basada en una metodología descrita en Brugnoli et al. (2013), pero en lugar de hojas jóvenes se usaron meristemas apicales de los rizomas. Las extracciones de ADN genómico total fueron realizadas a partir de 100 mg de tejido meristemático. El material vegetal fue colocado en tubos plásticos de 1,5 ml de capacidad con 700 µl de Buffer de extracción (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA pH 8; 700 mM NaCl; 140 mM β-mercaptoetanol), precalentado a 65 °C, y fue macerado con la ayuda de un taladro manual equipado con una mecha de polipropileno. Los tubos con las muestras maceradas fueron incubados en un baño térmico a 65 °C durante 30 min, con agitación de los tubos cada 10 min para lograr una buena homogenización. Luego, los tubos fueron retirados y dejados sobre una mesada, hasta que alcanzaron temperatura ambiente, donde se les agregó 700 µl de Cloroformo 99%, se homogeneizó mediante agitación por inversión, durante 5 min y luego se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. El sobrenadante (aprox. 600 µl) fue transferido a otro tubo nuevo, donde se le agregó 600 µl de 2-Propanol frío, para lograr la precipitación del ADN, y luego fueron colocados en un freezer a -20 °C por 2 h. A continuación, se centrifugaron a 13.000 rpm por 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado con 500 µl de una solución de lavado (etanol 70% + 0,2 M acetato de sodio), donde nuevamente fueron centrifugados a 13.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se puso a secar el pellet en estufa a 37 °C. Finalmente, el pellet seco se disolvió en una solución de TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) y se los conservó en freezer a -20 °C.

Se estimó la cantidad e integridad del ADN mediante el uso de patrones de ADN de concentración conocida, mediante separación electroforética en gel de agarosa 1% p/v en una solución de TAE 1X (40 mM Tris-HCl; 5 mM acetato de sodio; 0.77 mM EDTA pH 8.0) a 40 V durante 1 h. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 ng/ml), visualizados con luz ultravioleta y fotografiados con el equipo Gel-Doc It Imagen System (UVP, LLC). Luego, se prepararon diluciones de las muestras de ADN, a una concentración estandarizada de 10 ng/µl, para luego realizar las amplificaciones por PCR.

### **I.4.3.2 Amplificaciones por PCR y detección de los marcadores**

Los ADNs fueron amplificados por PCR para la detección de los marcadores moleculares. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 20 ng de ADN genómico, 100 µM de dNTPs, 0,2 µM del cebador, 1 U de la enzima polimerasa de ADN (Promega) y 1X del buffer de amplificación de la enzima (Promega). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca Bio-Rad modelo My-Cycler con el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguidos por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, apareamiento a la temperatura de cada cebador durante 45 seg, y extensión a 72 °C durante 2 min, y finalmente un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Una vez finalizada la reacción de amplificación se adicionó a cada tubo 5 µl de buffer de siembra (50 mM Tris pH 8; 5mM EDTA pH 8; 25% sacarosa, 2 mg/ml p/v azul de bromofenol).

Los productos de amplificación fueron separados por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% p/v en buffer TAE 1X (400 mM Tris; 50 mM NaOAc; 7,7 mM EDTA) a 70 V durante 3 h. Los patrones electroforéticos fueron revelados con bromuro de etidio (10 ng/ml), visualizados y fotografiados con un equipo Gel-Doc it Imagen System (UVP-LLC).

Se realizó una selección de cebadores que amplificaran marcadores específicos del padre y que estuvieran ausentes en la madre. Posteriormente, con los cebadores que amplificaron bandas específicas del padre se realizó el test de paternidad, amplificando los ADNs de los progenitores junto con el de los descendientes. Aquellos descendientes que amplificaron al menos 2 marcadores específicos del padre fueron considerados de origen híbrido; mientras que los que no compartieron ningún marcador fueron considerados producto de autofecundación

#### **I.4.4 Determinación del modo de reproducción**

Esta determinación se llevó a cabo sobre todos los híbridos, mediante el empleo de dos marcadores moleculares de RAPD (*Random amplified polymorphism DNA*) 100% ligado al carácter aposporia en *P. notatum* (Martínez et al., 2003). Luego, para corroborar los resultados moleculares se realizó un análisis citoembriológico, mediante observación de sacos embrionarios, sobre una muestra del 15% de los híbridos de cada familia.

#### **I.4.4.1 Análisis molecular**

La extracción de ADN genómico fue realizada de la misma forma descrita en el punto I.4.3.1.

Se emplearon los marcadores de RAPD UBC247-377 y UBC259-1157, ambos identificados como 100% ligados al carácter aposporia en *P. notatum* (Martínez et al., 2003).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 20 ng de ADN genómico, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM del cebador, 1,25 U de la enzima polimerasa del ADN (Promega) y 1X del buffer de amplificación de la enzima (Promega). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca Biometra modelo UNO-Thermoblock con el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, apareamiento a 36 °C durante 1 min y una extensión a 72 °C durante 1 min. Por último, un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Una vez finalizada la reacción de amplificación se adicionó a cada tubo 5 µl de buffer de siembra (50 mM Tris pH 8; 5mM EDTA pH 8; 25% sacarosa, 2 mg/ml p/v azul de bromofenol). El procedimiento para la obtención de los patrones electroforéticos fue idéntico al usado para los marcadores de ISSR descrito en el punto I.4.3.2.

Aquellos individuos que amplificaron ambos marcadores ligados a la aposporia fueron clasificados como de reproducción apomítica; mientras que aquellos que no lo hicieron fueron considerados de reproducción sexual.

#### **I.4.4.2 Análisis citoembriológico**

Este análisis se llevó a cabo para corroborar los resultados moleculares obtenidos previamente y el mismo se realizó sobre una muestra del 15% del total de híbridos generados. Se marcaron inflorescencias el día previo al comienzo de la antesis de las espiguillas, las cuales a la mañana siguiente y luego de producida la antesis fueron fijadas en FAA (etanol 70%, formaldehído 37%, y ácido acético glacial en una relación 18:1:1). Luego de 24 horas en FAA, los pistilos fueron removidos de las espiguillas, debajo de un

microscopio estereoscópico binocular (lupa) con la ayuda de una aguja y bisturí, y fueron sometidos a un proceso de diafanizado en base a la metodología descrita por Young et al. (1979) con las siguientes modificaciones: Los pistilos fueron colocados en tubos de 1,5 ml donde se les agregó 500 µl de etanol 70% y permanecieron durante 24 h. Luego, se pasaron por una serie de pasos con soluciones de etanol y metilsalicilato en diferentes concentraciones (250 µl de cada solución) que se describen a continuación: 1) agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% durante 2 h; 2) etanol 50% durante 30 min; 3) etanol 70% durante 30 min; 4) etanol 95% durante 30 min; 5) etanol 100% durante 30 min (dos veces); 6) etanol:metilsalicilato 50:50 v/v durante 30 min; 7) etanol:metilsalicilato 25:75 v/v durante 30 min; 8) metilsalicilato:etanol 15:85 v/v durante 30 min; 9) metilsalicilato 100% durante 12 h. A continuación, un mínimo de 30 pistilos diafanizados fueron colocados sobre un portaobjeto y se le colocó un cubreobjetos encima y una gota de metilsalicilato 100% por debajo del mismo. Los sacos embrionarios fueron observados por medio de un microscopio Leica DM2500 equipado con dispositivo de contraste de interferencia diferencial (DIC) y cámara fotográfica Leica EC3.

Los pistilos fueron clasificados según la estructura y composición de los sacos embrionarios observados en: 1.- pistilos con sacos de origen meiótico (tipo *Polygonum*), caracterizado por la presencia de una ovocélula y dos sinérgidas en el extremo micropilar, una célula central binucleada, y varias antípodas en el extremo chalazal del óvulo. 2.- pistilos con sacos de origen apospórico, en general múltiples dentro de un mismo óvulo, compuestos por una ovocélula, dos sinérgidas, una célula central bi o trinucleada, muy vacuolizada, y ausencia de antípodas. 3.- pistilos mixtos, con presencia de un saco meiótico y uno o varios sacos apospóricos. 4.- pistilos con sacos inmaduros o no desarrollados, óvulos con sacos en formación que no han completado su desarrollo normal. 5.- pistilos con sacos abortados, óvulo sin desarrollo de saco embrionario o en formación.

Las plantas que mostraron únicamente sacos embrionarios de origen meiótico, inmaduros o abortados fueron consideradas de reproducción sexual; mientras que aquellas plantas que portaban al menos un saco embrionario de origen apospórico, fueron consideradas de reproducción apomíctica.

### **I.4.5 Análisis de la segregación por modo de reproducción**

A partir de la clasificación reproductiva realizada en cada una de las familias (punto I.4.4) se realizó el análisis de la segregación según el modo de reproducción, estableciendo las proporciones entre sexuales/apomícticos para cada una de ellas y en base a ello se determinó a qué modelo genético de herencia se ajustaron los resultados observados en cada una de las familias. Se utilizó la prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) para ajustar los rangos de segregación observados entre sexuales/apomícticos (S/A) a los rangos esperados según el modelo genético.

### **I.4.6 Obtención de la Población Tetraploide Sintética Sexual**

En base a la clasificación reproductiva realizada previamente en las 12 familias de híbridos  $F_1$ s, se seleccionaron los genotipos sexuales para los inter cruzamientos y la generación de la PTSS. La selección de los genotipos  $F_1$ s sexuales se realizó teniendo en cuenta la variación fenotípica existente en 10 familias, debido a que fueron las obtenidas por hibridación con los 10 genotipos tetraploides apomícticos naturales empleados en este estudio. Se descartaron los híbridos sexuales de dos familias, porque las mismas fueron generadas a partir de dos genotipos apomícticos que ya habían sido empleados en las otras familias seleccionadas. Se realizó una selección visual dentro de cada familia tratando de representar la mayor variabilidad fenotípica disponible.

De cada uno de los híbridos  $F_1$ s sexuales seleccionados se colectó una inflorescencia, portando una porción de rizoma, previo al comienzo de la floración (antes), las cuales fueron colocadas en contenedores de plástico, de un litro de capacidad, con agua potable, y ubicados a distinta altura con el objeto de que los racimos de las inflorescencias queden al mismo nivel. Posteriormente, el conjunto de las panículas de los diferentes híbridos  $F_1$ s sexuales fueron ensobrados juntos, mediante sobres de papel sulfite, para impedir la contaminación con polen foráneo. Al momento de la antesis, a la mañana temprano, se procedió a agitar el sobre para asegurar la polinización cruzada, favoreciendo el inter cruzamiento entre todos los genotipos ensobrados juntos. Este procedimiento se llevó a cabo durante 5 días consecutivos, tiempo en el cual la totalidad de los racimos habían completado la floración, y fue realizado en tres etapas distintas, empleando en cada etapa

entre 13 a 16 inflorescencias de distintos genotipos  $F_1$ s sexuales, debido a que no todas las plantas se encontraron en floración al mismo tiempo.

Una vez transcurridos 30 días de finalizado el intercrucamiento, las inflorescencias intervinientes en los cruzamientos fueron recolectadas con sus sobres correspondientes y se procedió a secarlas en estufa a 37 °C durante 48 h. Luego, se procedió a la trilla para separar las espiguillas de los racimos. Finalmente, las espiguillas fueron pasadas por un equipo “soplador de semillas” (Seedburo Equipment Company 1022W) para separar por diferencia de peso las espiguillas con cariósides (semillas) de las sin ellos (vacías).

Previo a la siembra, las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico concentrado (98%) durante 10 min, enjuagadas con agua y puestas a germinar en turba estéril en un invernadero durante el mes de agosto de 2013. Una vez que las plántulas alcanzaron 3 hojas verdaderas fueron repicadas a bandejas de siembra individuales (*Speedlings*) de 150 cm<sup>3</sup> de capacidad y empleando turba comercial como sustrato. Una vez que las plántulas macollaron fueron llevadas al campo en el mes de noviembre de 2013 en un marco de 0,8 m x 0,8 m dentro del predio del Campus Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.

## **I.4.7 Determinación del modo de reproducción de la PTSS**

### **I.4.7.1 Determinación por medio de marcadores moleculares**

Si bien en *P. notatum* la sexualidad se comporta como un carácter monogénico y recesivo (Martínez et al., 2001), existe la posibilidad de contaminación con polen foráneo durante el intercrucamiento, además del hecho de que se reportaron casos de individuos de origen experimental que se comportaban como apomícticos facultativos (Quarin et al., 2001). Con la finalidad de confirmar que la población esté conformada exclusivamente por individuos de reproducción sexual, se realizó una determinación del modo de reproducción de todos los individuos de la PTSS, generados a partir del intercrucamiento entre genotipos  $F_1$ s sexuales provenientes de 10 familias.

La determinación del modo de reproducción se realizó a partir del uso de dos marcadores de RAPD 100% ligados a la apomixis en *P. notatum* (UBC243-377 y UBC259-1157). La

metodología de extracción de los AND genómico se realizó según la metodología descrita en el ítem I.4.3.1; mientras que el análisis molecular fue el mismo descrito en el ítem I.4.4.1.

#### **I.4.7.2 Determinación por análisis citoembriológico**

Con el objeto de corroborar la clasificación reproductiva obtenida a través de los marcadores RAPD 100% ligados a apomixis, sobre la totalidad de los individuos de la PTSS, se realizó un análisis citoembriológico, mediante observación de sacos embrionarios maduros, sobre una muestra al azar de 28 individuos de la PTSS. A esta muestra aleatoria se agregaron dos individuos que fueron previamente clasificados como apomícticos por medio de los dos marcadores RAPD (UBC243-377 y UBC259-1157).

El análisis citoembriológico realizado fue el mismo descrito ítem I.4.4.2. A su vez, esta técnica también fue utilizada para corroborar el modo de reproducción de los híbridos F<sub>1</sub>s sexuales seleccionados para la generación de la PTSS.

#### **I.4.8 Determinación del nivel de ploidía de la PTSS**

Debido a que se reportaron casos de obtención de individuos neopoliploides y polihaploides en progenies de gramíneas poliploides como *Hordeum vulgare* (Rommel, 1961), *Pennisetum typhoides* (Jauhar 1970), *Sorghum vulgare* (Doggett, 1964), *Zea perennis* (Randolph, 1935; Randolph & Fischer, 1939), *Triticum* sp. x *Secale cereale* (Weimarck, 1973), se consideró apropiada la determinación del nivel de ploidía de la población sintética con el objeto de garantizar su nivel tetraploide.

El nivel de ploidía fue determinado mediante la técnica de citometría de flujo sobre una muestra del 10% de la PTSS. El análisis se realizó mediante la conformación de grupos (*bulks*) de 5 plantas de la PTSS, junto con un control o patrón de *P. notatum* (cv. *Argentine*), con nivel de ploidía conocido (tetraploide). Las mediciones se realizaron en hojas nuevas, utilizando 0,5 cm de cada una de las 6 plantas que conformaban cada grupo, las cuales fueron cortadas finamente con la ayuda de una hoja de afeitar, dentro de una caja de Petri, conteniendo 0,5 ml de un *buffer* de extracción de núcleos *CyStain UV Pecise P* (05-5002 de Partec, Münster, Alemania). Después de 30 segundos, el material fue filtrado por medio de

un filtro con malla de 50  $\mu\text{m}$  y teñido con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 3 min, usando un *buffer* de tinción *CyStain UV Precise P*. Las muestras fueron analizadas en un clitómetro de flujo modelo PA II (Partec), realizando un recuento de no menos de 3000 núcleos por muestra.



## I.5 RESULTADOS

### I.5.1 Cruzamientos y obtención de las progenies F<sub>1</sub>

Los porcentajes de producción de semillas mostraron un rango entre 16,2% y 42,2%, con un promedio general de 27,5% (Tabla 2). Los porcentajes de germinación a los 21 días luego de la siembra de las semillas arrojaron un promedio del 61,3%, con un rango de variación entre 33% y 81% (Tabla 2). A partir de éstos resultados, podemos ver que la eficiencia de hibridación (número de híbridos cada 100 espiguillas cruzadas) es muy variable, con valores que van desde 6,1 a 30%, con una media de 17,6% (Tabla 2).

**Tabla 2.** Número total de espiguillas cruzadas, porcentaje de semillas, porcentaje de germinación a los 21 días, eficiencia del cruzamiento y número total de plantulas para cada una de las diferentes combinaciones parentales.

Madre	Padre	ID	N° de espiguillas cruzadas	% de semillas	% de germinación	Eficiencia del cruzamiento*	N° de plantulas
SWSB	B229	A	543	16,2	45	7,3	42
SWSB	Q4064	B	552	23	34	7,8	46
SWSB	SV2893	C	555	42,2	71	30,0	48
SWSB	Q4294	D	553	25,3	81	20,5	49
SWSB	V14327	E	1022	45,5	69	31,4	50
SWSB	Q3775	F	550	30	78	23,4	50
SWSB	TB86	G	624	36,7	70	25,7	48
Q4205	Q3776	H	970	26,4	63	16,6	50
Q4205	C&A1556	I	803	17,3	77	13,3	50
Q4205	Q4064	J	473	27,5	78	21,5	50
C4-4x	Q3838	K	639	24,1	33	8,0	39
C4-4x	Q4294	L	1319	16,6	37	6,1	50

\* Número de plantulas obtenidas por cada 100 espiguillas cruzadas.

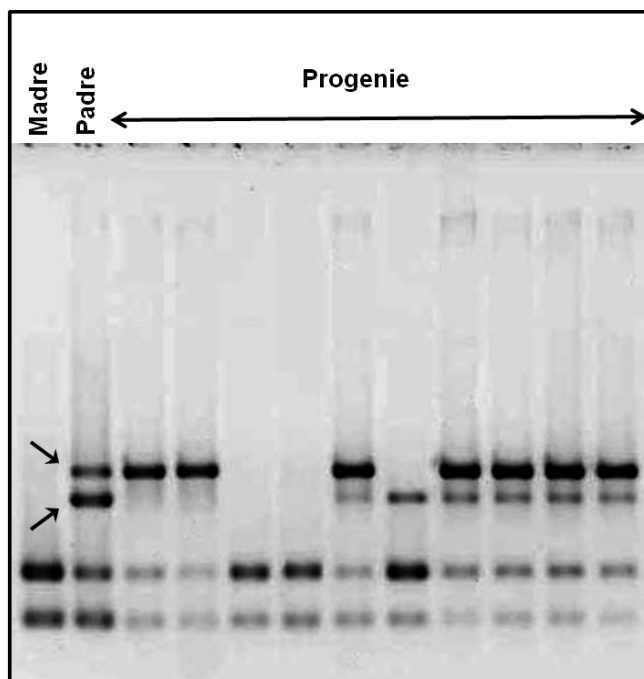
Se obtuvieron 12 familias F<sub>1</sub> de los cruzamientos entre 3 madres tetraploides sexuales experimentales y 10 genotipos tetraploides apomícticos. El número de descendientes por familia varió entre 39 y 50, con un total de 572 individuos (Tabla 2), los cuales fueron cultivados en el Campus de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE (Figura 5).



**Figura 5.** Parcela de cultivo de los híbridos  $F_1$  en el campus de la FCA-UNNE

### **I.5.2 Origen híbrido de las progenies**

La evaluación de la eficiencia del método de cruzamiento fue realizada con 19 cebadores de ISSR en un total de 120 individuos tomados al azar (10 por cada familia). Un total de 118 individuos amplificaron al menos dos marcadores específicos del padre (Figura 6), mientras que dos plantas no amplificaron ninguno de los marcadores específicos del padre por lo que fueron consideradas producto de autofecundación. Estos datos demuestran que los cruzamientos controlados realizados en cámaras de cruzamiento fueron altamente efectivos, arrojando algo más del 98% de eficiencia.



**Figura 6.** Prueba de paternidad realizado en una familia de *P. notatum* con marcadores de ISSR. Se observa el producto de la amplificación del cebador (GA)<sub>8</sub>-TC, separado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio. Las flechas indican dos bandas específicas del padre apomítico, ausente en la madre sexual, que fueron amplificadas por varios individuos de la progenie.

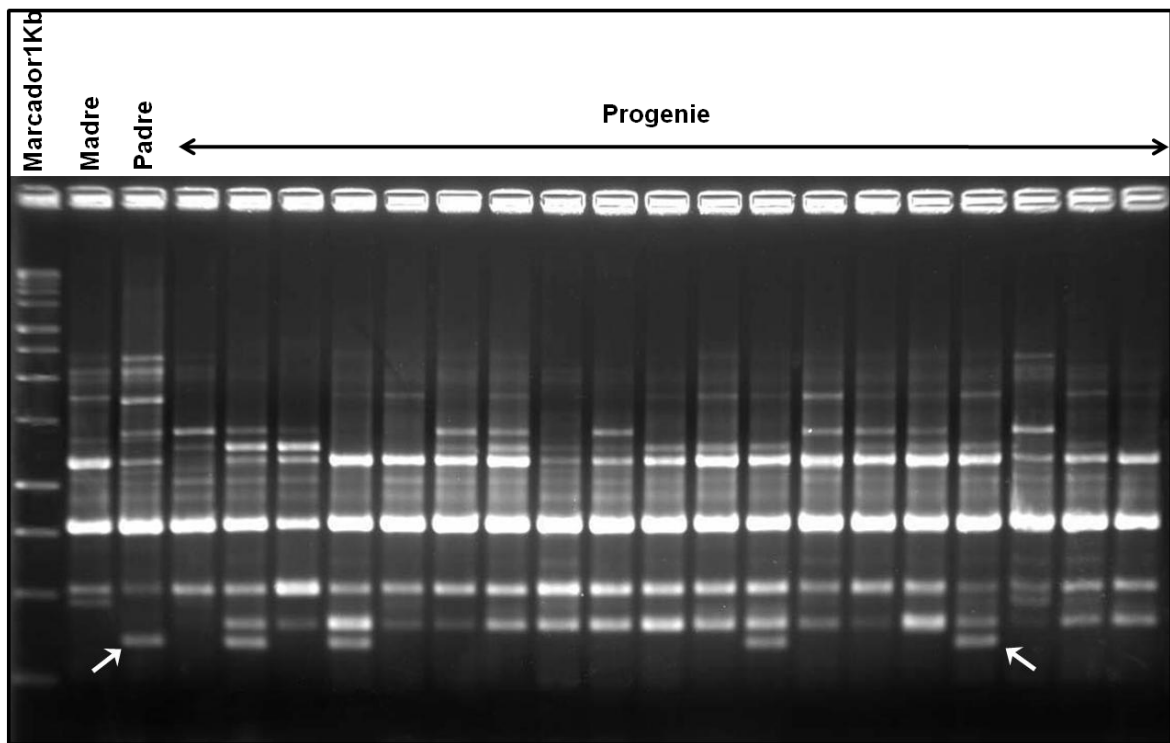
### I.5.3. Clasificación reproductiva de las progenes F<sub>1</sub>s

#### I.5.3.1 Análisis molecular

Se evaluó el modo de reproducción de los 572 individuos provenientes de las 12 familias F<sub>1</sub>s. Los dos marcadores RAPD ligados a la aposporia arrojaron resultados equivalentes, siendo ambos amplificados por un total de 131 individuos, por lo que fueron clasificados como apomíticos; mientras que los 441 individuos restantes no amplificaron ninguno de los marcadores ligados, por lo que fueron clasificados como de reproducción sexual (Tabla 3; Figura 7).

**Tabla 3.** Cruzamientos realizados entre genotipos tetraploides sexuales experimentales y genotipos tetraploides apomícticos naturales de *P. notatum*. Combinaciones parentales, número total de híbridos obtenidos y número de híbridos sexuales y apomícticos.

Combinación		Híbridos			
Parental femenino	Parental masculino	ID	Total	Sexuales	Apomícticos
SWSB	B229	A	42	37	5
SWSB	Q4064	B	46	32	14
SWSB	SV2893	C	48	38	10
SWSB	Q4294	D	49	40	9
SWSB	V14327	E	50	25	25
SWSB	Q3775	F	50	36	14
SWSB	TB86	G	48	43	5
Q4205	Q3776	H	50	42	8
Q4205	CyA1556	I	50	43	7
Q4205	Q4064	J	50	35	15
C4-4x	Q3838	K	39	29	10
C4-4x	Q4294	L	50	41	9
<b>Total</b>			<b>572</b>	<b>441</b>	<b>131</b>

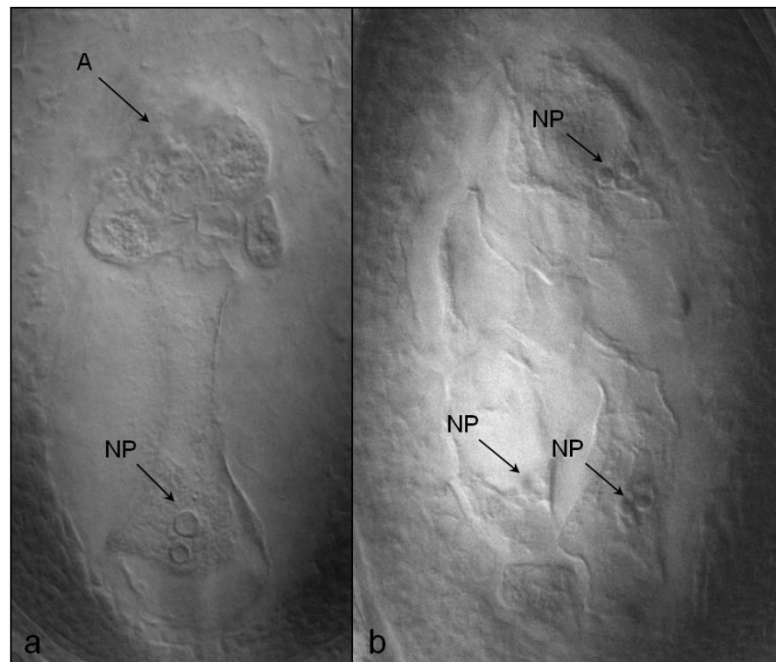


**Figura 7.** Patrón electroforético generado mediante el cebador UBC243 RAPD en una progenie segregante de *P. notatum* para el modo de reproducción. Las flechas indican la presencia del marcador ligado a la aposporia (UBC243-377).

### 1.5.3.2 Análisis citoembriológico

La observación de los sacos embrionarios maduros permitió la clasificación de los mismos en apospóricos, meióticos, abortados e inmaduros, a partir de la estructura diferencial entre estos grupos previamente detallada en la metodología. Esta evaluación se llevó a cabo sobre 7 individuos seleccionados aleatoriamente en cada una de las 12 familias híbridas, con excepción de la familia F que estuvo representada por 6 individuos, lo que hace un total de 83 plantas analizadas, habiéndose observado un mínimo de 20 pistilos por planta. Un total de 64 individuos mostraron únicamente sacos derivados de procesos meióticos (Figura 8a; Tabla I, Anexo) y un grado variable de sacos abortados o inmaduros incapaces de producir un embrión, por lo que fueron clasificados como plantas de reproducción sexual. Por otro lado, los 19 individuos restantes, mostraron un grado variable de potencial para producir descendencia por apomixis debido a la presencia de un número variable de óvulos portando sacos embrionarios apospóricos (Figura 8b; Tabla I, Anexo). Estos individuos

raramente portaban un único saco apospórico dentro de un óvulo, siendo lo más común encontrar de 2 a 5 de ellos en un mismo pistilo, habiéndose observado un caso extremo de hasta 12 sacos apospóricos en un mismo óvulo, aunque en estos casos muchos de ellos se encuentran subdesarrollados debido a la falta de espacio físico. Estos 19 individuos presentaron además un número variable de óvulos mixtos, portando todos ellos un único saco meiótico y uno, o comúnmente varios sacos apospóricos, indicando que son capaces de generar descendencia por apomixis. La clasificación reproductiva obtenida por esta técnica fue coincidente con la clasificación realizada mediante el marcador molecular en los 83 individuos analizados con ambas técnicas.



**Figura 8.** Pistilos diafanizados mostrando dos óvulos con sacos embrionarios maduros de *P. notatum*. **a)** Un saco embrionario de origen meiótico donde en este plano se observan las antípodas (A) y los núcleos polares (NP) (en otro plano se observa la ovocélula). **b)** Tres sacos embrionarios apospóricos en un mismo óvulo los cuales se diferencian por la presencia de sus núcleos polares (NP).

#### **I.5.4 Segregación por modo de reproducción en familias F<sub>1</sub>s**

En la Tabla 4 se detallan las proporciones de descendientes sexuales y apomícticos observados en las diferentes familias F<sub>1</sub>s. La segregación observada entre sexuales:apomícticos muestra un rango de variación de 1:1 a 8,6:1, siendo la proporción promedio para todas las familias de 3,4:1. En 11 familias se observó una supremacía de descendientes sexuales sobre los apomícticos; mientras que en la familia del cruzamiento SWSB × V14327 se observó una proporción equivalente entre sexuales y apomícticos (Tabla 4). La totalidad de las segregaciones observadas se ajustan a un modelo de herencia monogénico, en el cual la apomixis actuaría como dominante y en simple dosis (Aaaa). Sin embargo, en casi la totalidad de las familias se observó distorsión en la segregación que impidió que las proporciones entre sexuales y apomícticos se ajustaran a las proporciones esperables, tanto a una segregación de tipo cromosómica o cromatídica (Tabla 4). En el único caso que no se observó dicha distorsión fue en la familia E (SWSB × V14327) en la cual la proporción observada de 1:1 se ajusta perfectamente a un modelo de herencia monogénico, con apomixis dominante y segregación de tipo cromosómica.

**Tabla 4.** Cruzamientos parentales, proporción de segregación del modo de reproducción para cada combinación, probabilidad de ajuste entre proporción observada y esperada para una herencia tetrasómica, con segregación de tipo cromosómica o cromatídica.

Combinación				p-valor*	
Parental femenino	Parental masculino	ID	Proporción Sex:Apo	Segregación cromosómica (1:1)	Segregación cromatídica (15:13)
SWSB	B229	A	7,4:1	<0,001	<0,001
SWSB	Q4064	B	2,3:1	0,009	0,08
SWSB	SV2893	C	3,8:1	<0,001	0,002
SWSB	Q4294	D	4,4:1	<0,001	<0,001
SWSB	V14327	E	1:1	1	0,31
SWSB	Q3775	F	2,6:1	0,002	0,03
SWSB	TB86	G	8,6:1	<0,001	<0,001
Q4205	Q3776	H	5,2:1	<0,001	<0,001
Q4205	CyA1556	I	6,1:1	<0,001	<0,001
Q4205	Q4064	J	2,3:1	0,005	0,066
C4-4x	Q3838	K	2,9:1	0,002	0,01
C4-4x	Q4294	L	4,6:1	<0,001	<0,001

\* p-valor de la prueba de  $\chi^2$  para comparación entre la proporción sex:apo observada y esperada, según un tipo de herencia tetrasómica cuyos parentales sexuales y apomícticos poseen una constitución genotípica **aaaa** (sexual) y **Aaaa** (apomíctico).

## I.5.5 Población tetraploide sintética sexual

### I.5.5.1 Obtención de la PTSS

Un total de 29 híbridos  $F_1$  sexuales provenientes de 10 familias, generadas previamente por cruzamientos intraespecíficos entre tres genotipos tetraploides sexuales experimentales y 10 genotipos tetraploides apomícticos naturales de *P. notatum*, fueron todos cruzados entre sí (intercruzamiento). En la Tabla 3 figura el número de híbridos  $F_1$ s sexuales por familia que participaron de los intercruzamientos para la generación de la PTSS. Se seleccionaron entre 1 y 4 híbridos  $F_1$ s sexuales por familia, en función de la variabilidad fenotípica observada en



cada familia y también teniendo en cuenta el número de plantas que se encontraban en floración al mismo momento. La contribución de cada familia  $F_1$  en la conformación de la PTSS varió entre el 2 y 14% (Tabla 5). La producción de semillas mostró un rango entre 5% y 81%, con una media de 50,3%. Se llevaron al campo once descendientes de cada uno de los individuos inter cruzados, con excepción de los parentales G11, I29 y K19 que fueron representados por 10, 4 y 8 descendientes respectivamente (ver Tabla 5), lo que finalmente permitió la generación de una población sintética de 308 individuos (Figura 9).

**Tabla 5.** Identidad de las familias  $F_1$ , número de híbridos  $F_1$  sexuales incluidos en el inter cruzamiento, número de descendientes  $F_2$  aportados por cada familia  $F_1$  a la población sintética, y proporción de contribución de cada familia  $F_1$  a la población sintética.

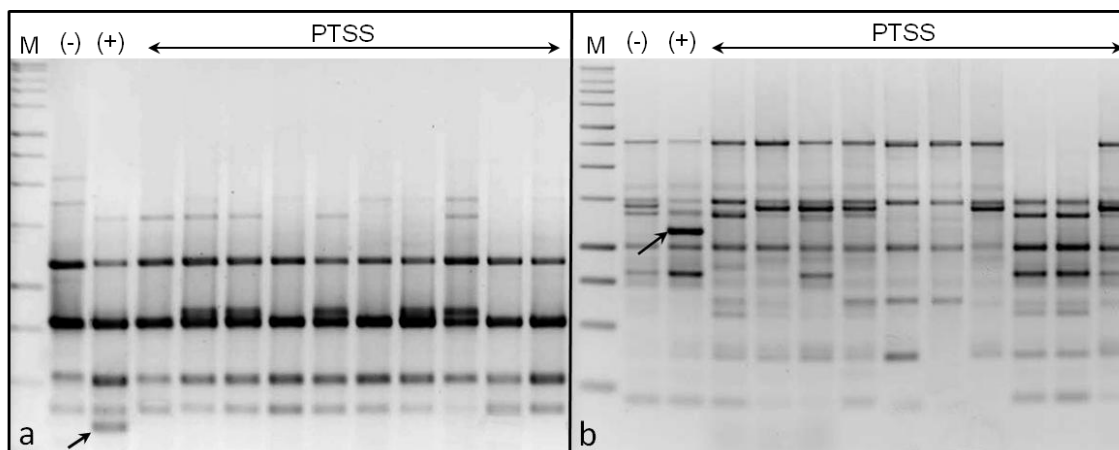
<b>Familia</b>	<b>Nº de <math>F_1</math> utilizadas en el inter cruzamiento</b>	<b>Nº de <math>F_2</math> incluidas en la PTSS</b>	<b>Contribución a la PTSS (%)</b>
<b>A</b>	4	44	14,3
<b>C</b>	3	33	10,7
<b>E</b>	3	33	10,7
<b>F</b>	2	22	7,1
<b>G</b>	3	32	10,4
<b>H</b>	4	44	14,3
<b>I</b>	2	15	4,9
<b>J</b>	4	44	14,3
<b>K</b>	1	8	2,6
<b>L</b>	3	33	10,7
<b>Total</b>	29	308	100



**Figura 9:** Parcela de cultivo de las plantas de la PTSS en el campus de la FCA-UNNE.

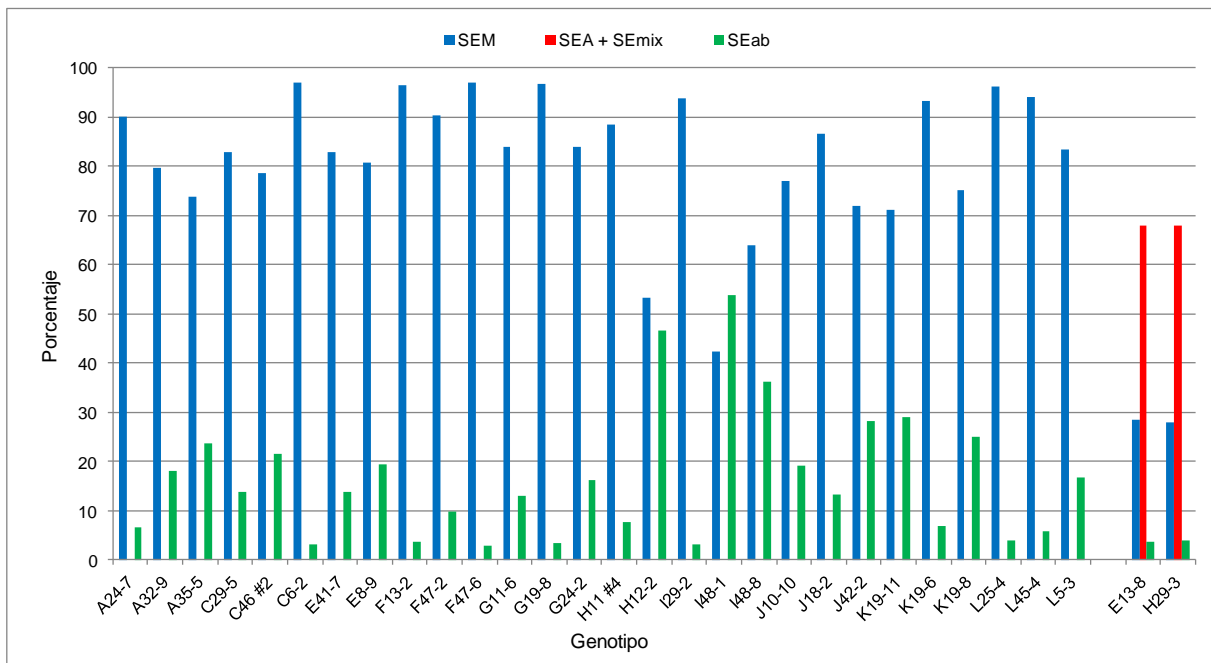
### **I.5.5.2 Determinación del modo de reproducción de la PTSS**

Un total de 306 plantas que conformaron la PTSS no amplificaron ninguno de los dos marcadores de RAPD (UBC243-377 y UBC259-1157) completamente ligados al carácter apomixis (Figura 10). Sin embargo, dos individuos de la PTSS amplificaron los mismos fragmentos de 377 pb y 1157 pb con los cebadores UBC243 y UBC259, respectivamente. Para estar seguro de que no hubo un error se repitió la amplificación con ambos cebadores y el resultado fue el mismo.



**Figura 10.** Perfiles moleculares generados a partir de electroforesis en geles de agarosa al 2% con marcadores de RAPD 100% ligados al carácter apomixis en *P. notatum*. **a)** patrón de amplificación del primer de RAPD UBC243 en 10 plantas de la PTSS. La flecha indica el marcador ligado a la aposporia (377 pb). **b)** patrón de amplificación generado con el cebador de RAPD UBC259 en 10 plantas de la PTSS. La flecha indica el marcador ligado a la aposporia (1157 pb). M: Marcador de peso molecular 1kb; (-): control sexual; (+): control apomíctico.

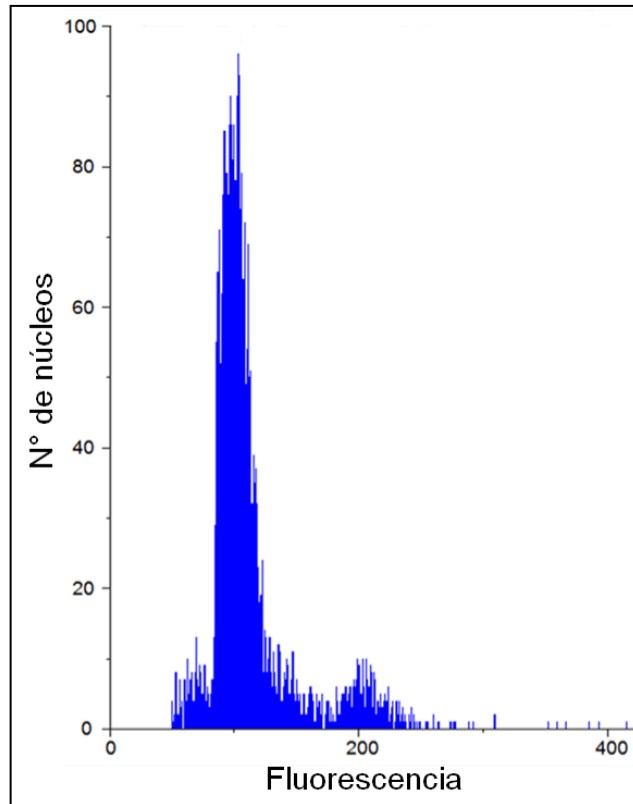
El análisis citoembriológico llevado a cabo para corroborar los resultados moleculares se realizó sobre 28 plantas tomadas al azar de la PTSS, más las dos plantas (E13 #8 y H29 #3) que habían amplificado los marcadores RAPD ligados a la aposporia. Los resultados de la clasificación de los sacos embrionarios observados en las 30 plantas analizadas se grafican en la Figura 8. Las plantas E13 #8 y H29 #3 mostraron un 68% de óvulos con sacos embrionarios de origen apospórico, junto a un 29 y 28% de óvulos con sacos embrionarios meióticos y un 3 y 4% de sacos abortados respectivamente (Figura 11).



**Figura 11.** Pistilos observados en 30 plantas de la PTSS. SEM: óvulos portando sacos embrionarios meióticos; SEA + SEMix: óvulos portando sacos embrionarios apospóricos más óvulos portando sacos embrionarios meióticos y apospóricos; SEab: Sacos embrionarios abortados.

### I.5.5.3 Determinación del nivel de ploidía de la PTSS

Se realizó la determinación del nivel de ploidía sobre una muestra de 30 individuos de la población sintética mediante citometría de flujo. Las muestras de 5 plantas más el control tetraploide produjeron picos de fluorescencia al mismo nivel del control tetraploide (cv. Argentine) (Figura 12), lo que confirma que todos los individuos evaluados son tetraploides. Esto permite inferir que todos los individuos de la población serían tetraploides ( $2n=4x=40$ ) demostrando que el nivel de ploidía no fue alterado tras los dos ciclos de recombinación, partiendo de materiales tetraploides sexuales de origen experimental como progenitores femeninos, y descartando además la posibilidad de encontrar individuos polihaploides ( $2n=2x=20$ ) y neopoliploides ( $2n > 4x$ ) en la PTSS.



**Figura 12.** Histograma obtenido por citometría de flujo a partir de un grupo de 5 plantas más el control tetraploide. El pico más alto corresponde al nivel  $2n=4x=40$  y el más bajo a la fase G2 de la división celular.

## I.6 DISCUSIÓN

El mejoramiento por hibridación en especies apomícticas requiere contar con germoplasma sexual al mismo nivel de ploidía del apomíctico. A su vez, este germoplasma sexual debe reunir la máxima variabilidad genética posible para garantizar el éxito de los programas de mejoramiento a partir de la selección de genotipos superiores por su desempeño individual o por su habilidad combinatoria.

En este capítulo se evaluó la eficiencia en la hibridación, en diferentes combinaciones entre genotipos tetraploides sexuales experimentales y apomícticos naturales de *P. notatum*; como así también la segregación del modo de reproducción en los híbridos de las diferentes familias. Posteriormente, se realizó la recombinación entre individuos sexuales fenotípicamente diversos, a partir de las diferentes familias F<sub>1</sub>s, para conformar una población sintética sexual, la cual fue caracterizada desde el punto de vista citológico y de su modo de reproducción.

### I.6.1 Eficiencia en la hibridación

Los porcentajes de producción de semillas observados fueron similares a los obtenidos por Acuña et al. (2009; 2011) en condiciones de cruzamientos controlados entre genotipos tetraploides sexuales y apomícticos de *P. notatum*. En esta tesis se obtuvo un valor promedio de 27,5% en la producción de semillas, mientras que Acuña et al. (2009; 2011) obtuvieron valores del 23 y 30%, respectivamente. Por otra parte, el porcentaje promedio de germinación observado (61,3%), luego del escarificado de las semillas, fue muy similar al valor observado (56%) por Acuña et al. (2009); sin embargo en otro trabajo de Acuña et al. (2011) se obtuvieron valores del 82% para la germinación de semillas provenientes de cruzamientos entre genotipos tetraploides sexuales y apomícticos de *P. notatum*.

La prueba de paternidad para determinar el origen híbrido de las progenies, mediante el empleo de marcadores moleculares de ISSR, fue una metodología efectiva, rápida y sencilla ya que permitió identificar a los híbridos de las diferentes familias en etapas tempranas del desarrollo. Los marcadores de ISSR tienen la ventaja de presentar un alto grado de polimorfismos, son reproducibles, y no requieren del uso de equipamiento sofisticado y oneroso para su detección (Fang y Roose, 1997; Moreno et al., 1998) lo que los hace muy apropiados para este tipo de análisis. La prueba de paternidad realizada con marcadores

moleculares es una herramienta eficiente para la detección de progenies híbridas como ya fue demostrado en *P. notatum* por Martínez et al. (2007) usando marcadores de RAPD, y por Ortiz et al. (1997) y Rebozio et al. (2012) usando marcadores de AFLP. La prueba de paternidad con marcadores de RAPD también fue utilizada con éxito en la identificación del progenitor masculino de un híbrido natural hipotriploide ( $2n-1=3x=29$ ) de *Paspalum* (Acuña et al., 2004). Sin embargo, los marcadores RAPD poseen el problema de la falta de reproducibilidad entre laboratorios, y en el caso de los AFLP, si bien son reproducibles, son mucho más laboriosos de obtener, por lo que ambas técnicas han sido reemplazadas paulatinamente por otros marcadores más confiables como los microsatélites o ISSR utilizados en esta tesis.

### **I.6.2 Segregación por el modo de reproducción en progenies F<sub>1</sub>**

La clasificación por el modo de reproducción en los híbridos de las 12 familias de *P. notatum* fue realizada mediante el empleo de dos marcadores de RAPD 100% ligados a la aposporia (Martínez et al., 2003). El análisis con los marcadores RAPD fue realizado en las primeras etapas del desarrollo cuando los híbridos se encontraban en estadio de plántulas. Esto fue corroborado luego mediante un análisis citoembriológico, por observación de los gametofitos femeninos maduros, en etapas posteriores del desarrollo de los híbridos (floración) sobre una muestra representativa de la población. Ambos marcadores RAPD (UBC243-377 y UBC259-1157) fueron amplificados por todos los híbridos que resultaron ser apomícticos. La segregación por el modo de reproducción en las diferentes familias mostró un rango de variación muy amplio con valores entre 1:1 y 8,6:1 entre sexuales:apomícticos (Tabla 4). La mayor variación en los rangos de segregación se observaron en las progenies en las cuales el progenitor femenino (madre) fue el genotipo SWSB. Por otra parte, los valores extremos en el rango de segregación se dieron cuando SWSB fue cruzado con los genotipos apomícticos V14327 y TB86, respectivamente; los cuales no fueron empleados como padres con los otros progenitores sexuales. Lo interesante fue que estos valores extremos se lograron con dos genotipos que provienen de una región geográfica muy cercana. V14327 fue colectado en el sureste de Brasil cerca del límite con Uruguay; mientras que TB86 proviene del noreste de Uruguay cerca del límite con Brasil (Figura 4), ambos puntos de colección se encuentran distanciados a algo menos de 80 Km. Si consideramos la totalidad de los híbridos para todas las familias observamos que la proporción entre sexuales vs.

apomícticos arroja un valor medio de 3,4:1 (Tabla 2). Este valor es muy similar al observado en otros análisis de segregación del modo de reproducción en híbridos de *P. notatum* (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Acuña et al., 2009; 2011). Martínez et al., (2001) analizaron la segregación de la apomixis en varias familias  $F_1$ ,  $F_2$ s y retrocruzas entre genotipos tetraploides sexuales y apomícticos de *P. notatum* y encontraron valores medios de 2,8:1 a 3,2:1. En dicho trabajo se analizó una sola progenie  $F_1$ , proveniente del cruzamiento entre un genotipo tetraploide sexual (Q4188) y otro apomíctico (Q4117), y ambos genotipos parentales no fueron empleados en los cruzamientos de esta tesis. Por otra parte, en esta tesis se analizaron 12  $F_1$ s diferentes, provenientes de cruzamientos entre tres genotipos tetraploides sexuales y 10 genotipos apomícticos. Los genotipos apomícticos Q4064 y Q4294 fueron los únicos utilizados como padres en dos combinaciones con dos genotipos sexuales. Las dos familias en las cuales el genotipo apomíctico Q4064 participó como padre mostró idéntico rango de segregación entre sexuales:apomícticos (2,3:1). Un dato a tener en cuenta fue que los dos genotipos sexuales empleados como madres, en los cruzamientos por Q4064, poseen una alta similitud genética, ya que Q4205 es producto de autofecundación de SWSB (Quarin et al., 2003). Por su parte, cuando se empleó como padre el genotipo apomíctico Q4294, en una familia se observó un rango de segregación entre sexuales:apomícticos de 4,4:1 y en la otra de 4,6:1. A diferencia del genotipo apomíctico Q4064, el cual fue cruzado por dos genotipos sexuales genéticamente muy similares, en este caso Q4294 fue cruzado por dos madres sexuales con orígenes genéticos diferentes. En un caso se trata del genotipo sexual SWSB, cuyo origen es producto de la hibridación entre un genotipo sexual y otro apomíctico (Burton y Forbes, 1960), y en el otro del genotipo C4-4x que se obtuvo por duplicación cromosómica de un diploide sexual (Quarin et al., 2001). A pesar de ello, se observa que las segregaciones entre sexuales:apomícticos fueron casi idénticas, lo que estaría indicando que las proporciones en la segregación dependen más del genotipo apomíctico empleado como padre en los cruzamientos que de la combinación materna:paterna.

Todos los rangos de segregación observados entre sexuales:apomícticos, a excepción de una sola combinación en la cual se observó una proporción 1:1, difieren del rango esperado para un modelo monogénico, dominante y con herencia tetrasómica como fue observado en otros géneros de gramíneas apomícticas (Savidan, 1981; Sherwood et al., 1994; Do Valle et al., 1994). Según ese modelo, la segregación esperada debería ser 1:1 o 15:13 entre sexuales:apomícticos, según se considera que exista segregación al azar de los cromosomas o de las cromátides, respectivamente (ver Martínez et al., 2001). Sin embargo, en esta tesis casi todos los rangos de segregación fueron a favor de las plantas sexuales



como ya ha sido observado en *P. notatum* en diferentes estudios (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Acuña et al., 2009; 2011). Esta distorsión en la segregación observada, la cual genera mayores proporciones de descendientes sexuales que apomícticos, fue explicada por un mecanismo de letalidad gamética del propio locus de la apomixis o de factores ligados al mismo, la cual se manifiesta con penetrancia incompleta (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004). En el trabajo de Stein et al. (2004) se observó una distorsión en la proporción de sexuales:apomícticos de 6,5:1, la cual es muy similar a las segregaciones observadas en algunas combinaciones de esta tesis (Tabla 2). Los autores de dicho trabajo relacionan la distorsión en la segregación en *P. notatum* con una posible inversión cromosómica en la región responsable de la aposporia y además observaron apareamiento preferencial de los cromosomas (herencia disómica) en el segmento cromosómico relacionado con el locus de la aposporia. La segregación 1:1 observada en la combinación SWSB × V14327 fue el único caso reportado hasta ahora de proporción equivalente entre sexuales y apomícticos en *P. notatum*. En trabajos previos, todos los análisis de segregación de la apomixis en *P. notatum* mostraron proporciones con mayoría de progenies sexuales (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Acuña et al., 2009; 2011), lo que refuerza la hipótesis de la distorsión en la segregación del locus de la apomixis relacionada a factores letales ligados a éste. Sin embargo, el resultado inédito de segregación 1:1 observado en la combinación en la que se empleó el padre apomíctico V14327 presupone la ausencia del mecanismo de letalidad en dicho genotipo. Esto no pudo ser comprobado a través de otras combinaciones en las cuales V14327 haya intervenido como padre ya que sólo fue empleado en una sola oportunidad. Para ello, será necesario realizar nuevos cruzamientos por otros genotipos sexuales para corroborar si también se manifiestan proporciones equivalentes entre sexuales y apomícticos. La hipótesis que plantea que la proporción en la segregación entre híbridos sexuales y apomícticos depende del genotipo apomíctico empleado como padre y no de la combinación parental, fue demostrada en algunas combinaciones realizadas en esta tesis. En los dos casos en los cuales un mismo padre apomíctico fue utilizado en cruzamientos por dos madres sexuales diferentes, se observó el mismo rango de segregación entre sexuales vs apomícticos (Q4064 y Q4092, Tabla 2). Esto nos hace presuponer que la proporción 1:1 observada en la progenie en la cual se utilizó como padre apomíctico al genotipo V14327 se puede repetir empleando otros genotipos sexuales como madre.

Varios estudios de la meiosis en genotipos tetraploides de *P. notatum* han reportado irregularidades en la misma debidas principalmente a la formación de puentes de cromatina, cromosomas rezagados, micronúcleos, formación de gametos desbalanceados, entre otras

(Forbes y Burton, 1961; Stein et al., 2004; Podio et al., 2012), siendo éstas más frecuentes en tetraploides apomícticos que en sexuales. Stein et al. (2004) y Podio et al. (2012) atribuyen la formación de puentes de cromatina a la presencia de una inversión cromosómica en la región donde se encuentra el locus de la apomixis. Los autores sugieren que ésta inversión sería la responsable de las distorsiones en la segregación de la apomixis. Un estudio de meiosis realizado por De Moraes Fernandes (1973), en un germoplasma de *P. notatum* colectado en Brasil, logró identificar 4 grupos de genotipos, según el ambiente en el que se desarrollan, sus características fenotípicas y el comportamiento en la meiosis. Uno de estos grupos, denominado tipo Capivari, agrupaba a todos los individuos pertenecientes o cercanos a esa localidad de Brasil, compartiendo todos ellos la característica de presentar una meiosis prácticamente regular con casi la totalidad de las células evaluadas portando bivalentes. En un estudio posterior, Dahemer et al. (2008) estudiaron la meiosis de 45 genotipos de *P. notatum*, provenientes de distintos puntos de colección de Brasil, reportando que los genotipos provenientes de Capivari (entre los cuales también fue analizado el genotipo V14327 usado en este trabajo) y de la localidad lindera Mostardas, presentaban una meiosis regular con 20 bivalentes en casi todas o todas las células evaluadas, dando lugar a gametos balanceados en todos los casos. Este tipo de asociaciones cromosómicas no es muy común en una especie determinada como autotetraploide según técnicas citológicas y moleculares (Forbes y Burton, 1961; Stein et al., 2004). Este hecho podría interpretarse de dos maneras, por un lado que los genotipos de esa región son de origen aloploiploide, o por otro, que estos individuos hayan atravesado un proceso de “diploidización” (Comai, 2005) que como consecuencia de ello posean una meiosis regular. Cualquiera sea el caso, la ausencia de irregularidades en la meiosis (ausencia de puentes de cromatina y gametos desbalanceados principalmente) nos hace pensar que estos genotipos carecen de la inversión cromosómica que daría lugar a letalidad gamética, provocando las distorsiones en la segregación de la apomixis previamente descrita. Por su parte, la presencia de asociaciones bivalentes en todos los casos, darían lugar a una segregación disómica de 1:1, lo que explicaría la segregación de la apomixis en la combinación E en la cual participó como progenitor masculino el genotipo V14327.

La determinación del modo de reproducción mediante marcadores ligados a la aposporia resultó ser una metodología muy efectiva en la identificación, en etapas tempranas del desarrollo, de los híbridos que son de reproducción sexual y aquellos que se reproducen por apomixis. Sin embargo, esta herramienta no permite distinguir entre individuos con distintos niveles de expresión de la apomixis. La observación directa de sacos embrionarios maduros, además de corroborar el análisis molecular, podría ser una técnica complementaria a la

selección asistida por el marcador ligado, debido a que permite estimar los niveles de expresividad de la apomixis, dando lugar de esa manera a la selección de híbridos altamente apomícticos.

### **I.6.3 Obtención de la población tetraploide sintética sexual**

La producción de semillas de los híbridos  $F_1$  sexuales inter cruzados fue levemente superior a la observada en los genotipos tetraploides sexuales experimentales usados para su obtención y a los reportados por Acuña et al. (2007; 2009). Por otra parte, en los híbridos  $F_1$  sexuales que fueron utilizados para los cruzamientos que dieron origen a la población tetraploide sintética sexual se observó una mayor variabilidad, probablemente debida a su origen genético diverso.

Las 10 familias  $F_1$  generadas a partir del cruzamiento entre tres genotipos tetraploides sexuales experimentales y 10 genotipos tetraploides apomícticos naturales de *P. notatum* contribuyeron en proporciones variables a la conformación de la población tetraploide sintética sexual. El porcentaje de contribución de cada familia varió entre 2 y 14%, y estuvo en función de la variabilidad fenotípica observada en cada una de ellas. Esto, debería permitir que toda la variabilidad presente en los genotipos apomícticos naturales, usados como parentales, sea transferida a la  $F_1$  y posteriormente recombinada mediante el inter cruzamiento, generando de esta manera nuevas combinaciones génicas potencialmente útiles. Este procedimiento demostró ser factible y de utilidad en el programa de mejoramiento de *Brachiaria* llevado a cabo en Colombia (Miles y Valle, 1996; Miles y Escandon, 1997; Miles et al., 2004; Miles et al., 2006) donde luego de 6 ciclos de selección recurrente se logró generar una población sexual sintética vigorosa y resistente a 3 especies de cicádidos, dando lugar a un germoplasma sexual de utilidad en el mejoramiento de la especie.

En vista de los casos reportados de heterosis en *P. notatum* (Acuña et al., 2009; 2011; Zilli et al., 2015), probablemente un esquema de selección recurrente por aptitud combinatoria (Hull, 1945; Comstock et al., 1949) sería el más adecuado para este nuevo germoplasma sexual, ya que permitiría acumular efectos genéticos aditivos y no aditivos, a partir de la selección, en base al desempeño de las progenies obtenidas en cruzamientos de prueba con genotipos apomícticos superiores. A su vez, los híbridos altamente apomícticos obtenidos en cada ciclo podrán ser evaluados como potenciales nuevos cultivares. Este

esquema tiene como fin último la obtención de híbridos apomícticos altamente heteróticos que se mantendrán inalterados en sucesivos ciclos de cultivo gracias a la apomixis (Miles, 2007). La selección de híbridos apomícticos en esta especie se verá facilitada debido a que se dispone de marcadores moleculares confiables para determinar el modo de reproducción en etapas tempranas del desarrollo, lo que permitiría ahorro de tiempo y recursos mediante la evaluación a campo de progenies constituidas únicamente por híbridos apomícticos.

Otro posible esquema de mejoramiento a adoptar para la PTSS es el denominado selección recurrente fenotípica desarrollado por Burton (1982) para el germoplasma diploide sexual de *P. notatum*. Este esquema demostró ser muy útil para aumentar el rendimiento de biomasa aérea, aumentar la energía germinativa de las semillas y extender el periodo vegetativo, a partir de la selección por menor sensibilidad al fotoperiodo. El éxito de este método de mejora queda en evidencia gracias a la obtención de varias poblaciones mejoradas entre las que se destacan Tifton 9, Tifton 18, Tifton 23, TifQuik y UF-Riata (Blount y Acuña 2009). Un procedimiento similar podría ser de utilidad para la obtención de poblaciones o variedades tetraploides sexuales mejoradas para su liberación al mercado, como una alternativa a la búsqueda de híbridos apomícticos superiores, o mejor aún como un esquema anexo para aumentar la eficiencia del programa.

La clasificación reproductiva por medio de los marcadores moleculares de RAPD ligados a la apomixis arrojó resultados idénticos a los obtenidos por visualización directa de sacos embrionarios maduros. Considerando que la herencia del modo de reproducción en la especie fue profundamente estudiada y es ampliamente aceptado que la apomixis se comporta como un factor mendeliano simple y dominante, mientras la reproducción sexual es un carácter recesivo (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Acuña et al., 2009; Acuña et al., 2011), la presencia de dos individuos de reproducción apomíctica en una población sintética, originada a partir del intercrucamiento entre 29 individuos sexuales, probablemente se deba a contaminación con polen foráneo durante el intercrucamiento, y no a otro tipo de control genético del carácter. El hecho de haber eliminado estos 2 individuos fuera de tipo, permitió depurar la población sintética garantizando su reproducción sexual.

La evaluación del nivel de ploidía sobre una muestra del 10% de la población permitió inferir que todos los individuos de la población sintética se encuentran al nivel tetraploide, demostrando que el nivel de ploidía se mantuvo constante, después de dos ciclos de recombinación, partiendo de genotipos sexuales experimentales.

## I.7 CONCLUSIONES

- El método de cruzamiento mediante emasculación previa del parental femenino demostró ser altamente eficiente para la obtención de híbridos en *P. notatum*.
- La mayoría de las familias segregaron para el modo de reproducción con supremacía de descendientes sexuales, lo cual confirma resultados previos que determinaron que la apomixis si bien se comporta como un carácter dominante segrega de manera distorsionada
- La segregación equivalente observada entre sexuales y apomícticos en una de las familias generadas es un caso inédito para la especie y probablemente se deba a que el genotipo masculino apomíctico empleado carece de él o los factores de letalidad que provocan dichas distorsiones.
- Las similares proporciones observadas entre sexuales y apomícticos, en combinaciones con idéntico progenitor masculino, presuponen que las segregaciones están condicionadas al genotipo apomíctico utilizado como padre y no a la combinación materna:paterna. Esto será necesario corroborar con un mayor número de combinaciones para poder aceptar esta hipótesis.
- La utilización de híbridos sexuales provenientes de familias  $F_1$  con origen genético diverso resultó ser una metodología apropiada para la generación de una población tetraploide sintética sexual en *P. notatum*.
- Todos los individuos de la población sintética sexual fueron tetraploides lo cual demuestra que a pesar de su origen diverso no se produjeron alteraciones en su nivel de ploidía.
- El comportamiento sexual de todos los individuos de la población tetraploide sintética corroboran que la sexualidad se comporta como un carácter recesivo en la especie.

## CAPÍTULO II

# DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA POBLACION TETRAPLOIDE SINTÉTICA SEXUAL

## II.1 INTRODUCCIÓN

### II.1.1 Variabilidad genética en poblaciones apomícticas

En un principio, se pensaba que la apomixis llevaría a las especies a un callejón sin salida desde el punto de vista de la evolución (Darlington, 1939; Stebbins, 1950); sin embargo, se ha demostrado que las poblaciones de especies apomícticas presentan una considerable diversidad genética, la cual podría deberse al flujo génico desde poblaciones diploides sexuales simpátricas (Daurelio et al., 2004; Garcia et al., 2007; Sartor et al., 2013) a través de puentes triploides (Quarin et al., 1992), sexualidad residual en individuos apomícticos (Rebozio et al., 2011; Sartor et al., 2013) o mutaciones (Hörandl y Paun, 2007). A pesar de ello, es aceptado que éstas poblaciones presentan uno o pocos genotipos predominantes, probablemente debido a que éstos tienen una mejor adaptación a nichos ecológicos específicos, por lo que queda en evidencia que es esperable una mayor diversidad entre poblaciones que dentro de ellas (Gornall, 1999; Richards, 2003; Paun et al., 2006; Gutierrez-Ozuna et al., 2009). Un estudio reciente, realizado en poblaciones naturales de *P. simplex*, ha reportado que el 85% de la diversidad genética en los apomícticos es explicado por variaciones entre poblaciones, mientras que solo el 15% está dentro de las poblaciones (Brugnoli et al., 2014). Resultados similares fueron reportados por Paun et al. (2006), García et al. (2007) y Sartor et al. (2013) en poblaciones naturales de varias especies apomícticas. Reyno et al. (2012) realizaron un estudio de variabilidad genética en colecciones naturales de *P. notatum* en Uruguay, a partir de marcadores moleculares de ISSR, reportando una distribución casi equitativa de la variación intra- e interpoblaciones; sin embargo, los autores aclaran que esto probablemente se deba al hecho de que las poblaciones estuvieron representadas por unos pocos individuos (1 a 6), los cuales a su vez fueron colectados en base a variaciones fenotípicas para su uso en un programa de mejora, por lo que la variabilidad intra-poblacional podría estar sobreestimada por el método de muestreo.

El conocimiento de la diversidad genética es de gran importancia en el planeamiento de programas de mejoramiento y para la conservación de los recursos genéticos de las especies vegetales (Cidade et al., 2008). Estos estudios pueden ser realizados mediante el uso de marcadores morfológicos y/o moleculares, siendo los primeros extensamente utilizados, hasta antes del desarrollo de las técnicas de análisis molecular, y posteriormente fueron paulatinamente reemplazados por estos últimos, debido al limitado número de marcadores morfológicos informativos para una población y a los problemas de variación según el ambiente. Los primeros estudios de diversidad molecular fueron realizados con aloenzimas y proteínas de reserva, los cuales presentaban la ventaja de ser codominantes, pero aun así, fueron reemplazados paulatinamente por marcadores más informativos como los basados en la variación del ADN. Estos últimos pueden ser divididos en 5 principales categorías:

1. Ensayos basados en la digestión del ADN con endonucleasas y posterior hibridación, como los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Botstein et al., 1980).
2. Ensayos realizados a partir de la amplificación del ADN, como los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) (Fang y Roose, 1997).
3. Ensayos realizados mediante la amplificación selectiva de fragmentos de restricción del ADN, denominados AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995).
4. Evaluaciones basadas en la amplificación de secuencias repetitivas del ADN, de 1 a 6 pb de longitud, conocidos como microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989).
5. Ensayos mixtos basados en la detección de mutaciones puntuales a nivel de pares de bases, denominados SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Lindblad-Toh et al., 2000).

En los últimos tiempos, el uso de la secuenciación genómica se ha extendido rápidamente, debido a la gran cantidad de información obtenida por estas técnicas y a los avances tecnológicos que permitieron que este tipo de estudios sean cada vez menos costosos y se pongan al alcance de un mayor número de laboratorios. Esta nueva tecnología se ha extendido rápidamente en las especies de mayor interés agronómico, como los cultivos mayores y hortícolas; sin embargo, aún no está muy difundido en los cultivos de interés forrajero, y en particular en gramíneas megatérmicas como es el caso de *P. notatum*.

Varios estudios de diversidad genética usando marcadores moleculares han sido realizados en poblaciones naturales de *P. notatum*. Daurelio et al. (2004) determinaron mediante el uso de marcadores RAPD que las poblaciones apomícticas simpátricas a diploides sexuales presentaban mayor diversidad que aquellas alopátricas, y plantearon la hipótesis de la existencia de un flujo génico entre éstas poblaciones, probablemente gracias a la formación de individuos triploides apomícticos, los cuales actúan como puente para la generación de nuevos tetraploides, mediante la formación de híbridos BIII (Quarin et al., 1992). Espinoza et al. (2006) no lograron detectar una alta diversidad genética, mediante el uso de AFLP, en una colección de germoplasma de 31 individuos apomíctico de *P. notatum*, como tampoco encontraron correlación entre distancia genética y geográfica. Cidade et al. (2008) y Reyno et al., (2012) encontraron que los marcadores de ISSR logran relevar un alto grado de diversidad genética en colecciones de *P. notatum* de Brasil y Uruguay, respectivamente. En ambos trabajos se encontró una muy baja o nula correlación entre distancia genética y geográfica.

Morgante & Olivieri (1993) identificaron un gran número de regiones repetitivas de microsatélites en el genoma vegetal, principalmente AT, estando estas regiones ubicados en promedio una cada 50 Kb, lo que las convierte en marcadores de gran utilidad en estudios poblacionales, entre otros usos. Cidade et al. (2009; 2010) lograron generar varios cebadores de microsatélites para *P. notatum*, destacando el alto contenido de información polimórfica (PIC) revelado por este tipo de marcadores y su utilidad para ser usados en especies afines a *P. notatum* (Cidade et al., 2010). Los marcadores de SSR tienen la ventaja de ser reproducibles (Jones et al., 1997), lo que permite obtener resultados comparables entre diferentes laboratorios, co-dominantes (Shattuck-Eidens et al., 1990; Senior & Heun, 1993; Senior et al., 1996) y multialélicos (Ching et al., 2002), lo que los convierte en marcadores altamente informativos y por lo tanto de gran utilidad en la evaluación de variabilidad genética.

Otra herramienta de utilidad para evaluar la variabilidad genética, sobre todo en estudios dirigidos al mejoramiento vegetal, es el uso marcadores morfológicos y agronómicos, que si bien no son numerosos y en general se encuentran influenciados por variaciones ambientales, tienen la ventaja de brindar información de gran utilidad en la identificación y selección de genotipos superiores en programas de mejoramiento. Algunos caracteres morfológicos como el largo y ancho de hoja, y habito de crecimiento, fueron útiles para diferenciar las variedades botánicas de *P. notatum* var. *saurae* (2x) y *P. notatum* tetraploide (4x) (Blount y Acuña, 2009). De Moraes Fernandes et al. (1973) utilizaron características



citológicas, junto a variables como hábito de crecimiento, largo y ancho de hoja, pilosidad de la lámina, longitud de racimos, tipo de lígula y características de las espiguillas para diferenciar 4 grupos taxonómicos de *P. notatum* del estado de Rio Grande do Sul (Brasil). Barreto (1974) y Cando Dorow (1993) utilizaron caracteres similares para diferenciar formas típicas de la especie en Brasil; sin embargo, debido a la alta variabilidad presente en la especie y al escaso número de individuos analizados, estos grupos no están claramente delimitados, generando algunas confusiones en su determinación (Cidade et al., 2008; 2013). Cidade et al. (2013) evaluaron la diversidad morfológica de un grupo de individuos de *P. notatum* colectados en Brasil, en base a variables vegetativas (largo y ancho de vaina, largo y ancho de lámina) y reproductivas (altura de inflorescencia, número de racimos, largo y ancho de espiguilla), reportando una amplia diversidad para todos los caracteres evaluados, lo que dificulta su agrupamiento en grupos taxonómicos informales. De todas formas, los autores lograron identificar 3 grandes grupos taxonómicos (*saurae*, *latiflorum* y *notatum*), principalmente en base a las diferencias en largo y ancho de las espiguillas, ya que el resto de los caracteres presentaban una distribución más continua y solapamientos entre grupos.

Estos avances en la caracterización de la diversidad genética, a nivel de poblaciones naturales y bancos de germoplasma, sumado al desarrollo de marcadores moleculares confiables y de alto valor en la detección de variabilidad genética, fueron considerados antecedentes importantes para llevar a cabo la evaluación de la transferencia de la diversidad presente en el germoplasma tetraploide apomíctico hacia la población tetraploide sintética sexual, y la evaluación de su variabilidad a nivel molecular y morfo-agronómico, lo cual permitirá generar información de utilidad para los programas de mejoramiento en la especie.

## II.1.2 Fertilidad

*Paspalum notatum* presenta predominantemente dos citotipos con modos de reproducción bien contrastantes. Por un lado, el citotipo diploide ( $2n=2x=20$ ), conocido como variedad *saurae*, presenta reproducción sexual y son alógamos por autoincompatibilidad (Burton 1955), presentando niveles variables de producción de semillas en autopolinización forzada (Acuña et al., 2007). El citotipo tetraploide ( $2n=4x=40$ ), se reproduce por apomixis apospórica pseudógama (Burton 1948), y son autofértiles, con niveles similares de

producción de semillas, tanto en autopolinización como en polinización cruzada. Estas asociaciones entre autofertilidad y apomixis por un lado, y sexualidad y autoesterilidad por el otro, fueron previamente reportadas en otras especies como *Brachiaria brizantha*, *B. ruziziensis* y *B. decumbens* (Ngendahayo et al., 1988), recibiendo el fenómeno una revisión en profundidad por parte de Hörandl (2010), quien menciona que dicha asociación les otorga a las especies apomícticas pseudógamas ciertas ventajas en la colonización de nuevos nichos ecológicos, debido a la posibilidad de producir descendencia uniparental, al igual que ocurre en aquellas especies apomícticas autónomas.

Acuña et al. (2007) describieron cuatro características principales para seleccionar un adecuado parental femenino destinado a cruzamientos con genotipos apomícticos: i) el mismo nivel de ploidía, ii) alto vigor, iii) alta expresividad de la sexualidad, y iv) una razonable producción de semillas. Además, los autores plantearon la importancia de una quinta característica, alta autoesterilidad, para evitar la posibilidad de obtener descendencia por autofecundación, que provocaría una menor eficiencia en la obtención de híbridos en los programas de mejoramiento. Las características descritas por Acuña et al. (2007) deberían ser tenidas en cuenta para la generación del nuevo germoplasma sexual en la especie, de modo tal de encarar un programa de mejoramiento eficiente.

La adecuada producción de semillas es un carácter de gran interés desde el punto de vista comercial (Rios et al., 2015), que en muchos casos condiciona la adopción de cultivares mejorados (Jank et al., 2011), por lo que también es de gran importancia su consideración en los programas de mejoramiento. El rendimiento de semillas está relacionado al número de inflorescencias por unidad de superficie, la cantidad de espiguillas por racimo y el porcentaje de estas espiguillas que logran desarrollar un fruto (cariópside). El porcentaje de espiguillas con cariópside (de aquí en más porcentaje de semillas) es un carácter que muestra una amplia variación entre los genotipos de *P. notatum*, y en particular en el germoplasma tetraploide sexual (Acuña et al., 2007; 2009). En términos generales, se han reportado niveles de fertilidad en polinización abierta superiores en genotipos diploides con respecto a tetraploides sexuales experimentales; mientras que los primeros muestran menor porcentaje de semillas en autopolinización forzada (Acuña et al., 2007). Acuña et al. (2009) reportaron que la producción de semillas de los híbridos tetraploides sexuales, originados de cruzamientos entre genotipos tetraploides sexuales duplicados y plantas apomícticas naturales, fue muy superior al de sus parentales sexuales. Debido a estas fuertes variaciones en los niveles de fertilidad dentro de la especie, es de gran importancia su

cuantificación y caracterización en el germoplasma tetraploide sintético sexual, con vista a su futura utilización en programas de mejoramiento.

En lo referente a la última característica mencionada por Acuña et al. (2007), se desprende que la autoincompatibilidad polen-pistilo es un sistema muy comúnmente utilizado por especies de angiospermas de polinización abierta para prevenir la endocria en sus progenies. Numerosas investigaciones fueron llevadas a cabo en diferentes especies de gramíneas con el objeto de determinar las bases genéticas que gobiernan este sistema. Como resultado de estos esfuerzos, se logró describir un sistema gobernado por dos *loci* independientes, al cual se denominó sistema S-Z de autoincompatibilidad gametofítica, el cual fue identificado y descrito primeramente para *Secale cereale*, *Festuca pratensis* (Lundqvist, 1956; 1957; 1958) y *Phalaris coerulea* (Hayman, 1956), y posteriormente demostrado, o al menos presumido, en muchas otras especies de gramíneas. Estos dos loci independientes presentan numerosas variantes alélicas, como fue demostrado por Trang et al. (1982) en *Secale cereale*, y posteriormente en rye grass por Devey et al. (1994), en una población cultivada, y por Fearon et al. (1994) en una población natural de la misma especie, lo que determina un alto grado de heterocigosis en las poblaciones, y en particular para los poliploides, debido a la capacidad de albergar hasta múltiples variantes alélicas para cada loci.

Burton et al. (1970) determinaron que *P. notatum* presenta el sistema S-Z de autoincompatibilidad, debido a que no obtuvieron genotipos tetraploides sexuales autocompatibles, a partir de la duplicación cromosómica de genotipos diploides sexuales autoincompatibles, lo que es esperable que ocurra bajo el modelo S de autoincompatibilidad gametofítica gobernado por un único loci. Esta hipótesis es apoyada por Burson (1987), quien trabajando con genotipos sexuales autoestériles de *Paspalum intermedium*, determinó que cuando los estigmas eran autopolinizados, los granos de polen germinaban, pero el crecimiento del tubo polínico se detenía en el tejido del estigma, lo que es una característica típica de la autoincompatibilidad gametofítica.

Numerosos trabajos en especies alógamas por autoincompatibilidad demuestran que existe variación en la eficiencia de este sistema, debido a que en prácticamente todas las especies se encuentran niveles variables de autofertilidad (Hayman, 1992; Bauman, 2000). Este quiebre parcial del sistema de autoincompatibilidad es conocido como pseudo-compatibilidad, y fue extensamente revisado y discutido por Brieger (1930) y Stout (1938). *Paspalum notatum* no es la excepción a este fenómeno ya que se han reportado niveles variables de autofertilidad, tanto en el germoplasma diploide como en el tetraploide sexual

(Acuña et al., 2007). Esta ruptura parcial de la autoincompatibilidad representa un claro obstáculo para los programas de mejoramiento de la especie, debido a la posible endocria en las progenies, por lo que es de gran importancia determinar los niveles de autofertilidad del nuevo germoplasma tetraploide sexual que se genere en la especie.

En el Capítulo I de la presente tesis se describe la obtención de una población tetraploide sintética sexual que demuestra reunir dos de las características enumeradas anteriormente, el mismo nivel de ploidía que los parentales apomícticos y plantas 100% sexuales. La variabilidad genética de este germoplasma sexual será evaluada en este capítulo, a partir de la variación a nivel del ADN y de ciertas características morfológicas y agronómicas. En este capítulo también se evaluará el grado de fertilidad de la población sexual, a través de la producción de semillas, y por otra parte se determinará el grado de autogamia de dicho germoplasma, con la finalidad de identificar genotipos tetraploides sexuales fértiles, pero con un alto grado de autoesterilidad, para poder emplearlos en un futuro programa de mejoramiento mediante hibridaciones.

## II.2 HIPÓTESIS

1. Existe una amplia variabilidad genética en la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum*, medida a nivel molecular y en caracteres morfo-agronómicos.
2. La variabilidad genética de la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum* es mayor que la existente en los progenitores sexuales y apomícticos que la originaron.
3. La población tetraploide sintética sexual de *P. notatum* posee un grado variable de fertilidad, comportándose básicamente como alógama, pero con grado variable de autogamia en función de los genotipos considerados.
4. El grado de fertilidad de la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum* es similar al de sus progenitores tetraploides sexuales experimentales y a los diploides.

### II.3 OBJETIVOS

1. Estimar la variabilidad genética de la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum*, a partir de la variación a nivel del ADN y de caracteres morfo-agronómicos, y compararla con la presente en sus progenitores sexuales y apomícticos.
2. Evaluar el grado de fertilidad de la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum*, a partir de la producción de semillas en autopolinización forzada y polinización abierta, y compararla con sus progenitores tetraploides sexuales experimentales y diploides.

## **II.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.4.1 Material vegetal**

#### **II.4.1.1 Material vegetal para análisis de la variabilidad molecular**

El material vegetal utilizado para la determinación de la diversidad molecular consistió en los 306 individuos de la Población Tetraploide Sintética Sexual (PTSS) obtenida en el Capítulo I. Se incluyeron además los 3 genotipos tetraploides sexuales experimentales (GTSE) y 10 genotipos tetraploides apomícticos naturales (GTAN) usados como progenitores femeninos y masculinos en los cruzamientos originales que dieron origen a las familias  $F_1$ s, a partir de las cuales se generó la PTSS (ver Tabla 1, Capítulo I).

#### **II.4.1.2 Material vegetal para análisis de la variabilidad morfo-agronómica**

Para la estimación de la variabilidad morfo-agronómica se utilizó una muestra de 140 individuos de la PTSS, junto a los tres GTSE y 10 GTAN. Estas plantas fueron replicadas de forma clonal, mediante enraizamiento de macollos en bandejas de siembra individuales (*speedlings*) conteniendo 150 cm<sup>3</sup> de turba como sustrato. El 7 de Octubre de 2015 (a un mes de realizado el enraizamiento) las plantas fueron llevadas a campo dentro del predio del Campo Didáctico y Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE (Corrientes), bajo un marco de plantación de 1 x 1 m, en un diseño en bloques completos al azar, con tres repeticiones, junto a su correspondiente bordura. El 13 de noviembre de 2015 las plantas fueron fertilizadas con N-P-K (15-15-15) a una dosis equivalente a 150 Kg/ha.

#### **II.4.1.3 Material vegetal para evaluación de la fertilidad**

La fertilidad fue estimada sobre una muestra del 10% de la PTSS, durante tres períodos consecutivos (2014, 2015 y 2016), y en base a la producción de semillas en autopolinización forzada y polinización abierta. En los períodos 2014 y 2015, las mediciones fueron realizadas sobre la población cultivada en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias,

UNNE; mientras que en el año 2016 fue realizada sobre una réplica clonal de la misma población, cultivada en el Campo Didáctico y Experimental que la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE posee a las afueras de la ciudad de Corrientes. En el último año de evaluación se incluyeron los tres GTSE y tres genotipos diploides sexuales que fueron replicados y plantados junto con la PTSS ubicada en el Campo Didáctico y Experimental. Este último grupo de genotipos diploides estaba conformado por el genotipo Hojs378 #9, colectado en el departamento de Empedrado (Corrientes), C4-2x (genotipo que dio origen por duplicación cromosómica con colchicina al genotipo sexual C4-4x) colectado en la localidad de Cayastá (Santa Fe), y por último, un individuo del cultivar Tifton 9 (USDA PI 531086).

## **II.4.2 Análisis de la variabilidad molecular**

El análisis de la variabilidad a nivel molecular se realizó mediante la detección de polimorfismos a nivel de ADN, a partir de la obtención de perfiles moleculares generados con marcadores de microsatélites o SSR.

Las extracciones de ADN se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el ítem I.4.3.1 del Capítulo I. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 20 ng de ADN genómico, 150  $\mu$ M de dNTPs, 0,8  $\mu$ M de cada cebador (*forward* y *reverse*), 1 U de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega) y 1X del buffer de amplificación de la enzima (Promega). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca Bio-Rad modelo My-Cycler con el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 min, seguido por 5 ciclos con un paso de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, apareamiento a 65 °C (disminuyendo la temperatura en 1 °C por ciclo) durante 1 min y una extensión a 72°C durante 1 min, luego 25 ciclos con un paso de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, apareamiento a 60 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Por último, un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Al final de la reacción de PCR se adicionó a cada tubo 5  $\mu$ l de buffer de siembra (Formamida 95%, 10 mM NaOH, Azul de Bromofenol 2 mg/ml, Xilencianol 2 mg/ml). Previo a la siembra, las muestras fueron desnaturalizadas a 94 °C durante 5 min y luego colocadas en hielo para su posterior siembra en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% en buffer TBE 0,5X (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) y electroforesis a 300 V durante 3 horas. Los geles fueron teñidos con SYBR-Gold al 1X (Invitrogen) y los



patrones de bandeo fueron revelados en un transiluminador de luz azul (320 nm) y fotografiados con una cámara Nikon.

### **II.4.3 Análisis de la variabilidad morfo-agronómica**

La estimación de la variabilidad morfo-agronómica se llevó a cabo a partir de la medición de 6 variables morfológicas: altura y diámetro de planta, largo y ancho de hojas, altura del eje floral y largo del racimo, y 3 variables agronómicas: producción de biomasa por corte y pesaje, tolerancia al frío y rebrote de invierno.

- Ancho de hoja (A. hoja): fue medido en la parte más ancha de la primera hoja totalmente desplegada. Se realizó la medición tomando el valor promedio de tres hojas provenientes de diferentes macollos de la misma planta.
- Largo de hoja (L. hoja): también se midió en la primera hoja totalmente desplegada, tomando la longitud total de la lámina foliar. Al igual que el ancho de hoja, se tomó el valor promedio de las mediciones realizadas sobre tres macollos distintos de cada planta.
- Altura del eje floral (A.E.F.): fue medida desde el nivel del suelo hasta el eje de los racimos. Se tomó el valor promedio de las mediciones realizadas sobre tres ejes florales de una misma planta.
- Longitud del racimo (L. racimo): fue medida en las mismas inflorescencias sobre las que se midió la altura del eje floral, en base al valor promedio de tres racimos de diferentes inflorescencias por cada individuo.
- Diámetro de la planta (Diámetro): se tomó la medida del diámetro mayor y menor de cada planta y se promedió.
- Altura de planta (Altura): se midió desde el nivel del suelo hasta el tope de su canopeo.

Todas las variables mencionadas anteriormente fueron medidas el 1 de mayo de 2016.

- Producción de biomasa: se realizó a fines del otoño del 2016, a partir de cortes de plantas individuales, a 5 cm sobre el nivel del suelo, y mediante colecta y pesaje del material (M. verde). Se determinó el porcentaje de materia seca sobre una muestra compuesta para cada familia de medios hermanos y una para cada genotipo tetraploide sexual experimental y genotipo apomíctico natural. Se sometió cada muestra compuesta a secado en estufa a 60 °C hasta peso constante, se determinó

el porcentaje de materia seca (MS), y se obtuvo la producción de MS de las plantas individuales.

- Tolerancia al frío (Tol. Frío): Las mediciones se realizaron en el invierno de 2016, dos días posteriores de ocurrida la primera helada del año (08/07/2016), donde la temperatura mínima alcanzo los -2 °C a nivel del suelo. Se midió mediante una escala visual del 1 al 5, donde 1 corresponde a plantas sin daño aparente y 5 a plantas con el mayor daño.
- Rebrote invernal (Reb. Inv.): Las mediciones se realizaron el 23 de septiembre de 2016. Se midió el rebrote acumulado durante el invierno, mediante una escala visual del 1 al 5, donde 1 corresponde a plantas con la menor cantidad de material verde y 5 a las plantas con la mayor acumulación de materia verde.

#### **II.4.4 Evaluación del grado de fertilidad**

El grado de fertilidad de la PTSS fue evaluado en base a la producción de semillas, durante los periodos 2014, 2015 y 2016, en condiciones de autopolinización forzada y polinización abierta, ambas realizadas a campo. La evaluación se realizó en los dos primeros períodos (2014 y 2015) sobre los individuos de la PTSS cultivados en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE; mientras que en el último período (2016) fue llevado a cabo sobre los individuos de la población que fueron clonados vegetativamente y cultivados en el Campo Didáctico y Experimental de la FCA-UNNE (punto II.4.1). En los años 2014 y 2015, las mediciones se llevaron a cabo sobre una muestra aleatoria de 29 y 31 individuos, respectivamente; mientras que para el último período se analizaron 30 individuos al azar de la PTSS, además de los 3 genotipos tetraploides sexuales experimentales utilizados como progenitores femeninos (SWSB, Q4205 y C4-4x) y dos genotipos diploides naturales Hojs378 #9 y Tifton 9 (el genotipo C4-2x no fue incluido en esta evaluación debido a que no se encontraba en floración al momento de las mediciones).

El procedimiento para determinar producción de semillas bajo autopolinización consistió en ensobrar entre 3 y 4 inflorescencias por planta, el día previo al inicio de la floración (antes de la anthesis), con sobres de papel sulfiteado, para forzar la polinización con su propio polen. Para las mediciones bajo polinización abierta se procedió a ensobrar entre 3 y 4 inflorescencias por planta, una vez finalizada la floración de todas las espiguillas, con el objeto de evitar pérdidas de semillas ya que la maduración es despereja.

Una vez transcurrido un mes del ensobrado de las inflorescencias se procedió a la cosecha, trilla manual, secado en estufa a 37 °C durante 48 h y posterior separación de las espiguillas con semillas de las vacías, mediante un equipo soplador de semillas (Seedburo Equipment Company 1022W. Jackson Blvd. Chicago. IL 60607 1-800-284-5779). La producción de semillas para cada planta fue calculada de la siguiente manera: (N° de semillas / N° total de espiguillas)\*100.

## **II.4.5 Análisis estadístico**

### **II.4.5.1 Variabilidad molecular**

Los perfiles moleculares generados por los SSR fueron volcados a una matriz de datos binarios. Los SSR fueron analizados como marcadores “dominantes” debido a que al ser una especie poliploide se generan patrones de bandeo multiloci que no permite analizarlos como marcadores “co-dominantes”. El registro de las bandas se realizó en base a la presencia o ausencia del marcador para un locus determinado, asignándole el valor “1” para presencia y “0” para ausencia. Esta matriz fue analizada con el programa Info-Gen (Balzarini y Di Renzo, 2013) y con el software GenAEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). La variabilidad molecular de la PTSS, de los GTSE y GTAN fue estimada mediante el Porcentaje de loci polimórficos, Heterocigosis esperada y Número total de loci. Las distancias genéticas fueron estimadas mediante el coeficiente de disimilitud de Jaccard (1-S) (Kosman y Leonard, 2005). Se evaluó además la correlación de Pearson entre las distancias moleculares y distancias geográficas de los GTAN. Se realizó un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) para determinar la distribución de la variabilidad entre las familias de medios hermanos que componen la PTSS.

### **II.4.5.2 Variabilidad morfo-agronómica**

El análisis de variabilidad de los caracteres morfo-agronómicos se realizó con el programa Info-Gen (Balzarini y Di Renzo, 2013). Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks, para determinar

si las variables tenían una distribución normal. Se corroboró la homogeneidad de las varianzas, a partir de la F de Snedecor. Se realizó un análisis de componentes principales, para evaluar posibles agrupamientos, además de evaluar la distribución de los individuos con respecto a los vectores de las variables. Se determinaron las distancias Euclideas entre individuos. Se calcularon los coeficientes de variación para cada variable y grupo de individuos, las diferencias entre medias, con la prueba de LSD (Fisher) para comparación de dos medias, y la prueba de Duncan para comparación de múltiples medias, para variables con distribución normal. Se aplicó la prueba de Friedman y la de Kruskal Wallis para las variables no paramétricas. Por último, se calculó la correlación de Pearson para evaluar las correlaciones entre las diferentes variables.

Se utilizó la prueba de Mantel, para medir la correlación entre las matrices de distancia molecular (Jaccard) y de distancia morfo-agronómica (Euclidea). Adicionalmente, se realizó un análisis de Procrustes generalizados, para evaluar el grado de consenso entre los agrupamientos basados en marcadores moleculares de SSR y los marcadores morfo-agronómicos. Debido a que los marcadores moleculares de SSR fueron numerosos, se utilizó el análisis de coordenadas principales para reducir las dimensiones del análisis. Esto no fue necesario para el caso de las variables morfo-agronómicas debido a que no fueron muy numerosas.

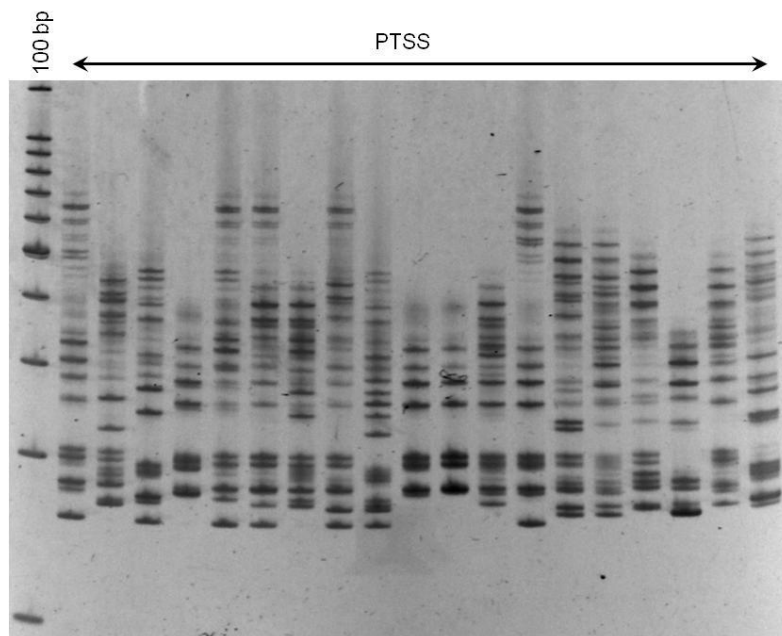
### **II.4.5.3. Producción de semillas**

Los datos de producción de semillas fueron analizados con el programa Info-Gen (Balzarini y Di Renzo, 2013). Se calcularon Medias, Desvío Estándar, Coeficiente de Variación y Análisis de la Varianza (ANOVA). Se utilizó la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (LSD), en comparaciones de dos medias, y la prueba de Duncan para comparaciones de más de dos medias. Se realizó un análisis de correlación de Pearson, entre las variables de fertilidad en autopolinización y polinización abierta.

## II.5 RESULTADOS

### II.5.1 Variabilidad molecular

Un total de 7 cebadores de SSR fueron amplificados por los 304 individuos de la PTSS, 3 GTSE y 10 GTAN (Figura 13). Se registraron en total 124 marcadores (loci), de los cuales 122 resultaron ser polimórficos (98,4%). Cada cebador amplificó entre 11 y 35 bandas, con un promedio de 18 por cada uno. El porcentaje de loci polimórficos detectado por cada cebador varió entre 92% y 100% (Tabla 6). Debido a que el material vegetal es tetraploide y que el marcador fue utilizado como dominante, no fue posible calcular las frecuencias alélicas ni la heterocigosis observada, por lo que en su lugar se calculó el contenido de información polimórfica (PIC), el cual mostró un rango entre 0,23 y 0,36 para cada primer, con una media general de 0,28 (Tabla 6). Considerando que los marcadores fueron usados como dominantes, los valores mínimos y máximos de PIC esperables para este tipo de marcadores va de 0,01 a 0,5, lo que indica que los 7 cebadores utilizados en esta tesis son mediana a altamente informativos.

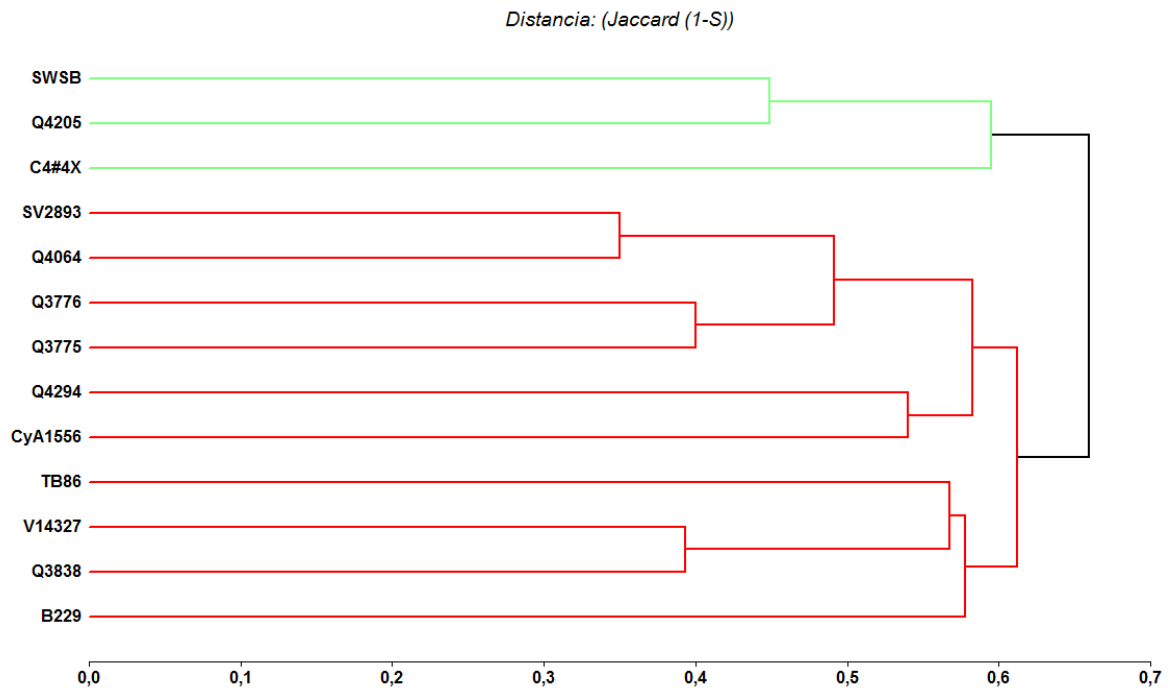


**Figura 13.** Perfil molecular generado por el cebador PN03-F6A de SSR y separado electroforéticamente en gel de acrilamida al 6%. 100bp: marcador de peso molecular; PTSS: 19 individuos de la Población Tetraploide Sintética Sexual.

**Tabla 6.** Resumen del análisis molecular realizado con los marcadores de SSR. Cebadores de SSR utilizados, Número de bandas polimórficas (BP), Número de bandas monomórficas (BM), Número de bandas totales (BT), Porcentaje de loci polimórficos (PLP), Contenido de información polimórfica (PIC) y Rango de peso molecular en pares de bases (pb) de los fragmentos amplificados.

<b>Cebador</b>	<b>BP</b>	<b>BM</b>	<b>BT</b>	<b>PLP</b>	<b>PIC</b>	<b>Rango de pesos en pb</b>
<b>PN03-A6</b>	16	0	16	100	0,27	269-153
<b>PN02-G10</b>	12	1	13	92	0,28	428-201
<b>PN03-A5</b>	11	0	11	100	0,27	914-246
<b>PN02-H7</b>	16	1	17	94	0,24	489-167
<b>PN03-G8</b>	12	0	12	92	0,23	594-198
<b>PN03-H10</b>	20	0	20	100	0,36	884-264
<b>PN03-F6A</b>	35	0	35	100	0,34	668-153
<b>Total</b>	<b>122</b>	<b>2</b>	<b>124</b>	<b>98</b>	<b>0,28</b>	<b>606-197</b>

Las distancias genéticas estimadas en base al Índice de Jaccard mostraron un rango entre 0,45 y 0,59 para los GTSE, siendo la menor distancia la correspondiente a los genotipos emparentados SWSB y Q4205; mientras que los GTAN mostraron un rango entre 0,36 y 0,67 (Figura 14). Por su parte, los genotipos de la PTSS mostraron una distancia genética entre 0,09 a 0,82 (datos no mostrados). No hubo correlación entre distancias genéticas y geográficas para los GTAN (p-valor = 0,51).



**Figura 14.** Dendrograma generado a partir de las distancias de Jaccard (1-S) de los GTSE (verde) y GTAN (rojo). Coeficiente de correlación cofenética 0,84.

El dendrograma de la Figura 14 obtenido a partir de las distancias de Jaccard de los GTSE y los GTAN arrojó un coeficiente de correlación cofenética de 0,84, lo que indica una alta correlación entre la matriz de distancias genética y la representación de las asociaciones a partir del dendrograma. En la Figura 14 se pueden diferenciar dos grandes agrupamientos, en el primero se encuentran los tres GTSE, mostrando que los genotipos SWSB y Q4205 se encuentran más cercanos entre sí que con el genotipo C4-4x. El segundo grupo está constituido por los GTAN, donde se puede ver que el genotipo SV2893 se encuentra más cercano al Q4064, y que el genotipo B229 se encuentra más alejado del resto.

El número total de alelos presente en la PTSS fue de 124, seguido por los GTAN con 122 y por último los GTSE con 68 (Tabla 7). El Porcentaje de Loci Polimórficos (PLP) en la PTSS fue de 98%; mientras que en los GTAN fue de 91% y en los GTSE fue de 39%. Debido a que los marcadores fueron codificados como dominantes, no fue posible calcular la heterocigosis observada, sin embargo, fue posible calcular la heterocigosis esperada, la cual mostró valores similares para la PTSS y los GTAN con 0,31 y 0,29, respectivamente; mientras que los GTSE mostraron un valor considerablemente inferior de 0,15 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Índices de diversidad genética obtenidos en base a la evaluación de 7 cebadores de microsatélites, para la población tetraploide sintética sexual (PTSS), genotipos tetraploides sexuales experimentales (GTSE) y genotipos tetraploides apomícticos naturales (GTAN).

Población	N° total de loci	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosis esperada
<b>PTSS</b>	124	98	0,31
<b>GTAN</b>	122	91	0,29
<b>GTSE</b>	68	39	0,15

En el análisis realizado mediante el programa GenAIEx, se observa que los GTSE mostraron amplificación positiva para 68 marcadores, de los cuales 66 también fueron amplificados por los GTAN; mientras que los dos restantes fueron específicos de los GTSE (Tabla 8). Por otra parte, los GTAN amplificaron un total de 122 marcadores, de los cuales 56 estuvieron ausentes en los GTSE (Tabla 8). La PTSS amplificó un total de 124 marcadores, 66 de ellos fueron compartidos entre las tres poblaciones; mientras que 56 fueron específicos de los GTAN y solo dos de los GTSE (Tabla 8).

**Tabla 8.** Numero de loci privados de cada grupo de genotipos.

	PTSS	GTSE	GTAN
<b>PTSS</b>		56	2
<b>GTSE</b>	0		2
<b>GTAN</b>	0	56	

El Análisis de la Varianza Molecular realizado a partir de las 29 familias de medios hermanos que componen la PTSS reveló que solo el 30% de la variabilidad es debida a variaciones entre las familias, mientras que 70% restante es debida a variaciones entre genotipos dentro de las familias.

Un análisis de la variabilidad de las diferentes familias de medios hermanos que componen la PTSS, permite ver que todas las familias presentan una alta variabilidad, con los valores más bajos en la familia E13 ( $He=0,15$ ;  $PLP=45,16\%$ ) y la más alta en la familia L45 ( $He=0,26$ ;  $PLP=79,83\%$ ) (Tabla 9). Los valores medios de He y PLP fueron de 0,23 y



68,35% respectivamente (Tabla 9). Los coeficientes de variación fueron de 11,67 y 11,54 para He y PLP (Tabla 9).

**Tabla 9.** Heterocigosis esperada (He) y Porcentaje de Loci Plimórficos (PLP) para cada familia de medios hermanos que constituye la PTSS.

<b>Familia*</b>	<b>He</b>	<b>PLP</b>
<b>A24</b>	0,18	54,84
<b>A32</b>	0,24	71,77
<b>A35</b>	0,21	72,58
<b>A41</b>	0,21	63,71
<b>C29</b>	0,22	70,97
<b>C46</b>	0,23	66,94
<b>C6</b>	0,24	74,19
<b>E13</b>	0,15	45,16
<b>E41</b>	0,26	76,61
<b>E8</b>	0,26	73,39
<b>F13</b>	0,24	72,58
<b>F47</b>	0,25	75
<b>G11</b>	0,22	65,32
<b>G19</b>	0,26	79,03
<b>G24</b>	0,22	69,35
<b>H11</b>	0,22	68,55
<b>H12</b>	0,2	51,61
<b>H21</b>	0,17	60,48
<b>H29</b>	0,22	62,1
<b>I29</b>	0,24	65,32
<b>I48</b>	0,24	70,97
<b>J10</b>	0,24	73,39
<b>J13</b>	0,22	66,94
<b>J18</b>	0,24	64,52
<b>J42</b>	0,23	74,19
<b>K19</b>	0,23	67,74
<b>L25</b>	0,25	74,19
<b>L45</b>	0,26	79,84
<b>L5</b>	0,25	70,97
<b>Total</b>	0,23	68,35
<b>CV</b>	11,67	11,54

\* Familia: Grupo de individuos que comparten un origen materno.

## II.5.2 Variabilidad morfo-agronómica

Un total de 9 variables morfo-agronómicas fueron evaluadas sobre 140 individuos de la PTSS, los tres GTSE y los 10 GTAN. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si las variables se ajustaban a una distribución normal, considerando como límite inferior a  $W = 0,95$ . Las 6 variables morfológicas, además de la variable agronómica producción de materia seca, se ajustaron a la distribución normal (Tabla 10); mientras que las variables tolerancia al frío y rebrote de invierno ( $W = 0,9$  para ambas) no se ajustaron a este tipo de distribución (Tabla 10), por lo que recibieron un análisis de tipo no paramétrico.

**Tabla 10.** Prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para las nueve variables morfo-agronómicas evaluadas. n: número de individuos analizados; Media: media de cada variable; D.E.: desvío estándar; W: valor del estadístico calculado en base a la prueba de Shapiro-Wilks.

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>W</b>
<b>Altura</b>	447	43,91	11,18	0,99
<b>Diámetro</b>	447	23,39	7,25	0,99
<b>L.Hoja</b>	447	32	7,53	0,98
<b>A.Hoja</b>	447	8,51	1,22	0,96
<b>A.E.F.</b>	406	59,55	11,75	0,99
<b>L.Racimo</b>	410	12,84	2,16	0,98
<b>MS</b>	449	192,59	132,8	0,95
<b>Tol. frío</b>	450	2,63	1,14	0,9
<b>Rebr. inv.</b>	447	2,79	1,05	0,9

Se realizó un análisis mediante el estadístico F de Snedecor para probar la homogeneidad de las varianzas de cada variable entre la PTSS, los GTSE y los GTAN. El análisis permitió corroborar la homogeneidad de las varianzas para todas las variables, debido a que el p-valor fue superior a 0,01 en todos los casos (Tabla III, Anexo).

Las medias y desvíos estándar de cada variable para cada genotipo evaluado se encuentran en la Tabla IV del Anexo, mientras que el número de individuos evaluados, las medias, desvíos estándar, coeficientes de variación, mínimo y máximo para los grupos de genotipos (PTSS, GTAN y GTSE) se encuentran en la Tabla V del Anexo.

La PTSS presentó los valores más altos para la variable altura de planta, seguido por los GTSE y por último los GTAN. Dentro de los GTSE se destaca el individuo SWSB con 54,67 cm (Tabla IV, Anexo). Por otro lado, los GTAN fueron los que mostraron los mayores diámetros de planta comparados con la PTSS y GTSE (Tabla 11).

En cuanto a los caracteres de hoja, la PTSS arrojó un valor promedio de 32,45 cm de largo de hoja, significativamente superior al encontrado en los GTAN y GTSE. En cuanto al ancho de hoja, los GTAN y PTSS mostraron un promedio de 8,57 y 8,53 mm, respectivamente, ambos significativamente mayores a los 7,5 mm encontrados en los GTSE (Tabla 11).

Las variables morfológicas relacionadas a los órganos reproductivos, altura del eje floral y longitud del racimo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos (Tabla 11).

La variable producción de materia seca mostró un valor promedio de 152,8 g por planta en los GTSE, con un CV de 99,7%, debida a la escasa producción del genotipo C4-4x (10,4 g) comparada con el genotipo SWSB (328 g) (Tabla IV, Anexo). Los GTAN mostraron una producción de materia seca promedio de 164,8 g por planta, con el valor más bajo de 50,42 g en el genotipo TB86, y el valor más alto de 266 g en el genotipo Q3776 (Tabla IV, Anexo). La PTSS presentó un valor medio de 196,4 g por planta, siendo el valor más bajo de 0 g en el genotipo J10#9 (es decir que su altura era menor a 5 cm por lo que no fue alcanzada por el corte), y más alto de 490 g en el genotipo H12#1 (Tabla IV, Anexo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Tabla 11).

En cuanto a las variables tolerancia al frío y rebrote de invierno, ambas evaluadas por métodos no paramétricos, no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (Tabla 11).

**Tabla 11.** Valores medios obtenidos para las 9 variables morfo-agronómicas evaluadas en los GTSE, GTAN y PTSS.

	<b>GTSE</b>	<b>GTAN</b>	<b>PTSS</b>
<b>Altura (cm)</b>	39,11 <sup>b†</sup>	33,43 <sup>c</sup>	44,78 <sup>a</sup>
<b>Diámetro (cm)</b>	25,28 <sup>b</sup>	33,53 <sup>a</sup>	22,6 <sup>b</sup>
<b>L. Hoja (cm)</b>	27,22 <sup>b</sup>	27,42 <sup>b</sup>	32,45 <sup>a</sup>
<b>A. Hoja (mm)</b>	7,5 <sup>b</sup>	8,57 <sup>a</sup>	8,53 <sup>a</sup>
<b>A.E.F. (cm)</b>	51,89 <sup>a</sup>	58,42 <sup>a</sup>	59,82 <sup>a</sup>
<b>L. Racimo (cm)</b>	12,61 <sup>a</sup>	12,82 <sup>a</sup>	12,84 <sup>a</sup>
<b>MS (g)</b>	152,8 <sup>a</sup>	164,8 <sup>a</sup>	196,4 <sup>a</sup>
<b>Tol. frío (*)</b>	1,89 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>
<b>Rebr. inv. (*)</b>	2,56 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup>	2,82 <sup>a</sup>

(\*) Escala visual de 1 a 5. Comparación de medias a partir de la prueba de Kruskal-Wallis.

† Medias de cada variable. Letras distintas indican diferencias significativas para la prueba de Duncan (0,05).

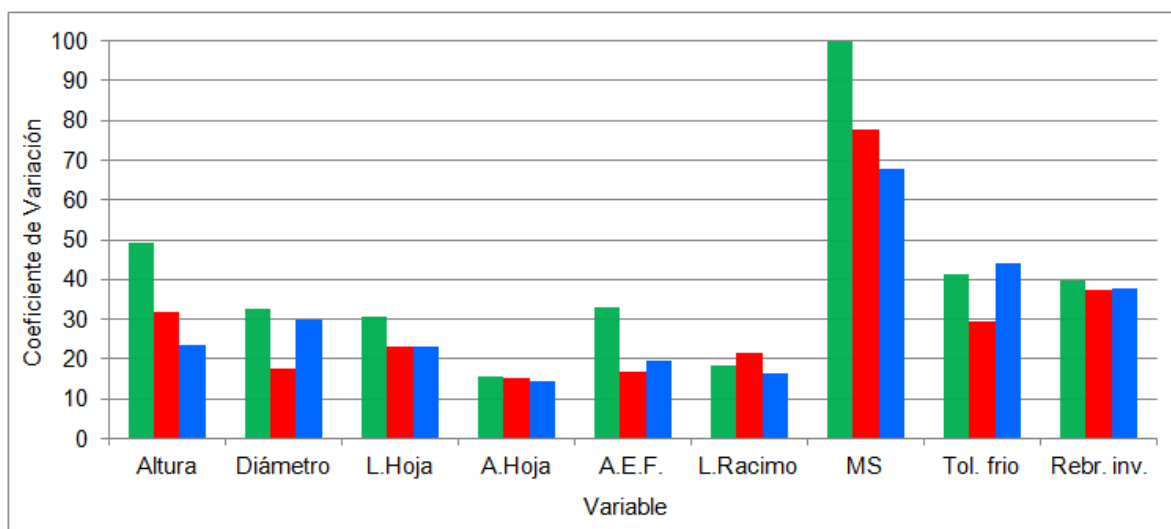
Casi todas las variables mostraron efecto significativo para las fuentes de variación “genotipo” y “bloque” (efecto ambiental), mientras que las variables largo y ancho de hoja sólo mostraron efectos significativos con la fuente de variación “genotipo”, indicando cierta independencia del factor ambiental (Tabla VI, Anexo).

El coeficiente de variación fue utilizado para comparar la variabilidad encontrada en cada una de las variables, debido a que permite hacer comparaciones a una misma escala. La prueba no paramétrica de Friedman presentada en la Tabla 12 permite observar que la variable producción de materia seca fue la que presentó el mayor coeficiente de variación (68,95), seguida de tolerancia al frío (43,49). El rebrote de invierno y diámetro de planta se ubicaron por debajo, sin diferencias significativas entre sí. La altura de planta no mostró diferencias significativas con respecto al diámetro de planta y largo de hoja. Por último, no se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de variación de las variables altura del eje floral, longitud del racimo y ancho de hoja (Tabla 12; Figura 15).

**Tabla 12.** Prueba de comparación de medias de los coeficientes de variación de las 9 variables morfo-agronómicas mediante la prueba no paramétrica de Friedman.

Tratamiento	Media	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	
CV MS	68,95	1240	8,27	a*
CV Tol. frío	43,49	1048,5	6,99	b
CV Rebr. inv.	37,61	866,5	5,78	cd
CV Diámetro	30,98	798	5,32	de
CV Altura	25,46	739,5	4,93	ef
CV L.Hoja	23,54	694	4,63	f
CV A.E.F.	19,73	496	3,31	ghi
CV L.Racimo	16,85	438	2,92	hi
CV A.Hoja	14,35	429,5	2,86	i

(\*) Letras distintas indican diferencias significativas para la prueba de Friedman (0,05).



**Figura 15.** Coeficientes de variación para las diferentes variables morfo-agronómicas. Verde: GTSE; Rojo: GTAN; Azul: PTSS.

Con el objetivo de realizar comparaciones entre los coeficientes de variación de cada grupo de genotipos, se generó una nueva variable, a partir de los coeficientes de variación de cada individuo (coeficientes calculados a partir de las 3 repeticiones) y de cada variable morfo-agronómica. Se realizó una prueba de normalidad para estas nuevas variables, encontrándose que las derivadas de variables agronómicas tenían una distribución normal ( $W > 0,95$ ), mientras que para el caso de las morfológicas fue necesaria una transformación previa (Tabla 13).

**Tabla 13.** Prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para la distribución de los coeficientes de variación de cada variable morfo-agronómica. n: número de individuos analizados; Media: media de cada variable; D.E.: desvío estándar; W: valor del estadístico calculado en base a la prueba de Shapiro-Wilks.

CV Variable	n	Media	D.E.	W
LOG10_ CV Altura	151	1,19	0,29	0,95
LOG10_ CV Diámetro	151	1,25	0,31	0,97
LOG10_ CV L.Hoja	150	1,13	0,29	0,96
LOG10_ CV A.Hoja	145	0,89	0,25	0,95
LOG10_ CV A.E.F.	141	0,97	0,31	0,98
LOG10_ CV L.Racimo	139	0,90	0,28	0,98
CV MS	152	54,93	27,72	0,97
CV Tol. frío	152	35,20	18,73	0,96
CV Rebr. inv.	152	26,92	18,56	0,95

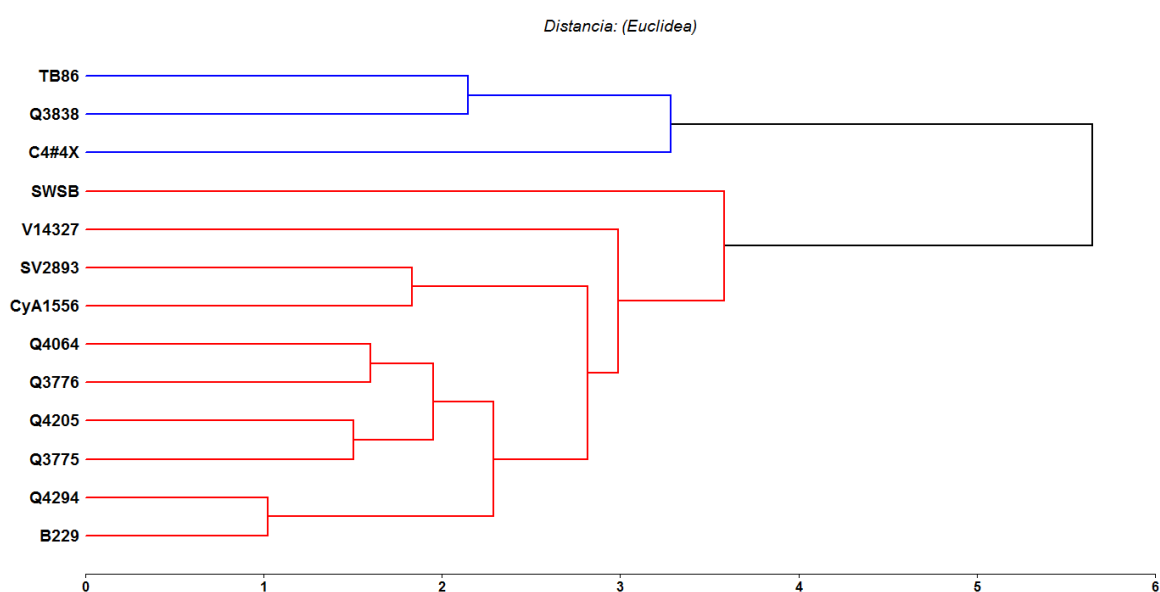
La comparación de las medias entre los coeficientes de variación de los distintos grupos de genotipos, realizada mediante la prueba de Duncan, muestra que los GTSE presentan mayor variación en la variable altura de planta con respecto a la PTSS; mientras que los GTAN no muestran diferencias significativas con respecto a los anteriores. Las 8 variables restantes no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de genotipos (Tabla 14; Figura 15).

**Tabla 14.** Coeficientes de variación para las 9 variables morfo-agronómicas evaluadas en los GTSE, GTAN y PTSS.

	GTSE	GTAN	PTSS
Altura (cm)	49,3 <sup>ax</sup>	31,9 <sup>ab</sup>	23,6 <sup>b</sup>
Diámetro (cm)	32,5 <sup>a</sup>	17,6 <sup>a</sup>	29,8 <sup>a</sup>
L. Hoja (cm)	30,7 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
A. Hoja (mm)	15,6 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	14,2 <sup>a</sup>
A.E.F. (cm)	33,1 <sup>a</sup>	16,6 <sup>a</sup>	19,6 <sup>a</sup>
L. Racimo (cm)	18,2 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>	16,4 <sup>a</sup>
MS (g)	99,7 <sup>a</sup>	77,7 <sup>a</sup>	67,9 <sup>a</sup>
Tol. frío	41,4 <sup>a</sup>	29,2 <sup>a</sup>	44,1 <sup>a</sup>
Rebr. inv.	39,7 <sup>a</sup>	37,2 <sup>a</sup>	37,6 <sup>a</sup>

(\*) Letras distintas indican diferencias significativas para la prueba de Duncan (0,05).

Por otro lado, se calcularon las distancias Euclídeas entre genotipos, a partir de las variables estandarizadas. Las distancias genéticas para los GTAN variaron de 1,02 entre los genotipos Q4294 y B229 a 6,52 entre los genotipos Q3838 y SV2893 (Figura 15); mientras que para los GTSE fueron de 3,34 entre los genotipos SWB y Q4205, a 6,71 entre el SWSB y C4-4x (Figura 15). Por último, el rango de variación en la distancia genética de la PTSS fue entre 1,16 y 14,06 (datos no mostrados).



**Figura 15.** Dendrograma generado a partir de las distancias de Euclídea de los GTSE y GTAN. Grupo 1 en azul y Grupo 2 en rojo. Coeficiente de correlación cofenética 0,85.

El dendrograma arrojó un coeficiente de correlación de 0,85, lo que indica que existe una alta correlación entre la matriz de distancias genética y la representación gráfica a partir del dendrograma. En la Figura 15 se pueden diferenciar dos grandes agrupamientos; el primero de ellos, constituido por los genotipos TB86, Q3838 y C4-4x, se caracteriza por presentar plantas de escaso tamaño, presentando menores diámetros y alturas de planta, longitud y ancho de hoja, altura del eje floral y longitud de racimo con respecto al grupo 2 (Tabla 15). A su vez, ese grupo también se caracteriza por plantas de bajo desempeño agronómico, debido a su escasa producción de materia seca, reducida tolerancia al frío y bajo rebrote de invierno (Tabla 15).

**Tabla 15.** Valores medios obtenidos para las 9 variables morfo-agronómicas evaluadas en los 2 agrupamientos generados en la Figura 15.

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>
<b>Altura (cm)</b>	20,75 <sup>a*</sup>	38,35 <sup>b</sup>
<b>Diámetro (cm)</b>	22,44 <sup>a</sup>	34 <sup>b</sup>
<b>L. Hoja (cm)</b>	18,94 <sup>a</sup>	29,55 <sup>b</sup>
<b>A. Hoja (mm)</b>	6,38 <sup>a</sup>	8,82 <sup>b</sup>
<b>A.E.F. (cm)</b>	40,44 <sup>a</sup>	61,16 <sup>b</sup>
<b>L. Racimo (cm)</b>	9 <sup>a</sup>	13,74 <sup>b</sup>
<b>MS (g)</b>	54,51 <sup>a</sup>	189,82 <sup>b</sup>
<b>Tol. frío</b>	1,75 <sup>a</sup>	2,52 <sup>b</sup>
<b>Rebr. inv.</b>	1,5 <sup>a</sup>	2,87 <sup>b</sup>

(\*) Letras distintas indican diferencias significativas para la prueba de LSD (Fisher) (0,05).

Otra de las técnicas estadísticas utilizadas para observar agrupamientos entre individuos es el análisis de componentes principales. El coeficiente de correlación cofenético fue de 0,94 para este análisis, lo que indica una alta correlación entre la matriz de correlaciones de las variables y las nuevas dimensiones a partir de las 2 componentes principales. El 69% de la variación total fue explicada a partir de las dos primeras componentes principales (CP1 53% y CP2= 15%) (Tabla 16; Figura 16).

**Tabla 16.** Análisis de componentes principales. Autovalores obtenidos a partir de las 9 variables morfo-agronómicas.

<b>Lambda</b>	<b>Valor</b>	<b>Proporción</b>	<b>Prop. Acum.</b>
<b>1</b>	4,81	0,53	0,53
<b>2</b>	1,36	0,15	0,69
<b>3</b>	0,94	0,1	0,79
<b>4</b>	0,63	0,07	0,86
<b>5</b>	0,43	0,05	0,91
<b>6</b>	0,29	0,03	0,94
<b>7</b>	0,22	0,02	0,96
<b>8</b>	0,17	0,02	0,98
<b>9</b>	0,16	0,02	1

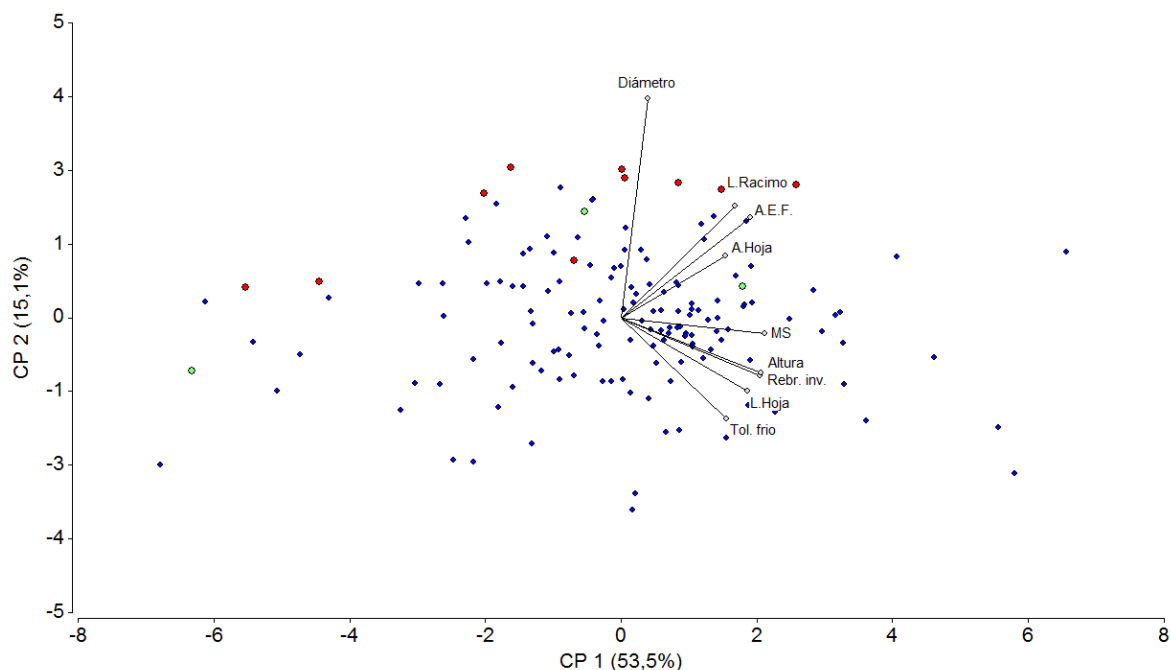


El análisis de los autovectores (Tabla 17) muestra que las variables Altura, L.Hoja, A.Hoja, MS, Rebr. Inv. se encuentran más relacionadas a la CP1; mientras que la variable Diámetro está más relacionada a la CP2. Las variables A.E.F., L. Racimo y Tol. frío están relacionadas a ambos componentes, debido a que sus autovectores son similares en ambas.

**Tabla 17.** Análisis de componentes principales. Autovectores generados a partir de las 9 variables morfo-agronómicas.

<b>Variables</b>	<b>e1</b>	<b>e2</b>
<b>Altura</b>	0,39	-0,19
<b>Diámetro</b>	0,07	0,71
<b>L.Hoja</b>	0,35	-0,23
<b>A.Hoja</b>	0,29	0,2
<b>A.E.F.</b>	0,36	0,32
<b>L.Racimo</b>	0,32	0,36
<b>MS</b>	0,4	-0,05
<b>Tol. frío</b>	0,29	-0,32
<b>Rebr. inv.</b>	0,39	-0,18

El análisis de componentes principales agrupó a 7 GTAN sobre el cuadrante superior, caracterizados principalmente por un mayor diámetro de planta. Los GTSE se distribuyen sin seguir un patrón definido, un caso particular lo representa el genotipo C4-4x que se ubica hacia el extremo izquierdo de la distribución, caracterizado por su reducido tamaño y vigor. Los 140 individuos de la PTSS abarcan una amplia distribución, extendiéndose por fuera de los márgenes alcanzados por los GTSE y GTAN sobre la CP1, que es la que explica el 53,5% de la variación total. Esto indica que la PTSS presenta una alta variabilidad para los caracteres morfo-agronómicos evaluados (Figura 16).



**Figura 16.** Componentes principales generados a partir de las 9 variables morfo-agronómicas. Verde: GTSE; Rojo: GTAN; Azul: PTSS. Coeficiente de correlación cofenética: 0,94.

El análisis de componentes principales permite además distinguir las correlaciones entre las diferentes variables. De ésta manera, podemos ver tres grupos, el primero formado únicamente por la variable diámetro de planta, el segundo constituido por las variables morfológicas largo del racimo, altura de la inflorescencia y ancho de hoja, y el último grupo formado por las variables agronómicas producción de materia seca, rebrote invernal y tolerancia al frío, más dos variables morfológicas, largo de hoja y altura de planta (Figura 12). La magnitud y significancia de estas correlaciones pueden verse en la Tabla 18. Considerando las correlaciones superiores a 0,6, se puede observar que las variables agronómicas se encuentran altamente correlacionadas, lo que favorecería los trabajos de selección, a partir de caracteres agronómicos. Las variables morfológicas, en general, mostraron menores correlaciones con respecto a las agronómicas. La variable altura de planta presentó una alta correlación con largo de hoja y altura del eje floral, conforme a una distribución armónica del tamaño de la planta. Por último, se observó una alta correlación entre altura del eje floral y largo del racimo (Tabla 18). Por otro lado, no se observaron correlaciones negativas entre las variables, lo que indica que sería posible seleccionar a favor de cualquiera de ellas, sin tener un efecto negativo frente a las demás, sino por el contrario, en la mayoría de los casos obtener incrementos.

**Tabla 18.** Matriz de coeficientes de correlación de Pearson (diagonal inferior izquierda) y p-valores (diagonal superior derecha) para las distintas variables morfo-agronómicas evaluadas sobre la PTSS, los GTSE y GTAN.

	Altura	Diám.	L.Hoja	A.Hoja	A.E.F.	L.Rac.	MS	Tol. frío	Rebr. inv.
Altura	1	0,11	**	**	**	**	**	**	**
Diám.	0,08	1	0,44	0,01	**	**	**	0,7	**
L.Hoja	<b>0,62</b>	0,04	1	**	**	**	**	**	**
A.Hoja	0,36	0,12	0,32	1	**	**	**	**	**
A.E.F.	<b>0,62</b>	0,35	0,44	0,35	1	**	**	**	**
L.Rac.	0,45	0,23	0,37	0,45	0,61	1	**	**	**
MS	<b>0,61</b>	0,31	<b>0,52</b>	0,29	<b>0,54</b>	0,39	1	**	**
Tol. frío	0,31	0,02	0,3	0,21	0,21	0,15	<b>0,62</b>	1	**
Rebr. inv.	<b>0,57</b>	0,16	0,48	0,29	0,47	0,36	<b>0,78</b>	<b>0,72</b>	1

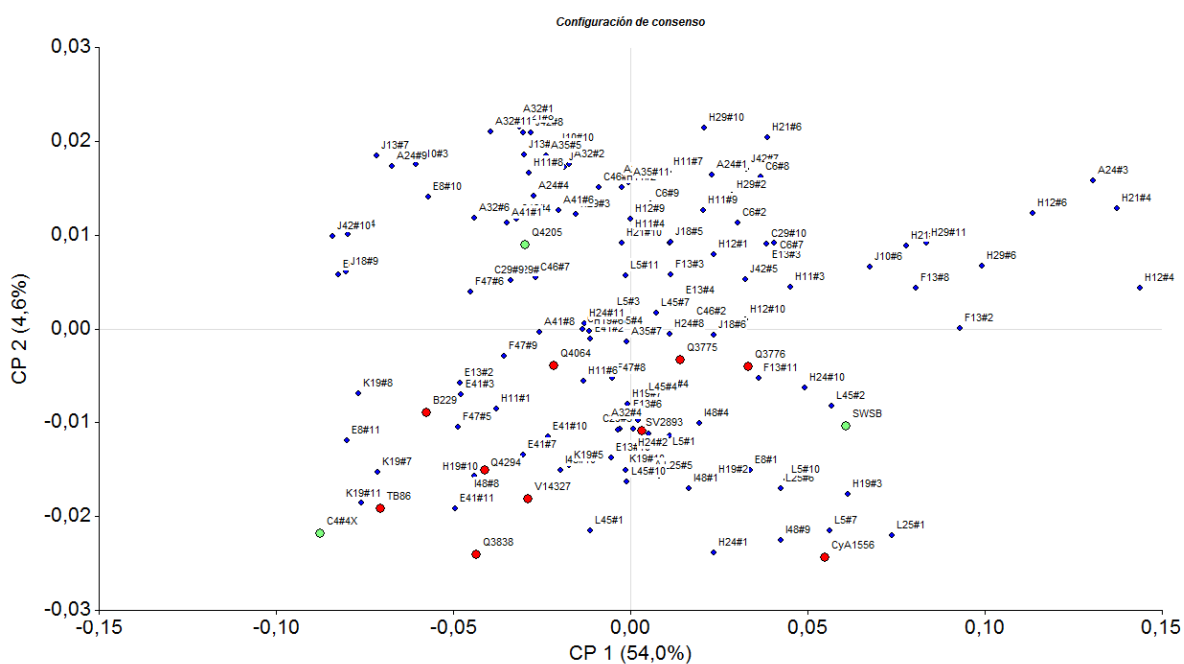
\*\* indican un p-valor <0,01.

La prueba de correlación de Mantel, entre las matrices de distancia molecular (Jaccard) y distancia en base a caracteres morfo-agronómicos (Euclidea), no mostró correlación entre ambas matrices ( $r= 0,03$  p-valor= 0,15).

El análisis de Procrustes generalizados (APG) se realizó a partir de dos grupos de variables. En el primer grupo se ubicaron las 10 variables morfo-agronómicas, y en el segundo a las 40 coordenadas principales que explicaban en conjunto el 83% de la variación observada entre los marcadores moleculares de SSR. El análisis de la varianza arrojó una suma de cuadrados de consenso de 1,25, lo que al ser contrastado contra el total (2/1,25) nos da un consenso del 56,2% entre el agrupamiento obtenido a partir de los marcadores moleculares de SSR vs el obtenido a partir de variables morfo-agronómicas (Tabla 19). En la Figura 17 se puede ver la configuración de consenso para el APG, en el cual se representa el 58,6% de la variación, siendo la participación de la CP1 del 54% y de la CP2 del 4,6% (Figura 17). No es posible distinguir agrupamientos claros en la configuración, debido a que todos los individuos se encuentran dispersos de forma más o menos uniforme (Figura 17).

**Tabla 19.** Análisis de la varianza para el análisis de Procrustes generalizados, a partir de dos grupos de variables. Grupo 1: 9 variables morfo-agronómicas. Grupo 2: 40 coordenadas principales, obtenidas a partir de marcadores moleculares de SSR.

	Consenso	Residuo	Total	Prop. Consenso
<b>Grupo1</b>	0,562	0,438	1,000	0,562
<b>Grupo2</b>	0,562	0,438	1,000	0,562
<b>Total</b>	1,125	0,875	2,000	0,562



**Figura 17.** Configuración de consenso generada mediante Análisis de Procrustes Generalizados. Azul: PTSS; Rojo: GTAN; Verde: GTSE.

### II.5.3 Análisis de la producción de semillas

La producción de semillas generada de los inter cruzamientos controlados realizados entre los híbridos F<sub>1</sub> sexuales mostró un rango entre 5 y 81%, con una media de 50,28% (Tabla 20). Los valores medios de producción de semillas en polinización abierta de la PTSS, para los periodos 2014, 2015 y 2016, fueron de 23,35%, 39,34% y 28,01%, respectivamente. Por su parte, para autopolinización fueron de 8,47%, 20,54% y 16,64%, respectivamente (Tabla 20). Por su parte, los GTSE evaluados en el año 2016 mostraron un porcentaje de semillas en autopolinización y polinización abierta del 9,9% y 22,47%, respectivamente. Por último, los genotipos diploides arrojaron un porcentaje de semillas de 16,75% en autopolinización y de 52,35% en polinización abierta (Tabla 20).

**Tabla 20.** Producción de semillas en la PTSS, medida en diferentes períodos de floración, bajo dos modos de polinización y en comparación con genotipos diploides y tetraploides sexuales. Población analizada, periodo de evaluación, método de polinización, número de plantas evaluadas, media, coeficiente de variación, mínimos y máximos para producción de semillas.

Población*	Periodo	Método de Polinización	N°	Media	C.V.	Mínimo	Máximo
HS F <sub>1</sub>	2013	Intercruz.	29	50,28	36,2	5	81
PTSS	2014	Autopol.	29	8,47	83,31	0	25,15
		Pol. Abierta	29	23,35	66,87	4,73	60,88
PTSS	2015	Autopol.	31	20,54	61,11	2,56	63,48
		Pol. Abierta	31	39,34	31,21	13,42	69,04
PTSS	2016	Autopol.	31	16,64	65,42	0	39,18
		Pol. Abierta	31	28,01	60,70	2,83	57,96
GTSE	2016	Autopol.	3	9,9	58,03	3,4	14,3
		Pol. Abierta	3	22,47	41,06	12,3	30,3
Diploides	2016	Autopol.	2	16,75	65,43	9	24,5
		Pol. Abierta	2	52,35	21,62	43,5	59,2

\*Población: híbridos sexuales F<sub>1</sub> (HS F<sub>1</sub>), Población Tetraploide Sintética Sexual (PTSS), Genotipos Tetraploides Sexuales Experimentales (GTSE), Diploides ("Hojs 398/9" y "Tifton 9").

La producción de semillas fue altamente variable y dependiente del método de polinización, del genotipo y del año de evaluación (Tabla VII, Anexo). No se encontró interacción entre estas fuentes de variación (Tabla VII, Anexo).

Los coeficientes de variación para la producción de semillas de la PTSS, en polinización abierta, fueron de 66,87%, 31,21% y 60,7%, para los años 2014, 2015 y 2016, respectivamente, con un promedio de 53,87%. Por su parte, para autopolinización fueron de 83,31%, 61,1% y 65,42% para los mismos periodos, con un promedio de 74,95% (Tabla 20). Los GTSE mostraron un coeficiente de variación de 58,03% y 41,06% para autopolinización y polinización cruzada, respectivamente. Por último, los genotipos diploides presentaron un coeficiente de variación de 65,43% y 21,62% para autopolinización y polinización cruzada, respectivamente. Se puede ver que en todos los grupos de genotipos evaluados los coeficientes de variación fueron mayores en autopolinización que en polinización abierta.

La producción de semillas de la PTSS fue significativamente mayor en polinización abierta que en autofecundación para todos los periodos evaluados (Tabla 21). Se observó un efecto significativo en la producción de semillas de la PTSS ( $p$ -valor  $<0,001$ ), según el período de evaluación. La producción de semillas en autopolinización fue mayor en el año 2015 con respecto a 2014 y 2016; mientras que para polinización abierta los menores valores se observaron en el año 2014 (Tabla 21).

**Tabla 21.** Valores medios de producción de semillas para autopolinización y polinización abierta en la PTSS para cada periodo de evaluación.

Año	Producción de semillas (%)		DMS <sup>†</sup>
	Autopol.	Pol. Abierta	
<b>2014</b>	8,47 <sup>a*</sup>	23,35 <sup>a</sup>	7,75
<b>2015</b>	20,54 <sup>b</sup>	39,34 <sup>b</sup>	8,56
<b>2016</b>	16,64 <sup>b</sup>	28,01 <sup>a</sup>	7,44

\*Diferencia Mínima Significativa para comparaciones entre diferentes métodos de polinización dentro de una misma fila.

‡Medias del periodo seguidas por letras diferentes muestran diferencias significativas para el test de Duncan (0,05) dentro de una misma columna.

La producción de semillas en autopolinización de la PTSS, en comparación con los GTSE y Diploides, no mostró diferencias significativas. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en polinización abierta, entre los diploides y los GTSE; mientras que la PTSS no mostró diferencias con las dos anteriores (Tabla 22).

**Tabla 22.** Valores medios de producción de semillas para diferentes poblaciones, en autopolinización y polinización abierta, para el periodo 2016.

Población	Producción de semillas (%)	
	Autopol.	Pol. Abierta
<b>PTSS</b>	16,64a	28,02ab
<b>GTSE</b>	9,9a <sup>‡</sup>	22,47a
<b>Diploides</b>	16,75a	51,35b

<sup>‡</sup>Medias del periodo seguidas por letras diferentes son significativas para el test de Duncan ( $p$ -valor < 0,05) dentro de una misma columna.

Cuando la producción de semillas de los 29 híbridos  $F_1$  sexuales usados en el intercrucamiento fueron agrupados de acuerdo a su ancestro sexual en común (SWSB, Q4205 y C4-4x), no se observaron diferencias significativas para producción de semillas entre los tres grupos ( $p$ -valor 0,96). Además, cuando los individuos de la población sintética fueron agrupados de acuerdo a los mismos ancestros sexuales (SWSB, Q4205 y C4-4x), tampoco se encontraron diferencias entre grupos, tanto en autopolinización como polinización abierta, en los tres años evaluados (Tabla 23).

**Tabla 23.** Valores medios de producción de semillas de los genotipos F<sub>1</sub> sexuales inter cruzados, y para los genotipos de la PTSS en autopolinización y polinización abierta, agrupados según el ancestro sexual en común, en 4 periodos de medición.

Ancestro sexual <sup>†</sup>	2013	2014		2015		2016	
	Intercruz.	Autopol.	Pol. Abierta	Autopol.	Pol. Abierta	Autopol.	Pol. Abierta
<b>Q4205</b>	49	8,24	18,73	22,81	32,25	13,01	21,65
<b>SWSB</b>	50,73	7,62	23,92	19,63	39,10	17,89	31,73
<b>C4-4x</b>	51,75	9,52	24,98	19,56	46,15	14,67	29,95
<b>p-valor*</b>	0,96	0,87	0,70	0,82	0,25	0,56	0,35

<sup>†</sup>Genotipos sexuales agrupados según el ancestro sexual en común a partir del cual fueron originados.

\*P-valores para comparaciones entre diferentes grupos dentro de una misma columna.

El análisis de correlación de Pearson entre producción de semillas en autopolinización y polinización abierta mostró una alta correlación ( $r=0,68$ ;  $p\text{-valor} < 0,01$ ), lo que indica que los individuos más fértiles tienden a producir mayor cantidad de semillas tanto con su propio polen como con polen foráneo.



## II.6. DISCUSIÓN

El conocimiento de la variabilidad genética existente en el germoplasma de especies vegetales es de vital importancia para el planeamiento de estrategias de mejoramiento y conservación de los recursos genéticos (Cidade et al., 2008, Quiroga 2011). Por otro lado, la determinación de su sistema de reproducción (sexualidad, apomixis, alogamia, autogamia, o combinaciones de cada una de ellas) es fundamental para establecer los métodos de mejoramiento a adoptar (Borem et al., 2008).

En este Capítulo se analizó la variabilidad genética presente en la PTSS, a partir de marcadores moleculares y caracteres morfo-agronómicos, y se la comparó con la variabilidad presente en los GTSE y GTAN, con la finalidad de establecer en qué medida la variabilidad del germoplasma tetraploide apomíctico, empleado como fuente de diversidad dentro de la especie, fue efectivamente transferida a la PTSS.

En este Capítulo también se determinó la fertilidad de la PTSS, en base a la producción de semillas, bajo dos métodos de polinización, y se comparó los niveles de fertilidad alcanzados por la PTSS con aquellos encontrados en los GTSE y genotipos diploides.

### II.6.1 Variabilidad molecular

La variabilidad molecular de la PTSS, GTSE y GTAN fue evaluada en base a marcadores moleculares de SSR. La elección de este tipo de marcadores se debe a su alto nivel de polimorfismos, generados a partir de una alta tasa de pérdidas o ganancias de pares de bases en las regiones repetitivas o microsatélites (Toutz, 1989). Los cebadores utilizados para generar los perfiles moleculares fueron desarrollados específicamente para *P. notatum*. Debido a que todos los genotipos utilizados en este estudio fueron tetraploides, los marcadores fueron codificados como dominantes, ya que la herencia de los marcadores a este nivel de ploidía puede ser de tipo disómica, tetrasómica o polisómica (Stein et al. 2004), además del hecho de que muchos loci se encuentran varias veces replicados en un mismo genoma, por lo que se generan patrones de bandeo multiloci que impiden diferenciar las variantes alélicas de cada uno de los loci.

Los 7 cebadores de SSR empleados amplificaron un gran número de bandas, siendo casi en su totalidad polimórficas. El PIC de cada cebador fue variable y con valores inferiores a los detectados por Cidade et al. (2009) en los 25 genotipos de *P. notatum* de colecciones de Brasil; sin embargo, el ranking de los cebadores en base a los valores de PIC y número de bandas detectadas fueron coincidentes en ambos trabajos, siendo el cebador PN03-G8 el menos informativo y PN03-F6A y PN03-H10 los de mayor contenido de información polimórfica. A su vez, el número de loci detectados por cada cebador fue en promedio el doble (18 vs 9) al encontrado por Cidade et al. (2009).

El rango de pesos moleculares de los marcadores amplificados en este trabajo fueron superiores a los detectados por Cidade et al. (2009). Si bien los marcadores de menor peso fueron en promedio muy similares, con 197 pb y 201 pb en este trabajo y en Cidade et al. (2009), respectivamente, los de mayor peso discreparon significativamente (606 pb y 235 pb, respectivamente). Esto probablemente se debió a que el método de tinción empleado para la detección de los microsatélites en esta tesis fue SYBR Gold, el cual es más sensible en la detección de bandas de alto peso molecular que la tinción con Nitrato de Plata empleada por Cidade et al. (2009), lo que también podría explicar el mayor número de bandas detectadas. Otro factor que podría estar relacionado a este hecho es el tipo de enzima polimerasa utilizada en las reacciones de amplificación por PCR, ya que las enzimas de buena calidad son capaces de amplificar fragmentos de mayor longitud que aquellas de menor calidad.

Los 10 genotipos apomícticos usados para la obtención de la PTSS mostraron una distancia genética relativamente alta. Estas distancias fueron considerablemente superiores a las encontrada por Espinoza et al. (2006), empleando marcadores de AFLP, en un germoplasma de 31 genotipos apomícticos y 11 clones sexuales experimentales. A su vez, también fueron superiores a las distancias genéticas reportadas por Cidade et al. (2008), mediante el uso de marcadores de ISSR, en un germoplasma de 95 entradas (93 tetraploides y 2 diploides). Las mayores distancias detectadas en este trabajo probablemente se deban, por un lado, a una distribución geográfica más amplia de los genotipos utilizados, y por el otro, a la naturaleza hipervariable de los marcadores de SSR (Toutz, 1989).

La falta de correlación entre distancia genética, relevada a partir de los marcadores de SSR, y distancia geográfica en los GTAN, estaría indicando la ausencia de una estructuración geográfica de las poblaciones naturales. Esta falta de estructura podría deberse a la colonización de nuevos nichos ecológicos, a partir de uno o unos pocos genotipos

apomícticos, lo que podría ocurrir a partir de transporte de las semillas en el tracto digestivo de animales herbívoros o bien por hidrocoria (Reyno et al., 2012). Estos individuos apomícticos tendrían ventajas reproductivas con respecto a los sexuales, para la colonización de estos nuevos nichos, debido principalmente a la posibilidad de una reproducción uniparental y otras ventajas evolutivas inherentes a su nivel tetraploide (Hörandl, 2006). La ausencia de correlación entre distancia genética y geográfica fue previamente reportada para *P. notatum*, mediante el uso de marcadores de AFLP (Espinoza et al. 2006), e ISSR (Cidade et al., 2008; Reyno et al., 2012), y resultados similares fueron encontrados en otras especies de reproducción apomíctica (Paun et al., 2006).

La amplificación de 56 marcadores específicos de los GTAN, ausentes en los GTSE, indica que los primeros estarían representando un mayor número de variantes alélicas con respecto a los GTSE. Esto se podría explicar por el número de genotipos empleados y el origen genético de cada uno de los dos grupos. Los GTAN empleados en la generación de la PTSS estaban representados por diez genotipos naturales que provienen de un origen genético diverso y una distribución geográfica muy amplia (Argentina, Bolivia, Brasil, México, Perú y Uruguay); mientras que los GTSE empleados fueron tres y dos de ellos con un origen genético en común, ya que el genotipo Q4205 se originó por autofecundación de SWSB. Por otro lado, la PTSS amplificó 122 loci que fueron compartidos con los GTAN, lo cual demuestra una efectiva transferencia de la variabilidad presente en los apomícticos, además de también compartir dos loci exclusivos de los GTSE. No hubo pérdida de variantes alélicas, luego de la recombinación de los híbridos  $F_1$ , lo que indica un correcto muestreo de los individuos a ser inter cruzados para la conformación de la PTSS.

El hecho de haber encontrado algunos genotipos de la PTSS con distancias genéticas muy bajas entre sí, probablemente se deba a que algunos individuos no se originaron por hibridación, producto del inter cruzamiento de las  $F_1$ s sexuales, sino producto de autofecundación de las mismas.

La variabilidad genética de la PTSS, medida a partir de la Heterocigosis esperada fue del doble a la encontrada en los GTSE (0,31 vs 0,15) y muy similar a la encontrada en los GTAN (0,31 vs 0,29). Cidade et al. (2009) obtuvieron un promedio de heterocigosis esperada de 0,7 a partir de 11 cebadores de microsatélite en un germoplasma de 25 colecciones de *P. notatum*, lo que estaría muy por encima de los valores reportados en la presente tesis. Más aún, cuando comparamos la media de heterocigosis esperada para los 7 cebadores utilizados en esta tesis, y por Cidade et al. (2009), vemos que éstos últimos reportan un valor de 0,74, más del doble al obtenido en la PTSS. Estas discrepancias

podrían deberse a que los 25 genotipos evaluados por Cidade et al. (2009) presenten una mayor diversidad genética que los 10 GTAN incluidos en ésta tesis. En un estudio reciente de Castro et al. (2016), los autores utilizaron un amplio número de cebadores de SSR y utilizaron, entre otros, al índice de Heterocigosis esperada para determinar el número mínimo de individuos necesarios para representar la diversidad presente en 4 especies de *Passiflora*. Los autores reportan valores de entre 0,47 y 0,53 para una muestra de 60 genotipos, mientras que en una muestra de 10 genotipos esos valores eran de 0,2 a 0,46, rango en el cual se ubican los GTAN y la PTSS de esta tesis. Sin embargo, los estudios anteriores fueron realizados sobre genotipos naturales que forman parte de distintas colecciones de germoplasma, lo que podría compararse con los GTAN de esta tesis, pero no con los GTSE y PTSS debido a que estos últimos fueron obtenidos de forma sintética. Phan et al. (2016) evaluaron la diversidad genética a partir de numerosos marcadores de SSR e InDels en 3 tipos comerciales de *Solanum lycopersicum*, incluyendo entre 12 y 36 híbridos comerciales en cada tipo originarios de distintas empresas comercializadoras de semillas. Los autores reportan que el tipo Cherry fue el de mayor variación con una heterocigosis esperada de 0,44, seguido del tipo “uva” con 0,33 y por último el tomate de mercado fresco con 0,3. En este caso si bien se trata de híbridos de distinto origen, no se incluyeron en el análisis los genotipos o líneas parentales utilizadas para su obtención, por lo que la comparación de estos resultados con los reportados en esta tesis es limitada. Estos valores, al igual que los reportados por Castro et al. (2016), son mucho más conservados que los reportados por Cidade et al. (2009) para *P. notatum*, probablemente debido a que los genotipos evaluados de ésta última especie fueron apomícticos y tetraploides, mientras que *Solanum lycopersicum* y las especies de *Passiflora* son sexuales y diploides.

El porcentaje de loci polimórficos de la PTSS fue dos veces y media el encontrado en los GTSE (98% vs 39%), y solo algo superior a la encontrada en los GTAN (98% vs 91%). Estos resultados, junto a los discutidos previamente, demuestran, en primer lugar, que la amplia variabilidad genética presente en el germoplasma apomíctico fue transferida exitosamente a la PTSS, y en segundo lugar, que fue posible la ampliación del pool génico del germoplasma tetraploide sexual experimental de *P. notatum*, permitiendo de esta manera disponer de uno de los recursos más importantes para el mejoramiento genético de la especie.

El AMOVA permitió observar que la mayor parte de la variabilidad (70%) es debida a variaciones dentro de las familias, mientras que el 30% restante se encuentra entre las familias. Esto indica que la mayor parte de la variabilidad aún se encuentra dentro de las

familias de medios hermanos, por lo que de tratar de representarse la variabilidad de la PTSS sería necesario que todas las familias se encuentren representadas. Probablemente la variabilidad se podría distribuir de forma más homogénea a partir de más ciclos de recombinación sobre una muestra representativa de la población.

La variabilidad molecular presente dentro de las familias de medios hermanos fue alta (Tabla 9), y con un coeficiente de variación bajo (11,54 para He y 11,67 para PLP), lo cual indica que los niveles de variabilidad molecular entre las familias son uniformes, por lo que ésta variabilidad se encuentra distribuida de forma uniforme entre las familias que componen la PTSS.

## **II.6.2 Variabilidad morfo-agronómica**

Un total de 6 variables morfológicas y 3 variables agronómicas fueron evaluadas sobre los GTSE, GTAN y una muestra de 140 individuos de la PTSS, con la finalidad de estimar la variabilidad presente en cada grupo de individuos y compararla con la detectada a nivel molecular.

Las variables altura, diámetro de planta y largo de hoja fueron las únicas que mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tres grupos de genotipos. En primer lugar, el valor medio de la altura de planta fue superior en la PTSS, seguida de los GTSE y por último los GTAN. En segundo lugar, el diámetro de planta fue superior en los GTAN con respecto a los GTSE y la PTSS. Cuando ambas variables son consideradas de forma conjunta, es posible determinar el hábito de crecimiento de éstos individuos. La PTSS presenta una altura de planta de alrededor del doble de su diámetro (44,8 cm vs 22,6 cm, respectivamente) lo que indica que las plantas de éste grupo tienden a un hábito de crecimiento más bien erecto. De forma contrastante vemos que los GTAN presentan prácticamente la misma altura que diámetro (33,43 cm vs 33,53 cm, respectivamente) indicando un hábito de crecimiento más postrado que el caso anterior. Por último, los GTSE presentan en promedio 1,6 veces más altura que diámetro (39,11 cm vs 25,28 cm, respectivamente) indicando un hábito de crecimiento intermedio entre los anteriores. Sin embargo, debido a los altos coeficientes de variación encontrados en los grupos, para ambas variables, es de esperar que se encuentren individuos con distintos hábitos de crecimiento dentro de cada uno de ellos.

La determinación del hábito de crecimiento es de gran importancia en el germoplasma de *P. notatum* debido a su relación con el potencial productivo y persistencia bajo pastoreo (Acuña et al., 2009; 2011; Interrante et al., 2009). La altura de planta estaría relacionada a la cantidad de biomasa que una planta deja expuesta a la defoliación, debido a que el material vegetal que se encuentra en los primeros 5 cm sobre el nivel del suelo, en general no es consumida por el animal en pastoreo, ni está al alcance de la maquinaria para su corte y confección de reservas (Gates et al., 2004). Esto queda en evidencia en este estudio, debido a la alta correlación entre las variables altura de planta y producción de materia seca ( $r=0,61$ ;  $p$ -valor  $<0,001$ ). El diámetro de planta está relacionado a la habilidad de la planta de extenderse a través de sus rizomas y macollos, dando lugar por un lado, a una mayor competencia con las malezas, y por el otro, a una mayor persistencia de la pastura, debido a que éstas son estructuras de reserva que permanecen fuera del alcance del corte o pastoreo (Interrante et al., 2009; Acuña et al., 2009; 2011). Por lo tanto, es deseable que las plantas presenten cierto equilibrio entre altura y diámetro, con el objeto de mantener una adecuada producción de materia seca y alta persistencia en sistemas de pastoreo. Por otro lado, Acuña et al. (2009) encontraron que los caracteres altura y diámetro de planta en *P. notatum* presentan una alta heredabilidad, siendo la  $H^2$  de 0,85 para altura y 0,69 para diámetro en híbridos de primera generación. En un estudio posterior, Acuña et al. (2011) encontraron valores de  $H^2$  para altura y diámetro, en híbridos de segunda generación, de 0,79 y 0,8, respectivamente. La alta variación presente en la PTSS para estos caracteres y el alto grado de determinación genética para ambos caracteres permitiría una alta ganancia genética a partir de sucesivos ciclos de selección.

La PTSS presentó la mayor longitud de lámina foliar con respecto a los otros grupos de genotipos, mientras que no se encontraron diferencias significativas en el ancho de hoja entre los tres grupos. Estos caracteres presentaron altos coeficientes de variación dentro de los grupos, en particular para largo de hoja, el cual mostró un rango entre 14,5 y 68 cm (Tabla V, Anexo). En un estudio reciente, Thaikua et al., 2014 analizaron caracteres morfológicos y nutricionales en 17 genotipos pertenecientes a tres especies de *Brachiaria*, incluyendo a un híbrido inter-específico del mismo género, encontraron una alta correlación ( $r=0,72$ ) entre la relación largo-ancho de hoja y la digestibilidad in vitro de la materia seca. Esta correlación indica que sería posible la selección indirecta de genotipos de calidad nutricional superior a partir de variables de medición más sencilla como son la longitud y ancho de hojas.

Las variables altura del eje floral y longitud de racimo no mostraron medias diferentes entre los tres grupos, como así tampoco entre los coeficientes de variación de éstos caracteres para los mismos grupos. Sin embargo, la variable altura del eje floral presentó altos coeficientes de variación en los tres grupos (>50%), indicando que existe una amplia variación para este carácter tanto en la PTSS como el germoplasma que le dio origen. Éste no fue el caso de la variable longitud del racimo, donde los coeficientes de variación fueron relativamente bajos en los tres grupos de genotipos (<22%), indicando una baja variabilidad para el carácter. En un estudio reciente, Cidade et al. (2013) evaluaron 9 caracteres vegetativos y reproductivos sobre un germoplasma de 58 genotipos de *P. notatum* de Brasil, los autores reportaron que las variables más informativas, en base a su capacidad de diferenciar grupos de genotipos, fueron la altura del eje floral y longitud del racimo. Los resultados expuestos en esta tesis fueron diferentes a los observados por Cidade et al. (2013) ya que ambos caracteres mostraron poca variabilidad en el germoplasma evaluado.

Las variables agronómicas no mostraron diferencias entre las medias de los tres grupos de genotipos; sin embargo, fueron las que arrojaron los mayores coeficientes de variación, lo que indica que existen amplias diferencias entre los genotipos dentro de los grupos. Por otro lado, es probable que los mayores coeficientes de variación en las variables agronómicas se deban en parte a que este tipo de variables son más influenciadas por el ambiente que las morfológicas. Acuña et al. (2009; 2011) reportaron valores de heredabilidad en sentido amplio de 0,65 y 0,77 para la variable tolerancia al frío en híbridos de primera y segunda generación, respectivamente. Esto indica que el carácter presenta un alto grado de determinación genética, lo que posibilitaría altas ganancias genéticas en los sucesivos ciclos de selección. La variable producción de materia seca presentó los coeficientes de variación más elevados, sin encontrarse diferencias significativas entre los coeficientes de los tres grupos de genotipos. Un dato que llama la atención es el elevado coeficiente de variación encontrado en los GTSE para las variables agronómicas, y en particular para la variable producción de materia seca (CV=99,7%), a pesar de que el número de genotipos incluidos en este grupo fue muy bajo. Este hecho se debe a las características contrastantes de los individuos que componen este grupo, ya que uno de ellos es un genotipo sexual selecto, por ser muy vigoroso y productivo (SWSB) (Tabla IV, Anexo), mientras que el genotipo C4-4x es un individuo obtenido por duplicación cromosómica de un diploide sexual, y como fue mencionado en el Capítulo I, estas plantas tienen un reducido vigor, menor fertilidad y baja producción de biomasa (Tabla IV, Anexo).

El análisis de componentes principales permitió separar a un grupo relativamente disperso de 7 GTAN, agrupados en el CP2, caracterizados principalmente por un alto diámetro de planta (Figura 16). El resto de los GTAN y los GTSE se encuentran relativamente dispersos, sin que sea posible agruparlos de alguna manera. Se puede observar que los 140 individuos de la PTSS se distribuyen de manera amplia, ubicándose muchos de ellos por fuera de los límites alcanzados por los GTAN y GTSE sobre el primer componente principal (CP1), indicando una amplia variabilidad, producto de los dos ciclos de recombinación realizados y probablemente por algún grado de segregación transgresiva para algunos de los caracteres evaluados. Por otro lado, se puede observar que hay un grupo de alrededor de un 10% de los individuos de la PTSS que se ubican hacia el sector derecho de la distribución y por fuera de los límites alcanzados por los GTAN y GTSE, y que corresponde a individuos que reúnen varias características de interés agronómico, principalmente producción de biomasa, como queda en evidencia a partir de los vectores que representan cada variable (Figura 16).

El dendrograma generado con los GTAN y GTSE, a partir de los marcadores morfo-agronómicos y sobre la base de las distancias Euclideas, permitió discriminar dos grupos, ubicando por un lado a individuos de reducido tamaño y vigor en el Grupo 1, y al resto de los genotipos de mayor tamaño y vigor en el Grupo 2. Este tipo de análisis sería de utilidad en la evaluación de germoplasmas de gran número de individuos ya que permitiría discriminar entre grupos de genotipos de interés agronómico de aquellos que no lo tienen. Crippa (2015) utilizando este tipo de análisis sobre 61 individuos de tres especies de *Cinara*, a partir de 13 caracteres morfo-fisiológicos, logró obtener 2 grandes grupos, uno formado por las especies *C. silvestris* y *C. cardunculus* y el otro por *C. scolimus*, y a su vez permitió subdividir a las dos primeras especies que se encontraban más relacionadas. El autor encontró diferencias en casi todas las variables morfo-fisiológicas entre los grupos, atribuyendo este hecho a los diferentes criterios de selección abordados para la especie *C. scolimus* en primer lugar, que apuntan a la obtención de capítulos comestibles, mientras que para la especie *C. cardunculus* el objetivo es la obtención de hojas comestibles.

El Análisis de Procrustes Generalizados mostró un consenso del 56% entre las distribuciones obtenidas a partir de los marcadores moleculares y marcadores morfo-agronómicos, lo que indica que existe un grado considerable de consenso entre los posibles agrupamientos obtenidos, en base a estos dos tipos de técnicas de análisis de variabilidad genética. Como era de esperar, en base a los resultados del análisis individual de las dos técnicas, no es posible distinguir agrupamientos de genotipos en base a las 2 componentes de la Figura 17.



La ausencia de correlación entre los resultados moleculares y morfo-agronómicos, obtenidos a partir de la prueba de Mantel, podría deberse a la naturaleza diferente del análisis de ambos marcadores, muchos microsatélites detectan variaciones en regiones no codificantes del ADN (Karlin et al., 2002; Qu et al., 2016); mientras que los morfo-agronómicos están relacionados con genes que se expresan y además están influenciados por el ambiente, por lo que variaciones a nivel de dichas regiones de ADN no necesariamente implican las mismas variaciones a nivel de caracteres morfo-agronómico. Además, puede que el número de variables morfo-agronómicas evaluadas no sea lo suficientemente alto como para representar la variabilidad a nivel del ADN. Otra causa de esta falta de correlación podría ser la naturaleza hipervariable de las regiones de microsatélites (Toutz, 1989), que dan lugar a una cierta sobre-estimación de las distancias moleculares; mientras que las distancias Euclideas, a partir de variables morfo-agronómicas, son más conservadas. Por otra parte, las variaciones a nivel de caracteres morfo-agronómicos están influenciadas por factores ambientales. En un estudio reciente, Cidade et al. (2013) evaluaron 9 caracteres vegetativos y reproductivos y 187 marcadores moleculares de SSR sobre 58 genotipos de *P. notatum* originarios de Brasil, encontrando una correlación muy baja entre estas dos estimaciones, atribuyendo este hecho al escaso número de variables morfológicas evaluadas. García et al. (2007) evaluaron la variabilidad molecular en base a 60 marcadores de RAPD y la variabilidad morfológica en base a 11 caracteres, en 8 poblaciones de *P. dilatatum* compuestas por 20 individuos cada una, reportando una ausencia de correlación entre ambas técnicas, y atribuyendo este hecho a que probablemente estos marcadores se encuentren en diferentes regiones del genoma. Brugnoli et al. (2014) trabajando con 17 poblaciones de *P. simplex* encontraron una correlación del 23% entre la variabilidad molecular estimada a partir de 163 marcadores de ISSR y la morfo-agronómica en base a 6 caracteres. Ferrari Usandizaga (2015) trabajando con 27 genotipos de *Acroceras macrum* encontró una correlación de 22% (p-valor 0,035) entre variabilidad molecular, medida a partir de 97 marcadores de ISSR, y la morfo-agronómica estimada en base a 13 caracteres, atribuyendo esta baja correlación a que la mayoría de los marcadores moleculares se encuentran en regiones no codificantes del genoma y a que los marcadores morfo-agronómicos pueden estar sesgados por efectos ambientales.

En el análisis de correlaciones entre variables, se observa que todas las agronómicas se encuentran fuertemente correlacionadas ( $r > 0,6$ ), lo que representa una gran ventaja para la selección de genotipos superiores, ya que permitirá obtener mejoras en los 3 caracteres de interés agronómico en forma conjunta. La alta correlación entre altura de planta y producción de materia seca ( $r = 0,61$ ) se debe a que plantas más erectas exponen una mayor proporción

de su biomasa al corte (altura mayor a 5 cm). La ausencia de correlación entre altura y diámetro de planta indica que éstos caracteres se comportan como independientes en *P. notatum*, por lo que la selección de individuos de mayor altura (y por la correlación mencionada anteriormente, mayor producción de materia seca) no irá en detrimento del diámetro de planta en las progenies. Ninguna de las variables mostró correlaciones negativas, por lo que no habría mayores impedimentos a la hora de seleccionar genotipos a favor de uno u otro carácter.

Los datos obtenidos a partir de las mediciones de las variables morfo-agronómicas serán utilizados en el programa de mejoramiento que se encuentra en curso en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE.

### **III.6.3 Fertilidad**

La producción de semillas es un carácter de suma importancia en los programas de mejoramiento de las especies forrajes que se multiplican por esta vía, debido a que su nivel de producción en muchos casos puede limitar su uso comercial (Rios et al., 2015) y su adopción por parte de los productores (Jank et al., 2011).

En este trabajo se logró caracterizar la fertilidad de la PTSS, en base a su producción de semillas en autopolinización forzada y polinización abierta, y compararla con la obtenida en el germoplasma sexual que le dio origen (GTSE) y otros genotipos diploides sexuales.

La producción de semillas en autopolinización de la PTSS fue altamente variable en función del genotipo, con individuos que van desde 0% hasta algunos con más del 50% de producción de semillas. Esto quedó reflejado en los elevados coeficientes de variación reportados en este estudio (Tabla 19). Estos resultados contrastan fuertemente con los reportados por Burton et al. (1970) donde los genotipos tetraploides produjeron menos de 0,1% de semillas en autopolinización, y los observados por Acuña et al. (2007) en 20 genotipos tetraploides sexuales que produjeron un 2% de semillas en promedio. Sin embargo, los genotipos tetraploides utilizados en esos estudios son producto de duplicación cromosómica con colchicina, los cuales se caracterizan por un bajo vigor y fertilidad. En un trabajo posterior de Acuña et al. (2009) se evaluó la fertilidad en autopolinización de híbridos sexuales de primera generación ( $F_1$ s) en dos años, obteniéndose una producción de semillas promedio de 31%, valor marcadamente superior al encontrado en genotipos

autoduplicados. Burton et al. (1955) reportaron disminuciones en la producción de materia seca en un 25% promedio, y de 34% en la producción de semillas (g/planta) en progenies diploides originadas por autopolinización. En concordancia con estos resultados, Acuña et al. (2009; 2011) concluyeron que los individuos tetraploides originados por autopolinización muestran una marcada disminución del vigor que puede ser apreciada por observación visual. Considerando los casos reportados de depresión por endogamia en la especie, será necesaria la identificación y selección de genotipos de la PTSS con baja autofertilidad para su incorporación a los programas de mejoramiento.

Debido a que prácticamente todos los genotipos de la PTSS mostraron cierta producción de semillas bajo autopolinización, su futura utilización en programas de mejoramiento por hibridación implicará la selección de aquellos que posean bajos niveles de autofertilidad, para facilitar los cruzamientos a gran escala sin el inconveniente de la emasculación previa.

Para el caso de la fertilidad en polinización abierta, la PTSS presentó niveles medios de producción de semillas comparables a los obtenidos en los cruzamientos controlados del Capítulo I. A su vez, los resultados fueron similares a los reportados por Burton et al. (1970) en cruzamientos entre genotipos autoduplicados (26%) y a los encontrados por Acuña et al. (2009) en cruzamientos entre genotipos tetraploides sexuales de origen híbrido y genotipos apomícticos (23%). Los niveles de producción de semillas de la PTSS se encuentra dentro de los rangos reportados para la especie, e incluso dentro de los rangos reportados para varios cultivares de algunas especies forrajeras perennes tropicales como *Brachiaria brizantha* (34%), *B. ruziziensis* (22%), *B. decumbens* (21%), *Pennisetum pedicellatum* (22%), *P. polystachion* (23%), *Setaria sphacelata* (43%), entre otros (Parihar y Pathak, 2006).

El factor “año de evaluación” presentó efectos significativos sobre la producción de semillas de la PTSS, encontrándose que en condiciones de autopolinización forzada fue inferior en 2014 con respecto a 2015 y 2016. Para el caso de producción de semillas en polinización abierta, los mayores valores se observaron en el año 2015. Estas diferencias pueden deberse a variaciones en las condiciones ambientales como temperatura, humedad ambiente y precipitaciones, y efecto de plagas y/o enfermedades inherentes a cada año de evaluación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Acuña (2006), donde se reportan efectos significativos del año de evaluación sobre los porcentajes de semillas, tanto en autopolinización como en polinización abierta, en un grupo de genotipos tetraploides autoduplicados de *P. notatum*. Por lo tanto, sería necesario evaluar la producción de semillas durante más de un año para obtener resultados más representativos.

Los genotipos diploides evaluados presentaron un nivel de producción de semillas en autopolinización de 16,75%. Estos resultados son contrastantes con los reportados por Burton (1955), donde los genotipos evaluados presentaron en promedio 6% de producción de semillas en autopolinización, mientras que los mismos alcanzaban valores promedio del 89,5% en polinización abierta. Sin embargo, el autor reporta marcadas variaciones en la producción de semillas en autopolinización, según el genotipo evaluado, donde algunas plantas produjeron 0% y otras superaron el 15%, alcanzando valores de hasta el 25%. Acuña (2006) por su parte reporta una producción media de semillas del 11% en autopolinización, pero con fuertes variaciones según el genotipo evaluado, reportando valores entre 0 y 52,4% en individuos del cultivar Pensacola, y entre 0 y 47% en el cultivar Tifton 9, del cual también se evaluaron algunos genotipos en esta tesis.

Los genotipos diploides evaluados alcanzaron una media del 52,35% de producción de semillas en polinización abierta, con una escasa variación entre ambos genotipos (CV=21,6%). Este porcentaje de producción de semillas está por debajo del 89,5% reportado por Burton et al. (1955), y algo por encima del 39% reportado por Acuña et al. (2006). Sin embargo, este último autor reporta fuertes variaciones de la producción de semillas entre genotipos, con rangos que van entre 12,7 y 62,8% en el cultivar Pensacola y entre 16,4 y 86,9% en individuos del cultivar Tifton 9. El hecho que en esta tesis se evaluaron unos pocos genotipos, y además durante un solo período de floración, restringe su análisis comparativo con otros trabajos relacionados, debido a las fuertes variaciones en la producción de semillas reportadas para los diploides de *P. notatum*. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los individuos diploides evaluados produjeron alrededor de tres veces más semillas en polinización abierta que en autopolinización, lo que indica que estos genotipos se comportan como alógamos, aunque con niveles variables de autogamia.

Los GTSE presentaron niveles variables de autofertilidad, con niveles del 3,4% en el caso del genotipo autoduplicado C4-4x, a valores hasta tres veces superiores como en los genotipos de origen híbrido (Tabla VIII, Anexo). La producción de semillas en polinización abierta fue significativamente superior a la producción en autopolinización. En el caso del genotipo C4-4x la fertilidad en polinización abierta fue tres veces superior (12,3%) a la encontrada en autopolinización (3,4%), mientras en el caso de los individuos SWSB y Q4205 la fertilidad en polinización abierta fue del doble (30,3% y 24,8% respectivamente) a la alcanzada en autopolinización forzada (14,3% y 12% respectivamente) (Tabla VIII, Anexo). La producción de semillas del genotipo autoduplicado C4-4x fue muy similar a la

reportada por Acuña et al. (2007) para genotipos del mismo origen, con valores promedio de 2% en autopolinización y 14% en polinización abierta. El genotipo Q4205 evaluado por Acuña et al. (2006) mostró una producción media de semillas de 16,1% en autopolinización y de 27,9% en polinización cruzada, ambos valores muy similares a reportados en esta tesis, de 12% y 24,8% para autopolinización y polinización abierta, respectivamente. El genotipo SWSB mostró una producción de semillas muy similar al genotipo Q4205, el cual se origina a partir de autopolinización del SWSB.

El análisis comparativo de la fertilidad, entre la PTSS, GTSE y Diploides, muestra que la PTSS alcanzó los mismos niveles de fertilidad observados en los GTSE, los cuales constituyen el germoplasma tetraploide sexual disponible en esta especie, con la ventaja de que la PTSS posee una base genética mucho más amplia, como quedó demostrado en este Capítulo. Por otro lado, el hecho de que la PTSS muestre la misma fertilidad que los genotipos diploides naturales, es evidencia de que la generación de un germoplasma tetraploide sexual experimental, no produjo una modificación en los niveles de fertilidad característicos del germoplasma sexual de la especie.

El fenómeno de autocompatibilidad parcial encontrado en este material, ya ha sido reportado en varias otras especies alógamas. Por ejemplo, Crowe (1971) encontró variaciones en los niveles de autocompatibilidad en una población de *Borago officinalis*, reportando que la misma disminuía a medida que la endogamia de la población aumentaba. Resultados similares fueron reportados por Lundqvist (1958), quien trabajando en poblaciones diploides y tetraploides de *Secale cereale*, demostró que a mayor heterocigosidad en los loci S-Z de autoincompatibilidad, mayores eran los niveles de autofertilidad de los individuos. Tomando en cuenta la naturaleza multialélica de estos loci en especies de gramíneas (Trang et al., 1982; Devey et al., 1994; Fearon et al., 1994), es esperable que numerosos alelos de estos loci hayan sido incorporados a la PTSS a partir de sus diversos parentales involucrados en su formación. En adición a esto, la formación de esta población involucró dos ciclos de recombinación, por lo que es esperable un alto grado de heterocigosidad en la misma. Este hipótesis podría explicar además la baja autofertilidad encontrada en individuos tetraploides duplicados de *P. notatum*, como fue reportado por Acuña et al. (2007), y como fue el caso del genotipo C4-4x usado en este estudio, el cual mostro 3,4% de semillas bajo autopolinización (Tabla VI, Anexo).

Otros autores como Wilkins y Thorogood (1992) atribuyen este debilitamiento del sistema de autoincompatibilidad a causas ambientales, encontrando que en *Lolium perenne* un tratamiento térmico de las inflorescencias a alta temperatura (34 °C) incrementó la

autofertilidad, desde 2,3% en condiciones naturales a 30,7% en el tratamiento aplicado. Teniendo en cuenta que en esta tesis las evaluaciones se llevaron a cabo durante el verano, y que la fertilidad en autopolinización forzada fue medida mediante ensobrado de las inflorescencias, previo al comienzo de la floración (antesis), es posible que las altas temperaturas hayan influido en los altos niveles de autofertilidad observados. Por otro lado, Williams y Webb (1987) reportaron que el ensobrado de flores de *Lycopersicon peruvianum* lleva a un debilitamiento del sistema de autoincompatibilidad, probablemente debido a una alta concentración de etileno, dióxido de carbono o altos niveles de humedad dentro de los sobres. Estos reportes sugieren que el mejor método para determinar fertilidad en autopolinización sería mediante aislamiento de las plantas individuales, lo cual es imposible en condiciones de campo debido a que la especie crece naturalmente en los alrededores.

La alta variabilidad encontrada en la producción de semillas de la PTSS, para ambos métodos de polinización y en los tres periodos evaluados, estaría relacionada al amplio acervo genético portado por el germoplasma involucrado en la generación de la PTSS y a los dos ciclos de recombinación realizados para su obtención. Estas altas variaciones en los niveles de fertilidad, tanto en autopolinización como en polinización abierta, fueron previamente reportados por Burton et al. (1955) y Acuña et al. (2006). Este último autor, reporta coeficientes de variación en genotipos diploides de entre 73 y 130% para producción de semillas en autopolinización y de 43 a 52% en polinización abierta. El mismo autor encuentra coeficientes de variación en genotipos autoduplicados de 69 a 133% y de 49 a 51% para la producción de semillas en autopolinización y polinización abierta respectivamente. Los coeficientes de variación reportados en esta tesis y los reportados por Acuña (2006), muestran que existe una mayor variación entre genotipos para autofertilidad que para fertilidad en polinización abierta. Este hecho podría estar relacionado a los distintos niveles de heterocigosidad entre genotipos para los loci S-Z de autoincompatibilidad descritos anteriormente.

Las comparaciones de fertilidad realizadas entre grupos de individuos que compartían un ancestro en común (SWSB, C4-4x y Q4205) no mostraron diferencias significativas entre grupos, tanto para la producción de semillas de las F<sub>1</sub>s sexuales inter cruzadas, como para autopolinización y polinización abierta de la PTSS. Esto nos estaría indicando que la baja fertilidad observada en el genotipo tetraploide duplicado C4-4x, se restablecería a niveles normales, a partir de la primera generación de híbridos, hecho que fue previamente reportado en la especie por Acuña et al. (2009). Sin embargo, no fue posible realizar una comparación estadística de la fertilidad entre los tres GTSE, por lo que la observación de la

menor fertilidad del genotipo C4-4x se basa únicamente en el hecho de que mostró un porcentaje de semillas muy inferior con respecto a los otros dos GTSE (Tabla VI, Anexo).

La observación de que existe correlación entre la fertilidad medida en autopolinización y polinización abierta representa un obstáculo en los programas de mejoramiento por hibridación, ya que la selección de individuos con altos niveles de fertilidad traería consigo mayores niveles de autogamia, y por ende mayor probabilidad de endocria. Sin embargo, es posible que a pesar de que las plantas muestren cierto nivel de autogamia, al momento de disponer de polen foráneo, la fecundación se dé con este último en lugar de con el polen propio. Este comportamiento fue observado en *Acroceras macrum*, una gramínea de la tribu Paniceae al igual que *P. notatum*, donde individuos con considerables niveles de autofertilidad al ser cruzados, sin emasculación previa, produjeron únicamente descendencia híbrida (Ferrari Usandizaga, 2015).

## II.7 CONCLUSIONES

- Los marcadores moleculares de SSR demostraron ser útiles en la detección de la variabilidad molecular en la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum*.
- La amplia variabilidad molecular encontrada en la población tetraploide sintética sexual de *P. notatum* es muy similar a la detectada en los progenitores apomícticos utilizado en su generación, lo cual demuestra que se logró transferir exitosamente la variabilidad existente en el germoplasma apomíctico, mediante el esquema propuesto de generación de una población sintética sexual.
- Los niveles de variabilidad molecular alcanzados por la población tetraploide sintética sexual duplicaron a los observados en los genotipos tetraploides sexuales experimentales originales, lo que demuestra que se logró incrementar el pool génico del germoplasma tetraploide sexual de *P. notatum*.
- La variabilidad a nivel morfo-agronómico de la PTSS fue muy similar a la presente en el germoplasma que le dio origen, lo que demuestra que se logró transferir la variabilidad del germoplasma apomíctico, generando un germoplasma tetraploide sexual con nuevas combinaciones entre caracteres.
- El gran número de individuos y los altos niveles de variabilidad de la PTSS la convierten en un germoplasma adecuados para los programas de mejoramiento de la especie.
- Numerosos individuos de la población tetraploide sintética sexual mostraron combinar varios caracteres agronómicos, superiores con respecto a los genotipos tetraploides apomícticos naturales y los sexuales experimentales, por lo que podrán ser incluidos al programa de mejoramiento de la especie.
- No hubo correlación entre la variabilidad molecular, medida a través de los marcadores moleculares de microsátélites, y la variabilidad morfo-agronómica, medida en base a 6 caracteres morfológicos y 4 agronómicos.



- Los niveles de fertilidad de la población tetraploide sintética sexual fueron similares a los observados en los genotipos tetraploides sexuales experimentales y sus contrapartes diploides sexuales.
- La fertilidad de la población tetraploide sintética sexual fue mayor en polinización abierta que en autopolinización, lo cual demuestra que básicamente se comporta como alógama, aunque con niveles variables de autogamia en función de los genotipos.
- La fertilidad medida en polinización abierta y autopolinización mostró una correlación positiva, lo que provoca un aumento en el grado de autogamia cuando aumenta la fertilidad general, lo cual es una desventaja desde el punto de vista del mejoramiento por hibridación.

# CAPITULO III

## SEGREGACIÓN DEL MODO DE REPRODUCCIÓN Y EXPRESIVIDAD DE LA AOSPORIA EN CRUZAMIENTOS DE PRUEBA

### III.1. INTRODUCCIÓN

Alrededor del 60% de la gramíneas tropicales se reproducen por apomixis (Jank et al., 2011). Dentro de este grupo se encuentran varias especies de gran importancia como forrajeras como es el caso de especies de los géneros *Brachiaria*, *Panicum*, *Penisetum*, *Paspalum*, *Cenchrus*, *Dichanthium*, entre otras (Jank et al., 2014). Debido a su importancia, varios programas de mejoramiento se han desarrollado en las últimas décadas en busca de liberar al mercado cultivares superiores, lo que en casi todos los casos consistió en la selección de variantes apomíticas naturales de los bancos de germoplasma (Vogel y Burson, 2004). Debido a su reciente aparición, el mejoramiento de especies forrajeras megatérmicas es considerado aún en su infancia comparándolo con el mejoramiento de cultivos mayores e incluso aquel desarrollado en forrajes templados (Jank et al., 2011). Varios esquemas de mejoramiento fueron propuestos para especies de reproducción apomítica que poseen individuos sexuales (de origen experimental) con el mismo nivel de ploidía de los apomíticos, estando la mayoría de estos esquemas orientados a la obtención de grandes familias segregantes para el modo de reproducción y la posterior selección de híbridos apomíticos superiores que se mantendrían inalterados en sucesivos ciclos de cultivo gracias a su reproducción asexual. Este esquema, sin embargo, probablemente no sea eficiente para el caso de *P. notatum* debido por un lado a las amplias distorsiones en la segregación del modo de reproducción a favor de los individuos sexuales, y por el otro a la expresividad variable de la apomixis en los híbridos apomíticos obtenidos (Acuña et al., 2009; 2011; Zilli et al., 2015), lo que podría llevar a obtener solo un 3% de híbridos altamente apomíticos.

Un esquema de mejoramiento alternativo para especies apomíticas fue propuesto por Miles (2007). El autor planteó el uso de una población sintética sexual sobre la cual se realice la selección de los genotipos sexuales en base al desempeño de sus progenies obtenidas, a partir de cruzamientos de prueba con genotipos o cultivares apomíticos superiores,

permitiendo a su vez la evaluación de híbridos apomícticos como potenciales cultivares. Este esquema permitiría la acumulación de efectos genéticos aditivos y no aditivos a través de los sucesivos ciclos de selección. Si bien este método de mejora brindaría una mayor eficiencia en la obtención de híbridos altamente heteróticos, es probable que no aporte mejoras a partir de un aumento en la proporción de híbridos altamente apomícticos en *P. notatum*.

Numerosos estudios sobre herencia de la apomixis en gramíneas forrajeras tropicales, concluyeron en que el carácter se hereda como un factor mendeliano simple (un gen o un block génico) y dominante (Savidan et al., 1983; Ndikumana, 1985; Sherwood et al., 1994; Valle et al., 1994; Martínez et al., 2001). Por lo tanto, aquellos individuos sexuales presentan un genotipo aa o aaaa, mientras que los apomícticos son heterocigotos simplexos con el genotipo Aaaa. El hecho de que no se hayan reportado genotipos duplexos o superiores es atribuido a un efecto de letalidad de los gametos con genotipo AA (Nogler 1984; Martínez et al., 2001; 2007). Bajo este modelo, las frecuencias genotípicas esperadas en la progenie son de 1:1 o 15:13 sexuales:apomícticos para una herencia tetrasómica con segregación cromosómica o cromatídica, respectivamente (Martínez et al., 2001). La única especie que presenta marcadas distorsiones en la segregación del carácter es *P. notatum*, con frecuencias promedio de 2,8:1 (Martínez et al., 2001) a 6,5:1 (Stein et al., 2004), y en el caso del Capítulo I de esta tesis con rangos de 1:1 a 8,6:1. Una discusión en lo referente a las posibles causas de las variaciones en las distorsiones de la segregación del carácter fue realizada en el Capítulo I de esta tesis. A su vez, también se discutió la influencia del progenitor masculino en la determinación del grado de distorsión en la segregación del carácter. Bajo esta hipótesis, sería posible seleccionar genotipos apomícticos que generen una mayor proporción de híbridos de reproducción apomíctica, en cruzamientos con genotipos sexuales de la población que manifiesten una alta aptitud combinatoria, permitiendo de esa manera aumentar la eficiencia del programa de mejora.

Otra limitante de importancia en la selección de híbridos apomícticos superiores es la expresividad variable de la apomixis en los híbridos obtenidos de progenies segregantes para el modo de reproducción. Savidan et al. (1981) reportaron que genotipos apomícticos de *Panicum máximum* presentan sexualidad residual, los cuales al ser cruzados por individuos tetraploides sexuales generan poblaciones segregantes para el modo de reproducción, y en las cuales los híbridos apomícticos presentan los mismos niveles de expresión de apomixis que sus progenitores masculinos. En el caso de *P. notatum*, los genotipos apomícticos naturales presentan una escasa sexualidad residual (1 a 10% de

sacos de origen meiótico) (Martínez et al., 2001; Espinoza et al., 2006; Rebozio et al., 2011) al igual que ocurre en *Panicum maximum*, dando en general progenies casi exclusivamente por la vía apomítica. Sin embargo, los híbridos apomíticos obtenidos en los cruzamientos entre estos genotipos altamente apomíticos y genotipos tetraploides sexuales, muestran niveles muy variables de expresividad del carácter (Martínez et al., 2001; Acuña et al., 2009, 2011; Zilli et al., 2015), permaneciendo aún desconocidos los factores genéticos que determinan dicha variación.

Otro hecho de interés, en lo referente a la expresividad de la apomixis, es el efecto que presentan ciertas condiciones ambientales sobre sus niveles de expresión. Uno de los primeros estudios sobre este fenómeno fue reportado por Knox (1967) en *Dichanthium aristatum*, donde se atribuyen las causas de estas variaciones de expresividad a las diferencias en el fotoperiodo de las dos localidades evaluadas en dicho estudio. En un estudio posterior, Quarin et al. (1986) demostraron una expresividad diferencial de la apomixis en *Paspalum cromoerhizon* según la estación del año en la que se evalúe, atribuyendo esta variabilidad principalmente a la longitud del fotoperiodo, apoyando la hipótesis de Knox (1967), aunque no descartan que actúen otros factores ambientales, como sequía y la temperatura, que inducirían a las plantas a producir una mayor descendencia por la vía sexual. El primer estudio de este tipo en *P. notatum* fue desarrollado por Burton (1982), reportando que individuos apomíticos bajo tratamientos con estrés hídrico, déficit de nutrientes y diferente fotoperiodo, no fueron capaces de generar descendencia por la vía sexual. Sin embargo, los autores admiten que la determinación del modo de reproducción, mediante observación visual sobre una muestra de 10 a 20 descendientes, no sería lo suficientemente sensible como para detectar bajos niveles de expresión de la sexualidad en individuos apomíticos facultativos. En un estudio más reciente, realizado sobre un grupo de genotipos apomíticos naturales de *P. notatum*, se demostró la presencia de sexualidad residual, tanto en el estadio de megagametofito como en los descendientes que se generaron (Rebozio et al., 2011). Los autores sugieren que este hecho estaría relacionado a ciertas ventajas evolutivas, ya que permitiría que las poblaciones apomíticas generen una cierta cantidad de nuevas combinaciones genéticas con ventajas adaptativas que les permitan colonizar nuevos nichos ecológicos. Los autores a su vez encontraron diferentes niveles de expresividad de la sexualidad, según el momento del ciclo de floración en la cual se evaluara, siendo inferior en plena floración y mayor al final de la misma, probablemente debidas a variaciones del fotoperiodo, como fue reportado por Knox (1967) y Quarin et al. (1986). Los niveles variables de expresividad de la apomixis es un hecho importante a tener en cuenta en los programas de selección de híbridos

apomícticos. Es necesario realizar su evaluación en la misma estación del año y en un periodo lo más corto posible, con la finalidad de obtener resultados más representativos y comparables entre individuos.

Desde un punto de vista práctico, la estimación de la expresividad de la apomixis puede medirse en diferentes etapas del proceso reproductivo (óvulo, semilla o progenie). Análisis citoembriológicos realizados mediante observación de sacos embrionarios maduros (Quarin et al., 1984, Ortiz et al., 1997; Martínez et al., 2001; Quarin et al., 2001; Acuña et al., 2009; Acuña et al., 2011) permiten distinguir la estructura diferencial de los sacos de origen meiótico (tipo Polygonum) y los de origen apospórico (tipo *Paspalum*) (Ortiz et al., 2013). También es posible medir el nivel de expresión de la apomixis en la etapa de semillas, a partir de la técnica de citometría de flujo (Matzk et al., 2000; Siena et al., 2008) que permite diferenciar las semillas originadas de procesos sexuales de aquellas derivadas de origen apospórico. Por último, es posible medir el nivel de expresión de la apomixis, a través de los descendientes que se generan por medio de pruebas de progenie con marcadores moleculares (Ortiz et al., 1997) o fenotípicos (Burton y Forbes, 1960). Sin embargo, estas últimas requieren mayor tiempo y recursos que las observaciones de sacos embrionarios o análisis de semillas.

Considerando que existen variaciones en la segregación del modo de reproducción en *P. notatum* (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Acuña et al., 2009; 2011) y en la proporción de híbridos con alto grado de expresión de la apomixis (Acuña et al., 2009; 2011; Zilli et al., 2015), es de fundamental importancia generar información para esclarecer las relaciones entre las combinaciones parentales y las proporciones generadas entre híbridos sexuales y apomícticos, y a su vez establecer los niveles de expresividad de la apomixis en estos últimos, particularmente en aquellos obtenidos en cruzamientos con genotipos superiores, con el objeto de lograr una mayor eficiencia en programas de mejoramiento y selección en la especie.

## III.2 HIPÓTESIS

1. La segregación del modo de reproducción, en progenies de *P. notatum* generadas a partir de cruzamientos entre genotipos tetraploides sexuales y apomícticos, se produce con proporciones mayores de descendientes sexuales que apomícticos.
2. Las proporciones de segregación entre sexuales vs. apomícticos son variables en cada progenie en función de los parentales apomícticos empleados en los cruzamientos.
3. La apomixis en los individuos tetraploides de *P. notatum* posee niveles variables de expresividad en función de los genotipos parentales.
4. Los niveles de expresividad de la apomixis en híbridos apomícticos, medidos por la presencia de sacos embrionarios apospóricos, provenientes de cruzamientos entre genotipos tetraploides sintéticos sexuales y cultivares apomícticos son variables, pero en la mayoría de los casos poseen altos niveles de expresión.

### III.3 OBJETIVOS

1. Determinar la segregación del modo de reproducción en familias híbridas, generadas por cruzamientos intraespecíficos entre genotipos de la PTSS y dos cultivares apomícticos de *P. notatum*.
2. Estimar el nivel de expresión de la aposporia a partir de la observación de sacos embrionarios maduros en los híbridos que del análisis de segregación previo fuesen clasificados como apomícticos.

## **III.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III.4.1 Material vegetal**

Se seleccionaron 11 individuos de la PTSS, cada uno de ellos provenientes de las 29 familias de medios hermanos descritas en el Capítulo I. Las plantas fueron seleccionadas a partir de variaciones fenotípicas apreciables a simple vista, y tratando de incluir individuos de diferente origen.

Los dos genotipos apomícticos utilizados como dadores de polen en este capítulo fueron seleccionados en base a su demostrado desempeño para la producción de forraje.

El cv. Boyero UNNE (Reg. N°3213) fue inscripto en el año 2012 en el Instituto Nacional de Semillas, y representa el primer cultivar de *P. notatum* de origen híbrido (Urbani et al., 2016). Presenta un hábito de crecimiento más erecto que los tetraploides comunes lo que lo hace apto para su uso tanto para pastoreo como para producción de heno. Demostró ser más productivo que el cv. Argentine, en ensayos comparativos de rendimiento, en el sudeste de EEUU y norte de Argentina, especialmente al inicio de la primavera y final del otoño (Urbani et al., 2016).

El cv. Argentine (PI 148996) fue introducido a los Estados Unidos por el USDA en 1945 y liberado como cultivar en 1951 (Killinger, 1951). Es un cultivar semierecto, de alta productividad y persistencia. Presenta hojas anchas y produce relativamente pocas inflorescencias comparado con otros cultivares. No tiene buena tolerancia a las bajas temperaturas, concentrando la mayor producción de forraje en el verano (Blount y Acuña, 2009). Es el cultivar tetraploide más difundido y utilizado en el sudeste de los Estados Unidos, ocupando alrededor de un 25% del área total de cultivo de *P. notatum*, y solo superado por el cultivar diploide Pensacola (Newman et al., 2014).

### **III.4.2 Cruzamientos entre genotipos de la PTSS y cultivares apomícticos**

Los cruzamientos se realizaron con la finalidad de evaluar, por un lado, la segregación del carácter apomixis en las progenies, y por otro, para estimar los niveles de expresión de la



apomixis en los híbridos clasificados previamente como apomícticos en las diferentes familias.

Se seleccionaron 11 individuos de la PTSS, tratando de tener representada la mayor variabilidad fenotípica de la población, los cuales fueron utilizados como progenitores femeninos en cruzamientos con dos cultivares tetraploides apomícticos de *P. notatum* (cv. Boyero UNNE y cv. Argentine). Los cruzamientos por ambos cultivares apomícticos fueron realizados de manera diferencial, debido a problemas que surgieron durante el primer período de realización. En el año 2014 se llevaron a cabo los primeros cruzamientos entre genotipos de la PTSS y el cv. Boyero UNNE. Los mismos fueron realizados sin el auxilio de la cámara de cruzamientos, por lo tanto no se pudieron llevar a cabo las emasculaciones previas de las plantas utilizadas como madres, debido a que el equipo humidificador que alimenta dicha cámara dejó de funcionar durante todo ese período de floración. A raíz de ello, los cruzamientos por el cv. Boyero UNNE fueron realizados mediante polinizaciones directas, sin emasculación previa, durante las primeras horas de iniciada la antesis de las plantas madres. Durante el período de floración del año 2015, se pudo contar nuevamente con el equipo humidificador, por lo que fue posible realizar los cruzamientos de forma controlada, con emasculación previa de las madres, y esta vez se utilizó el cv. Argentine como polinizador. Si bien el procedimiento de los cruzamientos difirió para los dos cultivares apomícticos empleados como progenitores masculinos, no fue un obstáculo para los posteriores análisis de segregación por el modo de reproducción y evaluación del nivel de expresión de la apomixis, debido a que se confirmó el origen híbrido de la totalidad de los descendientes de las familias en las cuales intervino como polinizador el cv. Boyero UNNE, ya que era muy probable que se obtuvieran descendientes producto de autofecundación de las plantas utilizadas como madres. Por su parte, en el caso de los descendientes de las familias provenientes del cv. Argentine, cuyos cruzamientos fueron realizados en cámara con emasculación previa de las madres sexuales, la confirmación del origen híbrido se realizó sobre una muestra al azar del 20% de los descendientes.

El procedimiento para llevar a cabo los cruzamientos directos, sin emasculación previa, consistió en coleccionar el día previo al comienzo de la floración (antesis) 2 inflorescencias de cada madre, portando un trozo de rizoma, los cuales fueron colocados en un recipiente de plástico de 1 litro, con agua limpia, y se ensobraron las panículas con sobre de papel sulfito. A la mañana siguiente, al momento de la antesis, se procedió a coleccionar polen del cv. Boyero UNNE, mediante un sobre de papel sulfito, el cual se colocó sobre las inflorescencias del progenitor femenino cuyas espiguillas florecieron (antesis), y se procedió

a polinizar por medio de agitación del sobre. Una vez concluido el procedimiento de polinización, las inflorescencias de las madres sexuales permanecieron ensobradas para evitar contaminación con polen de otra fuente. Este procedimiento se repitió durante 3-4 días hasta completar la floración de todas las espiguillas de la inflorescencia.

El procedimiento para los cruzamientos por el cv. Argentine, el cual fue realizado en cámara con emasculación previa de las madres sexuales, fue el mismo descrito en el Capítulo I (Ítem I.4.2)

Una vez transcurrido 25 a 30 días de finalizados los cruzamientos, se procedió a la cosecha, trilla manual y secado en estufa a 37 °C durante 48 h, para posteriormente separar las espiguillas con cariósides (semillas) de las sin ellos (vacías), mediante un equipo denominado “soplador de semillas” (Seedburo Equipment Company 1022W) que separa las espiguillas con semillas de las vanas por diferencia de peso. Finalmente, se determinó el porcentaje de producción de semillas para cada cruzamiento, en base al siguiente cálculo:  $(N^{\circ} \text{ de semillas} / N^{\circ} \text{ total de espiguillas}) * 100$ .

### **III.4.3 Determinación del origen híbrido de las progenies de los cruzamientos PTSS x cvs. apomícticos**

Se realizó para confirmar el origen híbrido de los descendientes de los cruzamientos entre genotipos de la PTSS y los cultivares apomícticos Boyero UNNE y Argentine de *P. notatum*. En el mes de agosto de 2014 y 2015 se realizó la siembra de las semillas obtenidas de los cruzamientos por el cv. Boyero UNNE y cv. Argentine, respectivamente. Previo a la siembra, se realizó el tratamiento de escarificado de las mismas, con ácido sulfúrico 98% durante 10 min, y la posterior siembra en bandejas bajo un invernadero. Una vez que las plántulas desarrollaron 3 hojas verdaderas, éstas fueron repicadas a bandejas plásticas individuales (*speedlings*). Un mes después del repique se procedió a realizar las extracciones de ADN genómico, siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo I (Ítem I.4.3.1). En el mes de noviembre de 2014 y 2015, las plantas fueron trasplantadas a campo dentro del Campo Didáctico y Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, siguiendo un marco de plantación de 1 m x 1 m.

Para confirmar el origen híbrido de las progenies, se realizó una prueba de paternidad, usando marcadores moleculares de ISSR y SSR. Las condiciones de amplificación,

electroforesis y detección de los marcadores de ISSR y SSR fueron las mismas descritas en el Capítulo I (Ítem I.4.3.2) y Capítulo II (Ítem II.4.2) respectivamente.

En los cruzamientos directos por el cv. Boyero UNNE, sin emasculación previa del progenitor femenino (año 2014), la prueba de paternidad fue realizada sobre el total de la descendencia; mientras que para los cruzamientos controlados con emasculación previa por el cv. Argentine (año 2015), la prueba fue realizada sobre una muestra del 20% de la descendencia. Se registraron como híbridos a todos aquellos individuos que amplificaron al menos dos marcadores específicos del padre, ya sea con los ISSR, SSR o ambos.

#### **III.4.4 Análisis de segregación del modo de reproducción en híbridos de PTSS x cvs. apomícticos**

El análisis de la segregación por modo de reproducción fue realizado en los descendientes identificados como híbridos en las familias generadas de los cruzamientos entre 11 genotipos de la PTSS y los cvs. apomícticos Boyero UNNE y Argentine durante los años 2014 y 2015, respectivamente. La clasificación reproductiva se llevó a cabo mediante el empleo de los dos marcadores RAPD (UBC243-377 y UBC259-1157) completamente ligado a la aposporia en *P. notatum* (Martínez et al., 2003) que previamente fueron utilizados en el Capítulo I para la clasificación reproductiva de los híbridos de las familias F<sub>1</sub>s (Ítem I.4.4.1).

La metodología empleada para la obtención de los ADN genómicos fue la misma descrita previamente en el Capítulo I (Ítem I.4.3.1). Por otra parte, la metodología para la generación de los marcadores de RAPDs fue la misma descrita en el Ítem I.4.4.1 del Capítulo I.

El análisis de la segregación por el modo de reproducción se realizó en base a la prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) para ajustar los rangos de segregación observados entre sexuales/apomícticos a los rangos esperados según el modelo genético propuesto.

## **II.4.5 Determinación del nivel de expresión de la apomixis en híbridos apomícticos de PTSS x cvs. apomícticos**

Se realizó con la finalidad de conocer la variación existente en los niveles de expresión de la apomixis, medida a través de la aposporia, en los híbridos apomícticos provenientes de las familias de los cruzamientos realizados entre los 11 genotipos de la PTSS y los cvs. apomícticos Boyero UNNE y Argentine. La determinación se hizo en función de la presencia de sacos embrionarios apospóricos en óvulos provenientes de espiguillas en antesis. El análisis se llevó a cabo en los híbridos que fueron clasificados como apomícticos, en base a la presencia de los marcadores de RAPD ligados al carácter apomixis UBC243-377 y UBC259-1157. La metodología de análisis y clasificación de los sacos embrionarios por técnicas citoembriológicas fue la misma descrita en el Capítulo I (Ítem I.4.4.2). El nivel de expresividad potencial de la apomixis fue calculado de la siguiente manera:  $(N^{\circ} \text{ de óvulos con sacos apospóricos} + N^{\circ} \text{ de óvulos con sacos meióticos} + \text{apospóricos}) / N^{\circ} \text{ total de pistilos observados}$ .

A partir de los datos obtenidos de la observación de sacos embrionarios maduros se calcularon medias y coeficientes de variación. Se realizó un análisis de la varianza no paramétrica a partir de la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las expresividades promedio de cada familia.

## III.5 RESULTADOS

### III.5.1 Cruzamientos por el cv. Boyero UNNE

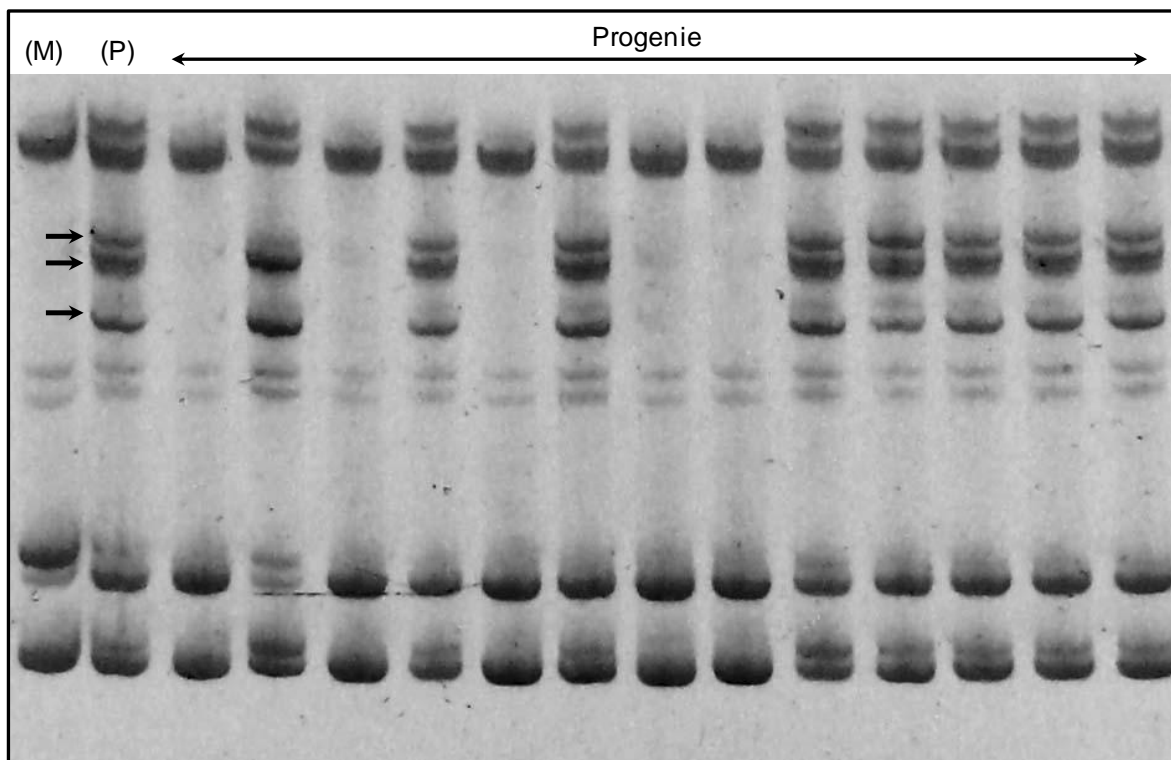
Un total de 11 individuos de la PTSS fueron cruzados por el cv. Boyero UNNE sin emasculación previa del parental femenino. Los porcentajes de producción de semillas fueron variables entre los parentales femeninos, abarcando un rango de entre 4,1 y 33,7%, con una media de 22,1% (Tabla IX, Anexo). Se obtuvieron 11 familias híbridas con 25 descendientes cada una, con excepción de la familia I48#1 de la cual se obtuvieron 16 individuos, lo que hace un total de 266 descendientes (Tabla 23).

**Tabla 23.** Familias obtenidas por cruzamientos entre genotipos de la PTSS y el cv. Boyero UNNE de *P. notatum*. Número de plantas por familia, número y porcentaje de híbridos en cada familia.

Familia*	N° de plantas	N° híbridos	% híbridos
A24-7	25	20	80
A41-2	25	20	80
C46-3	25	10	40
C6-2	25	11	44
E13-8	25	20	80
F13-2	25	9	36
G19-8	25	10	40
I48-1	16	13	81
J18-1	25	15	60
K19-8	25	11	44
L25-4	25	16	64
<b>Total</b>	<b>266</b>	<b>155</b>	<b>65</b>

\*Familia: grupo de descendientes producto del cruzamiento de cada genotipo de la PTSS como madre en los cruzamientos por el cv. Boyero UNNE.

Para determinar el origen híbrido de la progenie se utilizaron 8 cebadores de ISSR y uno de SSR para identificar bandas específicas del padre apomíctico (Figura 19). Los 8 marcadores de ISSR lograron amplificar 18 marcadores específicos del cultivar boyero y ausentes en algunas o todas las madres, mientras que el marcador de SSR permitió discriminar un total de 5 marcadores específicos. Estos marcadores fueron amplificados en proporción variable por los descendientes de cada cruzamiento. Aquellos individuos que amplificaron al menos 2 marcadores específicos fueron considerados híbridos, mientras que los demás fueron clasificados como producto de autopolinización de la madre. El porcentaje de híbridos logrados en cada combinación madre-padre fue muy variable, abarcando un rango de 36 a 81%, con un promedio general de 65%. De esta forma se lograron identificar 155 híbridos de un total de 266 descendientes obtenidos en 11 combinaciones madre-padre (Tabla 23).



**Figura 19.** Perfil molecular generado por el cebador de SSR PN02-G10 en gel de poliacrilamida al 6%. "M": Madre (E13-8); "P": Padre (cv. Boyero UNNE). Flechas indican los marcadores específicos del padre.

### III.5.2 Cruzamientos por el cv. Argentine

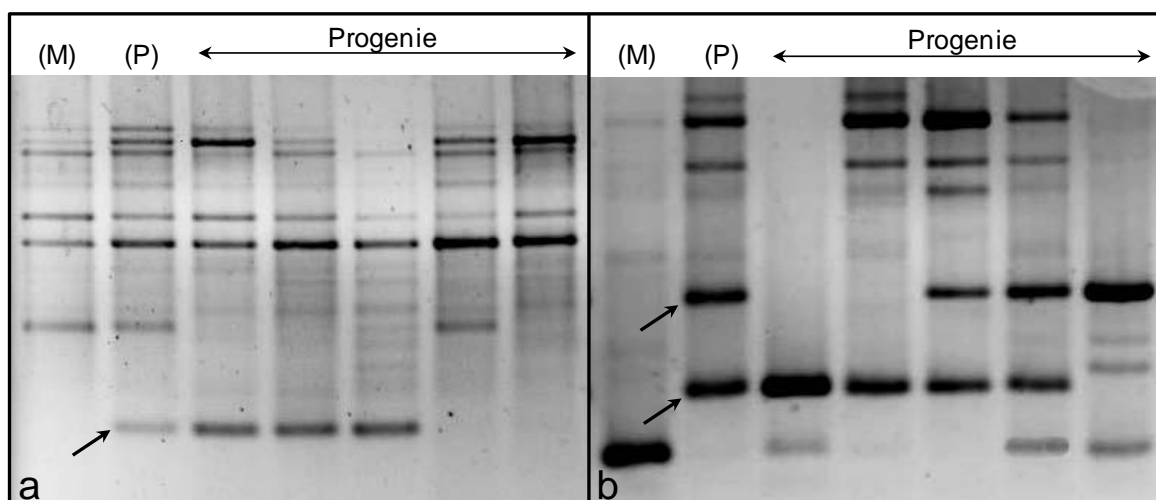
Los mismos 11 individuos utilizados como progenitores femeninos en los cruzamientos por el cv. Boyero UNNE en 2014 fueron cruzados por el cv. Argentine en 2015, mediante el procedimiento de emasculación previa de los parentales femeninos. Se obtuvieron 11 familias constituidas por 25 individuos cada una, con la excepción de las familias E13-8, I48-1 y K19-8 que estuvieron representadas por 6, 13 y 24 individuos respectivamente, lo que hizo un total de 243 individuos (Tabla 24). Los porcentajes de producción de semillas fueron muy variables, abarcando un rango de 7,7 a 72,6%, y una media de 36,1%, algo superior a la observada en los cruzamientos por el cv. Boyero (Tabla IX, Anexo).

**Tabla 24.** Familias obtenidas por cruzamientos entre genotipos de la PTSS y el cv. Argentine de *P. notatum*. Número de plantas por familia, número y porcentaje de híbridos en cada familia.

Familia*	N° de plantas	N° híbridos	Porcentaje de híbridos
A24-7	25	25	100
A41-2	25	25	100
C46-3	25	25	100
C6-2	25	25	100
E13-8	6	6	100
F13-2	25	25	100
G19-8	25	25	100
I48-1	13	13	100
J18-1	25	25	100
K19-8	24	24	100
L25-4	25	25	100
<b>Total</b>	<b>243</b>	<b>243</b>	<b>100</b>

\*Familia: grupo de descendientes producto del cruzamiento de cada genotipo de la PTSS como madre en los cruzamientos por el cv. Argentine.

La determinación del origen híbrido se llevó a cabo sobre una muestra de 5 individuos de cada familia (20%) mediante el uso de 9 marcadores de ISSR, que permitieron identificar un total de 22 marcadores específicos del cv. Argentine (Figura 20). Los 55 individuos evaluados amplificaron al menos dos marcadores específicos del cv. Argentine. Considerando que la muestra fue representativa de todas las progenies y al hecho que en este caso los cruzamientos fueron realizados de manera controlada, mediante emasculación previa de las madres, se asume que todos los individuos que conforman cada familia son híbridos (Tabla 24).



**Figura 20.** Perfiles moleculares generados a partir de electroforesis en geles de agarosa al 2% con marcadores de ISSR. **a)** patrón de amplificación del cebador  $(AG)_8-T$ ; **b)** patrón de amplificación generado con el cebador  $(AC)_8-T$ . Las flechas indican los marcadores específicos de cv. Argentine. "M": Madre (a. I48-1; b. A24-7); "P": cv. Argentine.

### III.5.3 Segregación del modo de reproducción en híbridos entre genotipos de la PTSS x cvs. apomícticos

#### III.5.3.1 Familias de PTSS x cv. Boyero UNNE

Entre los 155 híbridos identificados en las 11 familias generadas por cruzamientos entre genotipos de la PTSS y el cv. Boyero UNNE, se detectaron en total 31 híbridos que amplificaron los marcadores UBC243-377 y UBC259-1157 ligados a la aposporia por lo que

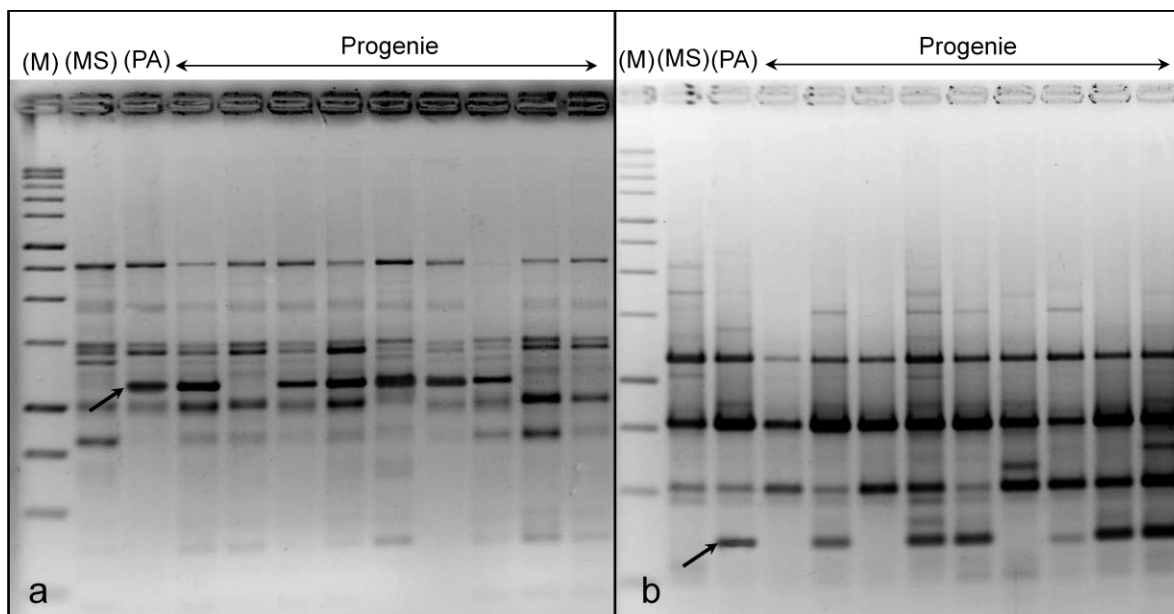


fueron clasificados como apomícticos (Tabla 25; Figura 21). El número de híbridos identificados como apomícticos entre familias fue muy variable, encontrándose familias donde no se obtuvieron individuos apomícticos hasta otras como la A24-7 con hasta 8 híbridos apomícticos (Tabla 25). La segregación del modo reproductivo de las familias A24-7, A41-2 y K19-8 presentaron una segregación sex:apo de 1,5, 2,3:1 y 2,7:1 respectivamente, las cuales se ajustaron a un modelo de herencia tetrasómica con segregación tanto cromosómica como cromatídica (p-valor > 0,05), mientras que la familia C6-2 se ajustó mejor a un modelo de herencia tetrasómica con segregación cromatídica (p-valor 0,099) (Tabla 25). El mejor ajuste fue obtenido con un modelo de segregación cromatídica en la familia A24-7, la cual presentó una segregación sex:apo de 1,5:1. El resto de las familias mostraron una segregación distorsionada a favor de híbridos sexuales que se alejaron significativamente de los modelos evaluados (Tabla 25).

**Tabla 25.** Familias de medios hermanos que comparten al cv. Boyero UNNE como progenitor masculino, número de híbridos sexuales y apomícticos, proporción de segregación del modo de reproducción para cada combinación, probabilidad de ajuste entre proporción observada y esperada para una herencia tetrasómica, con segregación de tipo cromosómica o cromatídica.

Familia	N° híbridos Sexuales	N° híbridos apomícticos	Proporción Sex:Apo	Segregación cromosómica (1:1)	Segregación cromatídica (15:13)
A24-7	12	8	1,5:1	0,527*	0,821*
A41-2	14	6	2,3:1	0,074	0,246
C46-3	10	0	1:0	0,002	0,006
C6-2	9	2	4,5:1	0,035	0,099
E13-8	19	1	19:1	<0,001	<0,001
F13-2	8	1	8:1	0,02	0,055
G19-8	9	1	9:1	0,011	0,036
I48-1	11	2	5,5:1	0,013	0,046
J18-1	12	3	4:1	0,003	0,017
K19-8	8	3	2,7:1	0,132	0,297
L25-4	12	4	3:1	0,045	0,150
Total	124	31	4:1	<0,001	<0,001

\* p-valor de la prueba de  $\chi^2$  para comparación entre la proporción sex:apo observada y esperada, según un tipo de herencia tetrasómica cuyos parentales sexuales y apomícticos poseen una constitución genotípica **aaaa** (sexual) y **Aaaa** (apomíctico).



**Figura 21.** Perfiles moleculares generados a partir de electroforesis en geles de agarosa al 2% con marcadores de RAPD 100% ligados al carácter apomixis en *P. notatum*. **a)** patrón de amplificación del cebador de RAPD UBC259 en una madre sexual (a. A24-7; b. A41-2) como control negativo (MS), el cv. apomítico Boyero UNNE (PA) y 9 individuos de su progenie. La flecha indica el marcador ligado a la aposporia (1157 pb). **b)** patrón de amplificación generado con el cebador de RAPD UBC243 en una madre sexual (-), el cv. apomítico Boyero UNNE (+) y 9 individuos de su progenie. La flecha indica el marcador ligado a la aposporia (1157 pb). M: Marcador de peso molecular 1kb.

### III.5.3.2 Familias de PTSS × cv. Argentine

De las 243 plantas generadas en los 11 cruzamientos, 54 de ellas amplificaron los marcadores UBC249-377 y UBC259-1157 ligados a la aposporia por lo que fueron clasificadas como apomíticas (Tabla 26), mientras que las 189 restantes fueron clasificadas como sexuales por no amplificar los marcadores ligados a la aposporia. Las proporciones de segregación sex:apo variaron entre 1:0 y 1,3:1, con un promedio general de 3,5:1 (Tabla 26). El valor promedio fue muy similar al encontrado en las familias  $F_1$ s del Capítulo I (ver Tabla 2). Las familias A24-7 y K19-8 mostraron una segregación sex:apo que se ajusta tanto a un modelo de segregación cromosómica como cromatídica, aunque con un mejor ajuste con ésta última. Las familias A41-2, C6-2 y J18-1 mostraron un ajuste bajo, pero significativo ( $p$ -valor $>0,05$ ), a un modelo de segregación cromatídica (Tabla 26). El resto de las familias

presentaron distorsiones en la segregación del modo de reproducción a favor de híbridos sexuales, y que no se ajustaron a ninguno de los modelos aquí evaluados (Tabla 26).

**Tabla 26.** Familias de medios hermanos que comparten al cv. Argentine como progenitor masculino, número de híbridos sexuales y apomícticos, proporción de segregación del modo de reproducción para cada combinación, probabilidad de ajuste entre proporción observada y esperada para una herencia tetrasómica, con segregación de tipo cromosómica o cromatídica.

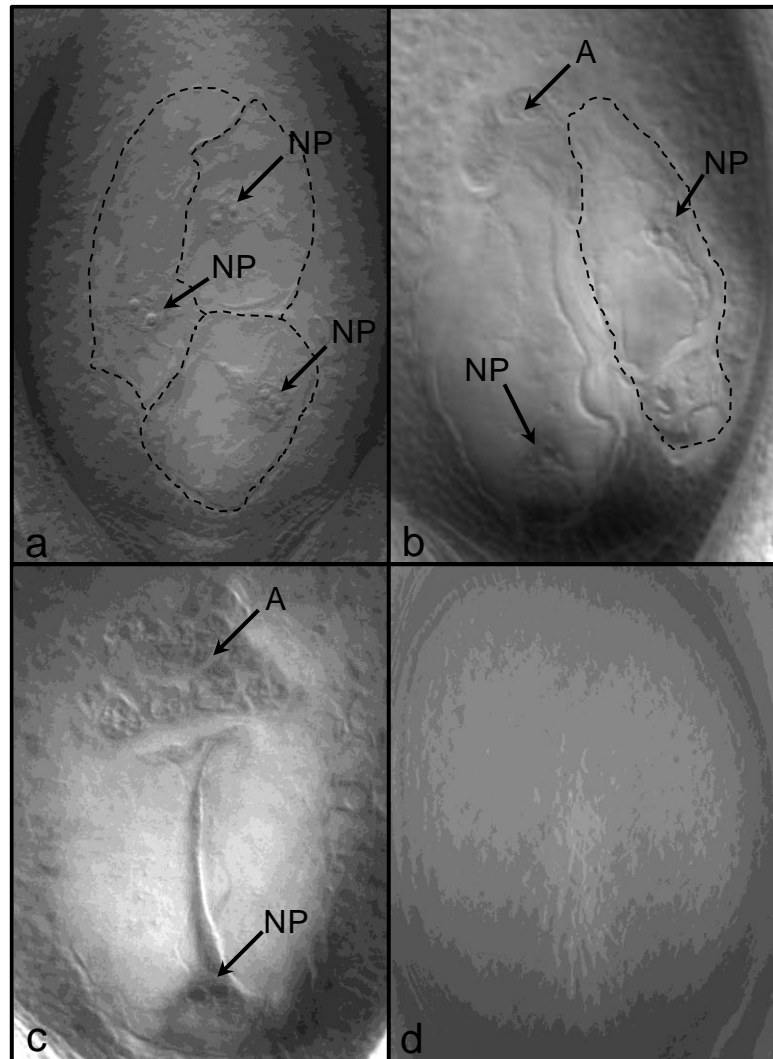
Familia	N° híbridos Sexuales	N° híbridos apomícticos	Proporción Sex:Apo	Segregación cromosómica (1:1)	Segregación cromatídica (15:13)
A24-7	14	11	1,3:1	0,549*	0,903*
A41-2	19	6	3,2:1	0,009	0,057
C46-3	23	2	11,5:1	<0,001	<0,001
C6-2	19	6	3,2:1	0,009	0,057
E13-8	6	0	1:0	<0,001	<0,001
F13-2	20	5	4:1	0,003	0,021
G19-8	22	3	7,3:1	<0,001	0,002
I48-1	10	3	3,3:1	0,005	0,008
J18-1	18	7	2,6:1	0,028	0,134
K19-8	14	10	1,4:1	0,410	0,782
L25-4	24	1	24:1	<0,001	<0,001
Total	189	54	3,5:1	<0,001	<0,001

\* p-valor de la prueba de  $\chi^2$  para comparación entre la proporción sex:apo observada y esperada, según un tipo de herencia tetrasómica cuyos parentales sexuales y apomícticos poseen una constitución genotípica **aaaa** (sexual) y **Aaaa** (apomíctico).

### III.5.4 Nivel de expresión de la apomixis en híbridos apomícticos

La observación de sacos embrionarios maduros a partir de pistilos diafanizados sobre todos los híbridos clasificados como apomícticos según los marcadores moleculares ligados a la aposporia permitió clasificar a los óvulos en 4 tipos según el tipo de estructura de sus sacos embrionarios. En primer lugar encontramos óvulos portando sacos embrionarios de origen apospórico, los cuales en general se encontraban en más de uno dentro de cada óvulo, comúnmente en grupos de 3 a 5, con casos extremos de hasta 12 sacos dentro de un mismo óvulo, estando en éste último caso muchos de ellos subdesarrollados (Figura 22a).

En segundo lugar encontramos óvulos mixtos que en todos los casos presentaron un único saco de origen meiótico y uno o múltiples sacos de origen apospórico de tamaño y posición variable (Figura 22b). En tercer lugar encontramos óvulos portando sacos de origen meiótico, los cuales siempre se encontraron en forma individual (Figura 22c). Por último encontramos óvulos con ausencia de sacos embrionarios o que abortaron su desarrollo en estadios tempranos sin presentar potencial para formar un embrión y endospermo (Figura 22d).



**Figura 22.** Ovarios diafanizados mostrando 4 óvulos de *P. notatum*. **a)** Tres sacos embrionarios apospóricos en un mismo óvulo los cuales se diferencian por la presencia de sus núcleos polares (NP). **b)** Un saco embrionario de origen meiótico con sus núcleos polares (NP) y antípodas (A) + un saco embrionario de origen apospórico con sus núcleos polares (NP). **c)** Un saco embrionario de origen meiótico donde en este plano se observan las antípodas (A) y los núcleos polares (NP). **d)** Saco embrionario abortado.

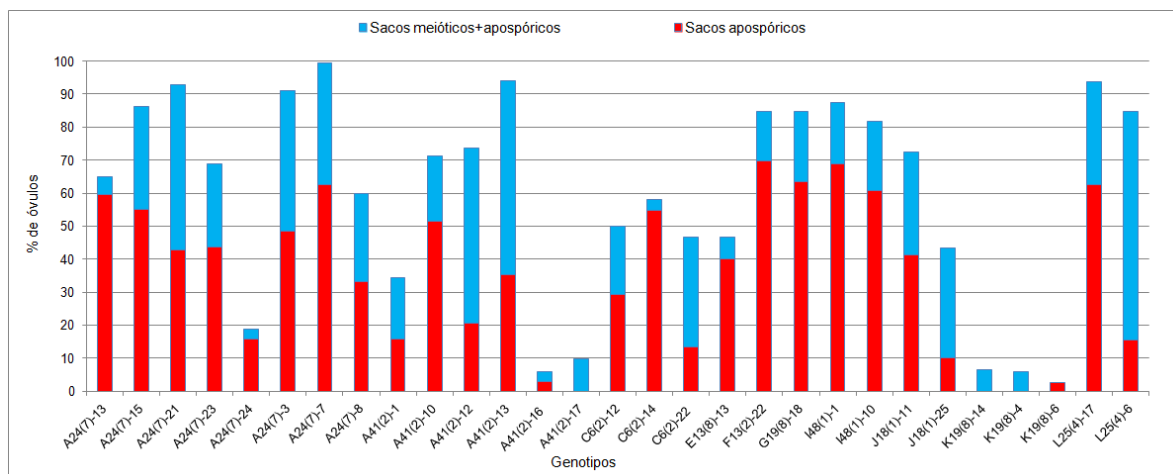
### III.5.4.1 Híbridos apomícticos de PTSS x cv. Boyero UNNE

Todos los híbridos clasificados como apomícticos por los marcadores moleculares ligados a la aposporia presentaron óvulos portando sacos embrionarios de origen apospórico. En la Tabla 27 se puede ver que la proporción de óvulos portando sacos embrionarios apospóricos fue muy variable, con un rango de 0 a 70%, y una media general de 35% (CV=67%). La proporción de óvulos portando ambos tipos de sacos embrionarios (meiótico + apospóricos) mostró un rango de 0 a 69%, muy similar al anterior, pero con una media de 24% (CV=75%). Por otro lado, los óvulos portando sacos embrionarios de origen meiótico presentaron una proporción media de 29% (CV=84%), con rango de 0 a 92%. Por último, los óvulos que carecían de sacos embrionarios viables presentaron una proporción de entre 0 y 45%, con una media de 11% (CV=98%).

Los porcentajes de expresividad potencial de la apomixis fueron muy variables entre individuos, abarcando un rango de 6% a 100%, con un promedio del 59,3% (CV=53,1) (Tabla 27; Figura 23). Estos niveles de expresividad fueron alcanzados con variable participación de óvulos portando sacos apospóricos y óvulos mixtos, es decir con ambos tipos de sacos embrionarios. Sin embargo, el híbrido K19(8)-6 presentó solo sacos apospóricos, y en una proporción del 3% (Tabla 27; Figura 23). Por otro lado, hubo híbridos como el A41(2)-17, K19(8)-4, K19(8)-14 que mostraron una expresividad del 10, 6 y 6% respectivamente, y en cuyos casos estos niveles fueron alcanzados sólo a partir de óvulos mixtos (S. meióticos + apospóricos) (Tabla 27; Figura 23). Los híbridos A24(7)-21, A24(7)-3, A24(7)-7, A41(2)-13, L25(4)-17 presentaron los niveles de expresividad más altos (>90%), de los cuales el híbrido A24(7)-7 se destaca con un 100% de expresividad potencial de la apomixis (Tabla 27; Figura 23).

**Tabla 27.** Porcentajes de óvulos portando sacos embrionarios apospóricos (S.E.A.), sacos embrionarios meióticos + apospóricos (S.E.M. + S.E.A.), sacos embrionarios meióticos (S.E.M.) y sacos embrionarios abortados (S.E.ab.), híbridos apomícticos producto de los cruzamientos entre genotipos de la PTSS como madres y el cv. Boyero UNNE como padre.

Genotipo	Proporción de óvulos portando:			
	S.E.A.	S.E.M + S.E.A.	S.E.M.	S.E.ab.
A24(7)-13	59	5	22	14
A24(7)-15	55	31	9	4
A24(7)-21	43	50	7	0
A24(7)-23	44	25	25	6
A24(7)-24	16	3	59	22
A24(7)-3	48	42	6	3
A24(7)-7	63	37	0	0
A24(7)-8	33	27	17	23
A41(2)-1	16	19	42	24
A41(2)-10	51	20	20	9
A41(2)-12	21	53	26	0
A41(2)-13	35	59	3	3
A41(2)-16	3	3	49	45
A41(2)-17	0	10	65	25
C6(2)-12	29	21	44	6
C6(2)-14	55	3	39	3
C6(2)-22	13	33	43	10
E13(8)-13	40	7	40	13
F13(2)-22	70	15	6	9
G19(8)-18	64	21	12	3
I48(1)-1	69	19	12	0
I48(1)-10	61	21	15	3
J18(1)-11	41	31	14	14
J18(1)-25	10	33	27	30
K19(8)-14	0	6	74	20
K19(8)-4	0	6	70	24
K19(8)-6	3	0	92	5
L25(4)-17	63	31	6	0
L25(4)-6	15	69	4	12
<b>Promedios</b>	<b>35</b>	<b>24</b>	<b>29</b>	<b>11</b>

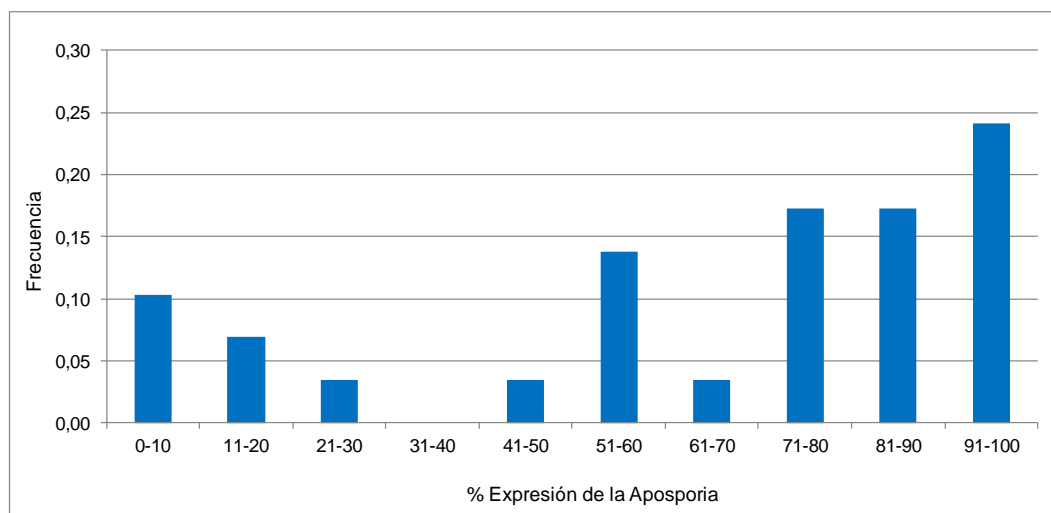


**Figura 23.** Distribución del porcentaje de óvulos portando sacos meióticos+apospóricos y sacos apospóricos, en los 29 genotipos híbridos apomícticos obtenidos en los cruzamientos entre genotipos de la PTSS por el cv. Boyero UNNE.

Todos los híbridos evaluados presentaron potencial para la reproducción sexual debido ya sea a la presencia de óvulos con sacos meióticos o con sacos meióticos+apospóricos, o más comúnmente ambos. Ésta expresividad potencial de la sexualidad presentó un rango de 21% en el híbrido F13(2)-22, a 100% en los híbridos A41(2)-17, K19(8)-14 y K19(8)-4 (Tabla 27; Figura 23).

El análisis de la varianza no paramétrica a partir de la prueba de Kruskal-Wallis no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las expresividades de cada familia (p-valor 0,103).

Los agrupamientos realizados según los rangos en porcentaje de expresión de la apomixis, sin considerar aquellos óvulos incapaces de producir una semilla (que presentaban sacos embrionarios abortados), mostraron una distribución discontinua, con baja o nula frecuencia de individuos en los rangos de expresión que van de 20 a 50%, predominando las frecuencias con alta (>70%), media (51-60%) y baja expresividad (<10%) (Figura 24).



**Figura 24.** Frecuencias observadas en el porcentaje de expresividad de la aposporia, expresada por rangos, en híbridos apomícticos provenientes de cruzamientos entre genotipos de la PTSS y el cv. Boyero UNNE. En el cálculo de los porcentajes se excluyeron los óvulos con ausencia de sacos embrionarios.

### III.5.4.2 Híbridos apomícticos de PTSS × cv. Argentine

Todos los híbridos clasificados como apomícticos por los marcadores moleculares ligados a la aposporia presentaron proporciones variables de sacos embrionarios de origen apospórico. En la Tabla 28 se observa que la proporción de óvulos portando sacos apospóricos presenta un rango de 0 a 91%, con una media de 27% (CV=80%). El segundo tipo de óvulos que aporta a la expresividad de la apomixis, óvulos mixtos, presentaron un rango de 0 a 77%, con una media de 37% (CV=56%). La proporción de óvulos portando sacos de origen meiótico varió entre 0 y 52%, con una media general de 24% (CV=54%). Por último, la proporción de óvulos portando sacos abortados presentó niveles muy variables, con un rango de 0 a 61%, y una media de 12% (CV=115%).

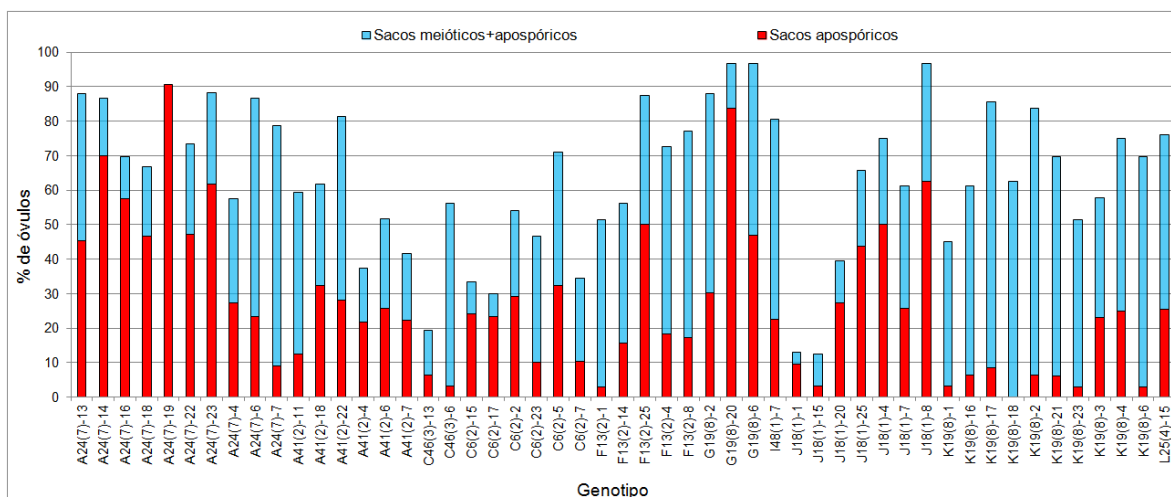


**Tabla 28.** Porcentajes de óvulos portando sacos embrionarios apospóricos (S.E.A.), sacos embrionarios meióticos + apospóricos (S.E.M. + S.E.A.), sacos embrionarios meióticos (S.E.M.) y sacos embrionarios abortados (S.E.ab.), en los híbridos apomícticos producto de los cruzamientos entre genotipos de la PTSS como madres y el cv. Argentine como padre.

Genotipo	Proporción de óvulos portando:			
	S.E.A.	S.E.M + S.E.A.	S.E.M.	S.E.ab.
A24(7)-13	45	42	3	9
A24(7)-14	70	17	13	0
A24(7)-16	58	12	30	0
A24(7)-18	47	20	23	10
A24(7)-19	91	0	3	6
A24(7)-22	47	26	26	0
A24(7)-23	62	26	9	3
A24(7)-4	27	30	36	6
A24(7)-6	23	63	13	0
A24(7)-7	9	70	9	12
A41(2)-11	13	47	31	9
A41(2)-18	32	29	24	15
A41(2)-22	28	53	13	6
A41(2)-4	22	16	34	28
A41(2)-6	26	26	29	19
A41(2)-7	22	19	28	31
C46(3)-13	6	13	42	39
C46(3)-6	3	53	34	9
C6(2)-15	24	9	36	30
C6(2)-17	23	7	40	30
C6(2)-2	29	25	33	13
C6(2)-23	10	37	30	23
C6(2)-5	32	39	19	10
C6(2)-7	10	24	48	17
F13(2)-1	3	49	40	9
F13(2)-14	16	41	28	16
F13(2)-25	50	38	9	3
F13(2)-4	18	55	21	6
F13(2)-8	17	60	11	11
G19(8)-2	30	58	9	3
G19(8)-20	84	13	3	0
G19(8)-6	47	50	0	3
I48(1)-7	23	58	16	3
J18(1)-1	10	3	26	61
J18(1)-15	3	9	47	41
J18(1)-20	27	12	21	39
J18(1)-25	44	22	19	16
J18(1)-4	50	25	13	13
J18(1)-7	26	35	29	10

J18(1)-8	63	34	3	0
K19(8)-1	3	42	52	3
K19(8)-16	6	55	39	0
K19(8)-17	9	77	14	0
K19(8)-18	0	63	31	6
K19(8)-2	6	77	16	0
K19(8)-21	6	64	30	0
K19(8)-23	3	49	40	9
K19(8)-3	23	35	38	4
K19(8)-4	25	50	25	0
K19(8)-6	3	67	30	0
L25(4)-15	25	51	18	6
<b>Promedios</b>	<b>27</b>	<b>37</b>	<b>24</b>	<b>12</b>

La expresividad de la apomixis fue evaluada en 51 híbridos clasificados como apomícticos, por medio de los dos marcadores RAPD 100% ligados al carácter, los cuales se originaron a partir de los cruzamientos entre 11 genotipos de la PTSS y el cv. Argentine. Los niveles de expresión fueron muy variables entre genotipos mostrando un rango de entre 11 y 97%, con una media del 64,1% (CV=33,6) (Tabla 28; Figura 25). Como se puede ver en la Tabla 28 y Figura 26, y al igual que ocurrió en los híbridos resultantes de los cruzamientos por el cv. Boyero UNNE, la participación de los óvulos portando exclusivamente sacos embrionarios apospóricos fue muy variables, con valores que van de 0% en el híbrido K19(8)-18, a 91% en el híbrido A24(7)-19. El mismo comportamiento se observa con los óvulos mixtos (S. meióticos + apospóricos), mostrando un rango que va de 0% en el híbrido A24(7)-19, a 77% en los híbridos K19(8)-17 y K19(8)-2. Los híbridos A24(7)-9, G19(8)-20, J18(1)-8 y G19(8)-6 fueron los que presentaron expresividades superiores al 90%; Cuando observamos qué proporción de ésta expresividad es debida a cada tipo de sacos, vemos que los híbridos A24(7)-9 y G19(8)-20 son los que muestran más del 80% de su expresividad a partir de sacos exclusivamente apospóricos (Tabla 28; Figura 25), lo cual es algo deseable para un futuro cultivar.

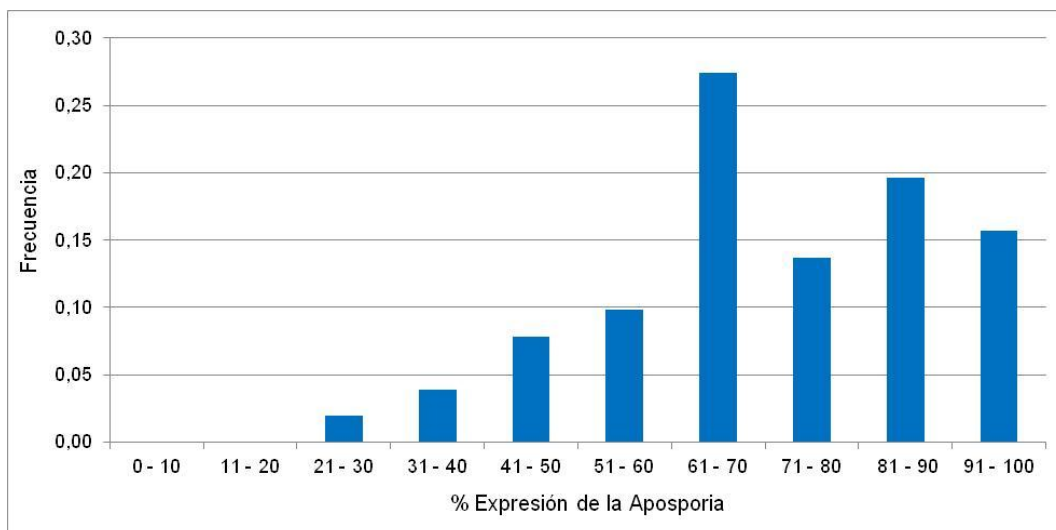


**Figura 25.** Expresividad potencial de la apomixis en función de la sumatoria del porcentaje de óvulos portando sacos apospóricos más óvulos con sacos meióticos+apospóricos, en 51 híbridos apomícticos obtenidos en los cruzamientos entre genotipos de la PTSS por el cv. Argentine.

El análisis de la varianza no paramétrica a partir de la prueba de Kruskal-Wallis al 0,05 permitió observar que el promedio de la expresividad de la familia G19-8 fue mayor que los encontrados en las familias K19-8, J18-1, A41-2, C6-2, C46-3, aunque sin diferencias significativas con las familias I48-1, A24-7, L25-4, F13-2. Sin embargo, vale aclarar que el número de híbridos evaluados para cada familia fue muy variable, estando 2 familias representadas por un único individuo, por lo tanto las comparaciones realizadas deben ser tomadas con cierta precaución.

Todos los individuos evaluados presentaron potencial para la reproducción sexual debido a la presencia de óvulos con sacos meióticos o debido a la presencia de óvulos con sacos meióticos acompañados de sacos apospóricos, o en el caso más común, por ambos tipos de óvulos. En la Tabla 28 se puede ver que el potencial de expresión de la reproducción sexual (óvulos con sacos meióticos + óvulos con sacos meióticos + apospóricos) es muy variable, con un rango que va de 3% en el genotipo A24(7)-19 a 100% en el híbrido K19(8)-18.

El agrupamiento de los individuos según rangos de expresividad de la apomixis, sin considerar los óvulos incapaces de producir semillas, muestra que no se encontraron niveles de expresividad baja (<20%). En segundo lugar, se puede ver una baja frecuencia de individuos con expresividad media (20 a 60%), y por último, hay una alta proporción de híbridos con expresividad alta (>60%). Un 36% de los híbridos mostraron una expresividad muy alta del carácter (>80%) (Figura 26).



**Figura 26.** Frecuencias observadas en el porcentaje de expresividad de la aposporia, expresada por rangos, en híbridos apomícticos provenientes de cruzamientos entre genotipos de la PTSS y el cv. Argentine. En el cálculo de los porcentajes se excluyeron los óvulos con ausencia de sacos embrionarios.

## III.6 DISCUSIÓN

Las proporciones de segregación del modo de reproducción en *P. notatum* son muy variables entre los diferentes estudios realizados en las últimas décadas, siendo esta segregación de tipo distorsionada a favor de híbridos sexuales en casi todos los casos reportados. A su vez, los híbridos apomícticos producidos en estas familias segregantes para el modo de reproducción, presentan niveles variables de expresividad del carácter apomixis. Estos hechos llevan a una menor eficiencia en los programas de mejora que apuntan a la selección de híbridos apomícticos heteróticos, por lo que es de gran interés determinar cuál es el efecto de cada parental y combinación de los mismos, tanto sobre el grado de distorsión en la segregación del modo de reproducción de sus progenies, como así también en los niveles variables de expresividad de la apomixis de sus híbridos.

En este capítulo se evaluó la segregación del modo de reproducción, en 22 familias F<sub>1</sub> originadas a partir del cruzamiento entre 11 individuos de la población tetraploide sintética sexual y dos cultivares apomícticos superiores (cvs. Boyero UNNE y Argentine). Además, se estimó el nivel de expresividad de la apomixis, en todos aquellos híbridos que resultaron ser apomícticos, según la clasificación realizada con dos marcadores de RAPD 100% ligados al carácter.

### III.6.1 Segregación del modo de reproducción en cruzamientos de prueba

Se obtuvieron porcentajes muy variables de híbridos en los cruzamientos realizados por el cv. Boyero UNNE sin emasculación previa del parental femenino. Esta variación probablemente sea debida a los niveles variables de autocompatibilidad de los progenitores femeninos utilizados en los cruzamientos. En un estudio reciente de Ferrari Usandizaga (2015) en *Acroceras macrum*, el autor reporta que los individuos evaluados producían semillas bajo autopolinización forzada, sin embargo, cuando estas plantas disponían de polen propio y externo, solo producían descendencia a partir del polen foráneo. Los resultados aquí reportados indican que ese fenómeno ocurriría en menor grado en los individuos aquí evaluados debido a que los individuos produjeron descendencia por autofecundación aún disponiendo de polen foráneo.

La segregación del modo de reproducción fue muy variables entre las diferentes familias con rangos de entre 1:0 y 1,3:1 (sexuales vs apomícticos). Acuña (2006) evaluó la segregación del modo de reproducción en 5 progenies de 3, 13, 3, 10 y 9 híbridos obtenidos a partir del cruzamiento entre genotipos tetraploides sexuales experimentales y el cv. Argentine, reportando segregaciones sex:apo de 0,5:1, 1,17:1, 2:1, 4:1 y 8:1 respectivamente. El mismo autor evaluó otras 4 progenies de 4, 6, 15 y 2 descendientes que compartían al híbrido apomíctico Tifton 7 como progenitor masculino, reportando segregaciones de 0,33:1, 2:1, 2:1 y 1:0 respectivamente. En un trabajo más reciente, Acuña et al. (2011) realizaron varios cruzamientos entre híbridos tetraploide sexuales y genotipos apomícticos, el cv. apomíctico Argentine fue utilizado como progenitor masculino en 3 de esos cruzamientos, encontrando segregaciones de 1:0, 3:1 y 1:1 para progenies de 16, 12 y 4 híbridos respectivamente. En el mismo trabajo se evaluaron 3 progenies de 3, 16 y 19 híbridos que compartían al híbrido apomíctico Tifton 7 como progenitor masculino, reportando segregaciones sex:apo de 1:0, 1:0 y 8,5:1 respectivamente. Los rangos de segregación obtenidos en este Capítulo estarían dentro de los rangos reportados por estos autores. Sin embargo, las progenies evaluadas en los cruzamientos realizados por Acuña (2006) y Acuña et al. (2011) tienen un número muy reducido de descendientes debido a que el objetivo de su trabajo no fue evaluar la segregación del modo de reproducción. A pesar de ello, estos resultados indican una alta variación en las proporciones de segregación sex:apo en cruzamientos entre distintos parentales femeninos con un mismo parental masculino, y cuya variación fue observada también en esta tesis.

En este Capítulo se puso a prueba la hipótesis planteada en el Capítulo I acerca de que las distorsiones en la segregación del modo de reproducción estarían influenciadas por el parental masculino y no por la combinación entre parentales. Si ésta hipótesis fuese correcta, se esperaría que las proporciones en la segregación por el modo de reproducción entre familias obtenidas a partir del cruzamientos entre madres tetraploides sexuales y un mismo parental apomíctico sean las mismas o similares. La amplia variación observada en este estudio, en las proporciones entre sexuales vs apomícticos, para un mismo parental masculino, sugiere que esta hipótesis es falsa. Sin embargo, como se explicó al principio de la discusión, el bajo y variable número de híbridos evaluados para cada combinación (9 a 20 para el cv. Boyero y 6 a 25 para el cv. Argentine) no nos permite rechazar taxativamente dicha hipótesis. Si lo comparamos con los resultados observados en las progenies F<sub>1</sub>s evaluadas en el Capítulo I vemos que en ese caso se analizaron entre 39 y 50 híbridos por familia. Otra diferencia con respecto al análisis de la segregación realizado en el Capítulo I es que en aquel caso se utilizaron sólo tres genotipos sexuales, dos de ellos muy

emparentados entre sí; mientras que en los cruzamientos pruebas realizados en este Capítulo fueron empleados 11 genotipos y con un origen genético más diverso. En análisis de segregación de la apomixis previos, realizados en dos trabajos de *P. notatum* por los mismos integrantes del grupo de investigación (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2007) se encontraron proporciones entre sexuales vs apomícticos muy diferentes al utilizar incluso los mismos progenitores sexuales y apomícticos para la generación de los híbridos. Martínez et al. (2001) encontraron proporciones en  $F_1$  de 2,8:1 (sex:apo), empleando como genotipo sexual a Q4188 y como apomíctico a Q4117; mientras que Stein et al. (2007) observaron en  $F_1$  una segregación de 6,5:1 (sex:apo) usando los mismos parentales. Una de las diferencias entre ambos estudios fue que en el caso de Martínez et al. (2001) se analizaron 213 híbridos, mientras que en Stein et al. (2007) fueron 115 híbridos. Otra diferencia fue que en el primer trabajo se utilizó como fuente dadora de polen una población cultivada del padre apomíctico Q4117 y en el segundo trabajo el polen para los cruzamientos se obtuvo de una sola planta del genotipo Q4117. En el primer caso, al trabajar con una población cultivada hacía varios años cabe la posibilidad que la misma no se haya mantenido pura (compuesta por un único genotipo) por lo que el polen utilizado pudo no haber provenido de un único genotipo, sino de más de uno, debido a que la población sufrió variación genotípica producto de segregación por recombinación genética o contaminación con semillas de otros genotipos.

Otro hecho llamativo, y discrepante con la hipótesis mencionada anteriormente, es que las madres (A24-7, A41-2, K19-8) que mostraron una alta proporción de descendientes apomícticos, en cruzamientos por el cv. Boyero, también lo hicieron en cruzamientos por el cv. Argentine (Tabla 25; 26). Lo mismo ocurrió con aquellas madres (C46-3 y E13-8) que mostraron una muy alta segregación a favor de los híbridos sexuales (Tabla 25; 26). Existen algunas excepciones, como la familia L25-4 que mostró una segregación de 4:1 al ser cruzada por el cv. Boyero UNNE y 24:1 al ser cruzada por el cv. Argentine. Estos resultados estarían indicando lo contrario a la hipótesis planteada anteriormente, sugiriendo que las distorsiones en la segregación de la apomixis estarían bajo influencia del parental materno. Sin embargo, los mismos sólo pueden ser considerados de manera preliminar y orientativa, debido al reducido y variable número de híbridos evaluados en cada familia, además del hecho que solo fueron evaluados dos padres apomícticos.

Las proporciones de segregación observadas en las familias híbridas obtenidas a partir cruzamiento entre las 11 madres de la PTSS y el cv. Boyero UNNE arrojaron un promedio de 4:1, mientras que el cruzamiento de las mismas madres por cv. Argentine arrojó una

media de 3,5:1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas proporciones, y tampoco con resultados previos en la especie (Martínez et al., 2001, Acuña et al., 2009). Por lo tanto, el uso de cualquiera de estos cultivares apomícticos, en un programa de mejoramiento por hibridación, generaría en términos generales segregaciones similares, más allá de las variaciones detectadas con cada genotipo de la PTSS, los cuales no pueden ser confirmados por el escaso y variable número de híbridos analizados. La realización de nuevos análisis de segregación en el modo de reproducción, en varias progenies compuestas por un mayor número de descendientes, en la cual intervengan diferentes genotipos de la PTSS y varios genotipos apomícticos, permitirá arribar a mejores conclusiones sobre la influencia del genotipo apomíctico o de la combinación parental en las segregaciones esperadas.

Sin embargo, debido al bajo y variable número de híbridos obtenidos en la mayoría de las familias, el análisis de la segregación de la apomixis puede que no sea completamente representativo, por lo que la comparación de estos resultados con aquellos obtenidos en estudios previos en los cuales se trabajó con un número grande de progenies podría verse limitado. A pesar de ello, si bien los análisis fueron limitados, permitieron conocer de manera preliminar el comportamiento de la segregación de la apomixis en progenies generadas a partir del cruzamiento entre varios genotipos de la población tetraploide sintética sexual generada previamente y dos cultivares apomícticos.

### **III.6.2 Expresividad de la apomixis**

El nivel de expresión de la apomixis es un carácter de suma importancia para los programas de mejoramiento orientados a la obtención de híbridos heteróticos altamente apomícticos, ya que la posibilidad de generar recombinantes, por la vía sexual, es considerado indeseable por alterar la pureza genotípica de un cultivar apomíctico. La determinación del nivel de expresión de la apomixis, a través de la observación directa de sacos embrionarios maduros, permitió encontrar grandes variaciones entre los distintos genotipos clasificados como apomícticos según los marcadores ligados al carácter.

Se observó una alta variabilidad en los niveles de expresión de la apomixis, tanto entre hermanos de una misma familia como entre familias de diferente origen parental, tanto femenino como masculino. Una prueba de comparación de medias mediante análisis de la



varianza no paramétrica (Kruskal Wallis al 0,05) no mostró diferencias significativas entre los promedios de los niveles de expresión de las diferentes progenies, obtenidas a través de distintas madres sexuales, ni tampoco de diferentes padres apomícticos; por lo que no tendría sentido seleccionar parentales en base a una mayor expresividad esperada de la apomixis en sus progenies.

La mayoría de las especies apomícticas presentan niveles de expresividad variables de la apomixis (Ozias-Akins, 2007). Las causas de esta variación permanecen sin explicación hasta la fecha. Nogler (1984b) planteó una hipótesis para explicar la expresividad variable de la aposporia en híbridos inter-específicos de *Ranunculus*, a partir de las variaciones en el momento (“timing”) de inducción de la aposporia, siendo los híbridos completamente apomícticos cuando la inducción ocurría antes de iniciada la meiosis femenina, y que el nivel de expresión del carácter sería cada vez menor cuanto mayor sea este retraso. A su vez, establece que el momento de inducción del carácter es un factor meramente cuantitativo cuyas causas de variación se desconocen. Nogler (1984b) reportó una disminución de la expresividad de la aposporia, en sucesivas retrocruzas de híbridos apomícticos por su parental sexual recurrente, atribuyendo este hecho a un retraso acumulativo de la inducción a la aposporia. Si esta hipótesis fuese verdadera, sería un claro obstáculo en los programas de mejoramiento enfocados a la obtención de híbridos heteróticos apomícticos, debido a que una disminución progresiva de la expresividad de la apomixis en progenies segregantes, producto de cruzamientos entre parentales sexuales e híbridos apomícticos de generaciones avanzadas, daría lugar a pérdidas acumulativas de los niveles de expresividad, dando lugar a una disminución en la eficiencia de dichos programas. En un trabajo reciente en *P. notatum*, Acuña et al. (2009) reportó que solo un 10% de los híbridos de primera generación, obtenidos a partir de cruzamientos entre genotipos sexuales experimentales y genotipos apomícticos naturales, presentan altos niveles de expresión de la apomixis. Posteriormente, Acuña et al. (2011) utilizó estos híbridos altamente apomícticos de primera generación, en cruzamientos por genotipos tetraploides sexuales, reportando que solo un 3% de estos híbridos de segunda generación mostraron altos niveles de expresión de la apomixis. En contraposición con esos reportes, los resultados obtenidos en este trabajo no apoyan la hipótesis planteada por Nogler (1984b) y apoyada por los resultados de Acuña et al. (2009; 2011), debido a que no se encontró una expresividad inferior de la apomixis, en las progenies obtenidas por el cultivar híbrido de primera generación Boyero UNNE, con respecto al cultivar Argentine de origen natural. Estudios sobre expresividad de la apomixis, mediante técnicas citoembriológicas, reportaron que el cv. Boyero UNNE presenta una expresividad potencial de la apomixis del 93% (Urbani et al., 2016); mientras que el cv.

Argentine alcanza el 100% (Acuña et al., 2007). Probablemente, sea necesario el uso de híbridos apomícticos facultativos, con distintos niveles de expresión de la apomixis, para poner a prueba la hipótesis planteada por Nogler (1984b).

Los porcentajes de expresividad potencial están conformados por la suma de los porcentajes de óvulos portando sacos embrionarios apospóricos y óvulos portando sacos apospóricos + meióticos. Los primeros solo son capaces de producir embriones de tipo materno o clonal; mientras que los últimos son capaces de generar un embrión, tanto por la vía sexual como apomíctica, o por ambas vías en caso de semillas poliembriónicas. Desde un punto de vista aplicado, es deseable que toda la descendencia, o al menos la mayor parte, sea de origen clonal (Blount y Acuña 2009), es decir derivada de procesos apomícticos, lo que sería más probable seleccionando aquellos individuos con una alta proporción de óvulos portando únicamente sacos embrionarios apospóricos. Sería necesario un análisis de la expresión de la apomixis en estadios más avanzados (semillas o progenie) para conocer qué proporción de esos pistilos mixtos generan descendencia apomíctica o sexual.

Un estudio reciente sobre expresividad de la apomixis, en diferentes estadios del desarrollo reproductivo (óvulos, semillas y progenie), fue realizado en genotipos apomícticos facultativos de *Paspalum malacophyllum* (Hojsgaard et al., 2013). En dicho trabajo se demostró que la expresividad de la apomixis aumenta a través de las sucesivas etapas, llegando al 100% a nivel de progenie, es decir que los individuos mantienen un cierto potencial para la reproducción sexual, pero que finalmente tienden a producir descendencia solo por la vía apomíctica. Resultados similares fueron reportados en genotipos apomícticos naturales de *P. notatum* (Rebozio et al., 2011) y en el cv. híbrido Boyero UNNE (Urbani et al., 2016) utilizado en este estudio. Sin embargo, todos los casos estudiados presentaban niveles de expresividad potencial por encima del 70%, sería necesario un estudio similar para determinar qué ocurre con aquellos individuos de baja expresividad como algunos de los reportados en este trabajo.

En prácticamente todos los híbridos analizados en este estudio se encontró una proporción variable de óvulos con sacos embrionarios abortados incapaces de generar un embrión. La ausencia de sacos desarrollados en los óvulos, en proporciones variables, afecta la capacidad de producción de semillas, por lo tanto no fueron considerados en el cálculo de la expresividad de la apomixis, por lo que si la evaluación de la expresividad de la apomixis se produjera en estadios más avanzados del ciclo reproductivo (semillas o progenie) arrojaría valores superior a los encontrados a nivel de óvulos. Teniendo en cuenta únicamente

aquellos óvulos con sacos desarrollados, con capacidades para generar embriones (semillas), la expresividad promedio de la apomixis sería de 64,5 y 71,4% para las progenies provenientes del cruzamiento entre los 11 genotipos de la PTSS por los cvs. Boyero UNNE y Argentine, respectivamente, en lugar de 59,3 y 64,6%. Esto representa un aumento de alrededor del 5 al 7% nada más; sin embargo, este aumento puede llegar a ser de hasta de un 20% en algunos genotipos, debido a su mayor proporción de sacos abortados. Este escaso aumento en el promedio de expresión se debe a que aquellos híbridos que portan un alto número de sacos abortados o inmaduros son los que muestran un mayor número de sacos embrionarios meióticos y por ende pocos apospóricos (Tabla 27 y 28).

Por último, es probable que la proporción de sacos abortados o inmaduros esté correlacionada negativamente con el porcentaje de semillas logradas por estos híbridos, ya que es esperable que aquellos individuos que presentan una elevada proporción de óvulos con sacos de este tipo, presenten a su vez un elevado número de espiguillas vacías. Sería interesante poner a prueba esta correlación debido a que se podría incluir esta información para la selección de genotipos superiores de alta producción de semillas.

### III.7 CONCLUSIONES

- Los marcadores moleculares ligados a la apomixis demostraron ser efectivos como herramienta para la clasificación reproductiva de progenies híbridas, segregantes para el modo de reproducción, en estadios tempranos del desarrollo vegetativo.
- La segregación del modo de reproducción en cruzamientos de prueba entre varios genotipos tetraploides sintéticos sexuales y dos cultivares apomícticos de *P. notatum* mostró proporciones muy variables entre sexuales vs. apomícticos, pero siempre con proporciones superiores de descendientes sexuales.
- No se pudo confirmar si las variaciones observadas en las proporciones de segregación entre sexuales vs. apomícticos en las diferentes progenies de los cruzamientos de pruebas, fueron debidas a un efecto del parental masculino o la combinación de parentales utilizados.
- La metodología de observación de sacos embrionarios maduros empleada para estimar el potencial de apomixis en *P. notatum*, resultó ser una herramienta útil para clasificar a los híbridos apomícticos según el nivel de expresión de la aposporia.
- La expresividad de la apomixis en los híbridos apomícticos, provenientes de los cruzamientos de prueba entre varios genotipos tetraploides sintéticos sexuales y dos cultivares apomícticos de *P. notatum*, fue muy variable en función del genotipo y su origen genético.
- Una alta proporción de los híbridos apomícticos presentó niveles de expresividad de la apomixis superiores al 80%, por lo que podrán ser evaluados como potenciales cultivares.
- Con los datos obtenidos en esta tesis no se pudo relacionar la expresividad de la apomixis con el parental materno ni el paterno.

- Sería necesaria una evaluación de la expresividad de la apomixis en otras etapas reproductivas (semilla y progenie) para determinar si los niveles de expresividad varían o se mantienen constantes.

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En el presente trabajo se logró generar familias  $F_1$  de *Paspalum notatum* segregantes para el modo de reproducción. Se observó que las proporciones en la segregación entre individuos sexuales vs apomícticos fueron muy variables entre las diferentes familias, en general con marcadas distorsiones a favor de los híbridos sexuales. La obtención de segregaciones muy similares en familias generadas a partir de un mismo padre apomíctico plantea la hipótesis de que el genotipo apomíctico determina las proporciones obtenidas entre híbridos sexuales y apomícticos. Sin embargo, debido a la importancia que tendría este hecho desde el punto de vista aplicado, serían necesarias nuevas evaluaciones, a partir de nuevas combinaciones parentales, pero donde se analice un número más grande de descendientes para poder confirmar el comportamiento observado en esta tesis. Por otro lado, sería interesante evaluar la meiosis del genotipo V14327, que fue el parental masculino que dio lugar a una familia en la cual las proporciones entre sexuales y apomícticos fueron equivalentes, y a su vez evaluar la meiosis de los híbridos apomícticos pertenecientes a esta familia. Existen evidencias que este genotipo apomíctico posee un comportamiento meiótico regular, con presencia de bivalentes, a diferencia del resto de los genotipos tetraploides apomícticos de *P. notatum* que poseen una meiosis irregular y presencia de multivalentes. Dicho comportamiento meiótico podría tener alguna influencia en la segregación de la apomixis.

Algunos de los híbridos sexuales fenotípicamente más diversos fueron inter cruzados y se generó una población tetraploide sintética sexual con una base genética más amplia que la existente previamente. La amplia variabilidad genética presente en la población tetraploide sintética sexual, la cual fue estimada en base a marcadores moleculares de microsatélites y nueve marcadores morfo-agronómicos, demostró que la metodología de transferencia por hibridación de la variabilidad presente en los genotipos tetraploides apomícticos naturales fue efectiva, lográndose incrementar el acervo génico del germoplasma tetraploide sexual de la especie. Este nuevo germoplasma sexual cuenta con nuevas combinaciones génicas aportadas por los parentales apomícticos, lo que le otorga una alta variabilidad genética, uno de los recursos fundamentales para el mejoramiento genético. Esta población sintética servirá de base para los programas de mejoramiento de la especie.

Este nuevo germoplasma sexual fue caracterizado desde el punto de vista de su fertilidad, encontrándose que la misma es muy variable, lo que podría estar relacionado a su alta

variabilidad genética. Los datos de producción de semillas en polinización abierta y autopolinización demostraron que la población se comporta como alógama, aunque con niveles variables de autofertilidad. La presencia de genotipos con niveles altos de autogamia es un inconveniente para su utilización futura en programas de mejoramiento por hibridación ya que será necesario realizar cruzamientos controlados, con previa emasculación de dichos genotipos sexuales usados como parentales femeninos, para evitar autopolinización y el consiguiente análisis posterior para confirmar el origen híbrido de las progenies.

El estudio de la segregación del modo de reproducción fue muy variable en los cruzamientos de prueba entre varios genotipos de la población tetraploide sintética sexual y dos cultivares apomícticos. Las variaciones se produjeron independientemente del padre apomíctico empleado con diferentes madres sexuales, lo que contradice la hipótesis planteada previamente a partir de los resultados de la segregación en el modo de reproducción en familias  $F_1$ s. Sin embargo, debido al escaso y variable número de híbridos evaluados, no es posible comprobar dicha hipótesis.

Los niveles de expresividad de la apomixis encontrados en los híbridos apomícticos de los cruzamientos de prueba fueron muy variables, no encontrándose una relación con los parentales evaluados. La evaluación de la expresividad de la apomixis en otras etapas del ciclo reproductivo (semillas y progenie) nos permitiría conocer si la expresión del carácter se mantiene o aumenta como ha sido demostrado en una especie apomíctica facultativa del mismo género. Debido a la importancia que la expresividad de la apomixis tiene en el mejoramiento de las especies apomícticas, sería de gran interés determinar las causas genéticas que gobiernan dichas variaciones.

Otro de los caracteres de gran importancia, en particular en especies megatérmicas, es la dormancia y características de germinación de las semillas, debido a que es una limitante para su adopción y multiplicación. Esta especie presente variabilidad genética para dichos caracteres, por lo que sería de gran interés su evaluación en la población sintética sexual y su incorporación como criterio de selección en los programas de mejoramiento genético.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, C.A. 2006. Bahiagrass germplasm reproductive characterization, and breeding at the tetraploid level. Tesis para optar al título de Master of Science. University of Florida, USA.
- Acuña, C.A., Blount, A.R., Quesenberry K.H., Hanna, W.W., Kenworthy K.E. 2007. Reproductive Characterization of Bahiagrass Germplasm. *Crop Sci.* 47: 1711–1717.
- Acuña, C.A., Blount, A.R., Quesenberry, K.H., Kenworthy, K.E., Hanna, W.W. 2009. Bahiagrass tetraploid germplasm: reproductive and agronomic characterization of segregating progeny. *Crop Sci.* 49: 581–588.
- Acuña, C.A., Blount, A.R., Quesenberry, K.H., Kenworthy, K.E., Hanna, W.W. 2011. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica* 179: 227–235.
- Arelovich, H.M., Bravo, R.D., Martínez M.F. 2011. Development, characteristics, and trends for beef cattle production in Argentina. *Animal Frontiers* 1: 37-45.
- Asker, S.E., Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 303 pp.
- Balzarini, M.G., Di Rienzo, J.A. 2013. InfoGen versión 2013. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.
- Barreto I.L. 1974. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. In PhD thesis. Rio Grande do Sul Universidade Federal, Porto Alegre. 258 p.
- Baumann, U., Juttner, J., Bian, X., Langridge, P. 2000. Self-incompatibility in the Grasses. *Annals of Botany* 85: 203-209.
- Blount, A.R., Acuña, C.A. 2009. Bahiagrass. In: R.J. Singh, editor, Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series: Forage crops. Vol. 5. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 81–101.
- Borem, A., Condori, M., Miranda, G.V. 2008. Mejoramiento de Plantas. Universidad Federal de Viçosa, MG, Brasil. 438 pp.



- Botstein, D., White, R.L., Scolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Brieger, F. 1930. *Selbststerilität und Kreuzungssterilität im Pflanzreich und Tierreich.* Berlin, 395 pp.
- Brugnoli, E.A., Urbani, M.H., Quarin, C.L., Martínez, E.J., Acuña, C.A. 2013. Diversity in diploid, tetraploid and mixed diploid-tetraploid populations of *Paspalum simplex* Morong. *Crop Sci.* 53: 1509-1516.
- Brugnoli, E.A., Urbani, M.H., Quarin, C.L., Zilli, A.L., Martínez, E.J., Acuña, C.A. 2014. Diversity in Apomictic Populations of *Paspalum simplex* Morong. *Crop Sci.* 54:1656-1664.
- Burton, G.W. 1948. Artificial fog facilitates *Paspalum* emasculation. *J. Amer. Soc. Agron.* 40: 281-282.
- Burton, G.W. 1955. Breeding Pensacola bahiagrass, *Paspalum notatum*: Method of reproduction. *Agron. J.* 47: 311–314.
- Burton, G.W. 1982. Recurrent restricted phenotypic selection increases bahiagrass forage yield. *Crop Sci.* 22: 109-111.
- Burton, G.W. 1992. Manipulating apomixis in *Paspalum*. In J.H. Elgin and J.P. Miksche (ed.) *Proc. Apomixis Workshop, Atlanta, GA. 11–12 Feb. 1992.* ARS Research Bull. 104. USDA ARS, Washington, D.C. p. 16–19.
- Burton, G.W., Forbes, I. Jr. 1960. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé). In C.L. Skidmore et al. (ed.) *Proc. Int. Grassl. Congr. 8th, Reading, England. 11–21 July 1960.* Alden Press, Oxford, UK. p. 66–71.
- Burton, G.W., Forbes, I. Jr., Jackson, J. 1970. Effect of ploidy on fertility and heterosis in Pensacola Bahiagrass. *Crop Sci.* 10: 63-66.
- Burson, B.L. 1987. Pollen germination, pollen tube growth and fertilization following self and interspecific pollination of *Paspalum* species. *Euphytica* 36: 641-650.

- Caceres, M.E., Pupilli, F., Quarin, C.L., Arcioni, S. 1999. Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica* 110: 161–167.
- Canosa, F.R., Iriarte, I., Tonelli, V. 2009. El futuro de la ganadería. *Boletín de la Asociación Argentina de AnGus*. Bs. As. 6 pp.
- Canto-Dorow T.S. 1996. Revisão taxonômica das espécies de *Paspalum* grupo Notata (Poaceae-Paniceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia* 47: 3–44.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biol. J. Linn. Soc.* 61:51–94
- Castro, J.A., Oliveira, E.J., Jesus, O.N., Soares, T.L., Margarido, G.R.A. 2016. Molecular markers for conservation genetic resources of four *Passiflora* species. *Scientia Horticulturae* 212: 251–261.
- Chase, A. 1929. The North American species of *Paspalum*. *Control US Natl. Herb.* 28: 1–310.
- Ching, A., Caldwell, K.S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O.S., Tingey, S., Morgante, M., Rafalski, A. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics* 3: 19.
- Cidade, F.W., Dall’agnol, M., Bered, F., Souza-Chies, T.T. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae). *Genet. Resour. Crop Evol.* 55: 235–246.
- Cidade, F.W., Souza-Chies, T.T., Batista, L.A.R., Dall’Agnol, M., Zucchi, M.I., Jungmann, L., Souza, A.P. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae). *Conserv. Genet.* 10: 1977–1980.
- Cidade, F.W., de Souza-Chies, T.T., Souza, F.H.D., Batista, L.A.R., Dall’Agnol, M., Valls, J.F.M., Zucchi, M.I., Souza, A.P. 2010. Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. *Am. J. Bot.* e107–e110.
- Cidade, F.W., Vigna, B.B.Z., de Souza, F.H.D., Valls, J.F.M., Dall’Agnol, M., Zucchi, M.I., de Souza-Chies, T.T., Souza, A.P. 2013. Genetic variation in polyploid forage grass: assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. *BMC Genet.* 14:50.

- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploidy. *Nature reviews genetics* 6: 836-846.
- Comstock, R.E., Robinson, H.F., Harvey, P.H. 1949. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agron. J.* 41: 360–367.
- Crippa, I. 2015. Evaluación de la diversidad genética disponible en *Cynara cardunculus* L. a fines de optimizar su conservación e inclusión en programas de mejoramiento. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias (FCA-UNR). 216 pp.
- Crowe, L.K. 1971. The polygenic control of outbreeding in *Borago officinalis*. *Heredity* 27: 111-118.
- Darlington, C.D. 1939. The evolution of genetic systems. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Dahmer, N., Schifino-Wittmann, M.T., Dall'Agnol, M., de Castro, B. 2008. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flügge accessions. *Sci. Agric.* 4: 381-388.
- Daurelio, L.D., Espinoza, F., Quarin, C.L., Pessino, S.C., 2004. Genetic diversity in sexualdiploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated insympatry or allopatry. *Plant Syst. Evol.* 244, 189–199.
- De Moraes Fernandes, M.I., Barreto, I.L., Salzano F.M. 1973. Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum notatum*. *Can. J. Genet. Cytol.* 15: 523-531.
- De Oliveira Timbó, A.L., da Costa Souza, P.N., Pereira, R.C., Nunes, J.D., Pereira Pinto, J.E.B., de Souza, F., Sobrinho, L., Chamma, D. 2014. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). *R. Bras. Zootec.* 43: 127-131.
- Devey, F., Fearon, C.H., Haywardt, M.D., Lawrence, M.J. 1994. Self-incompatibility in ryegrass XI. Number and frequency of alleles in a cultivar of *Lolium perenne* L. *Heredity* 73: 262-264.
- Do Valle, C.B., Glienke, C., Leguizamon, G.O.C. 1994. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter* 7: 42–43.
- Doggett, H. 1964. Fertility improvement in autotetraploid sorghum. *Heredity* 19: 403–17.

- Espinoza, F., Daurelio, L.D., Pessino, S.C., Valle, E.M., Quarin C.L. 2006. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Pl. Syst. Evol.* 258: 147–159.
- Fang, D.Q., Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408–417.
- Fearon, C. H., Cornish, M. A., Haywardt, M. D., Lawrence, M. J. 1994. Self-incompatibility in ryegrass X. Number and frequency of alleles in a natural population of *Lolium perenne* L. *Heredity* 73: 254-261.
- Feldkamp, C.R. 2011. Beef production in Argentina: situation and challenges. In: J. O'Rourke, editor, *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Rangeland Congress*, Rosario, Argentina. p. 26–30.
- Ferrari Usandizaga, S.C. 2015. *Sistemas genéticos y diversidad en *Acroceras macrum* Stapf*. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias (FCA-UNR). 181 p.
- Forbes, I. Jr., Burton, G.W. 1961. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids and intraspecific hybrids of Bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Sci.* 1: 402-406.
- García, M.V., Balatti, P.A., Arturi, M.J. 2007. Genetic variability in natural populations of *Paspalum dilatatum* Poir. analyzed by means of morphological traits and molecular markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54: 935–946.
- Gates, R.N., Quarin, C.L., Pedreira, C.G.S. 2004. Bahiagrass. In: L.E. Moser, et al., editors, *Warm-season (C4) grasses*. Agron. Monogr. 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 651–680.
- Gobbe, J., Longly, B., Louant, B.P. 1983. Apomixie, sexualité et amélioration des graminées tropicales. *Tropicultura* 1: 5–9.
- Gornall, R.J. 1999. Population genetic structure in agamosperous plants. In: Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ, eds. *Molecular systematic and plant evolution*. London: Taylor & Francis, p. 118–138.
- Gould, F.W. 1966. Chromosome numbers of some Mexican grasses. *Can J. Bot.* 44: 1683-1696.

- Guerra Araujo, A.C., Nóbrega, J.M., Pozzobon, M.T., Tavares de Campos Carneiro, V. 2005. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Euphytica* 144: 39–50
- Gutierrez-Ozuna, R., Eguiarte, L.E., Molina-Freaner, F. 2009. Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare* L. Link) in north-western Mexico. *J Arid Environ.* 73: 26–32
- Hanna, W.W., Bashaw, E.C. 1987. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Sci.* 27: 1136–1139.
- Hanna, W.W. 1995. Use of apomixis in cultivar development. *Adv. Agron.* 54: 333–350.
- Hayman, D.L. 1956. The genetical control of incompatibility in *Phalaris coerulescens* Desf. *Aust. J. Biol. Sci.* 9: 321-331.
- Hayman, D.L. 1992. The S Z incompatibility system. In: Chapman GP, ed. *Grass evolution and domestication*. Cambridge: Cambridge University Press, 117-137.
- Hörandl, E. 2010. The evolution of self-fertility in apomictic plants. *Sex. Plant Reprod.* 23: 73-86.
- Hörandl, E. 2006. The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytologist* 171: 525-538.
- Hörandl, E., Hojsgaard, D. 2012. The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems* 146: 681-693.
- Hörandl, E., Paun, O. 2007. Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. In E. Hörandl, U. Grossniklaus, P.J. van Dijk, and T.F. Sharbel (ed.) *Apomixis: Evolutions, mechanisms and perspectives*, A.R.G. Gantner Verlag, Rugell, Liechtenstein. p. 170–194.
- Hojsgaard, D.H., Martínez, E.J., Quarin, C.L. 2013. Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytol.* 197, 336–347.
- Hull, F.H. 1945. Recurrent selection for specific combining ability in corn. *J. Am. Soc. Agron.* 37: 134–145.

- Interrante, S.M., Sollenberger, L.E., Blount, A.R., Coleman, S.W., White, U.R., Liu, K. 2009. Defoliation management of bahiagrass germplasm affects cover and persistence-related responses. *Agronomy Journal* 101: 1381-1387.
- Jank, L., Valle, C.B., Resende, R.M.S. 2011. Breeding tropical forages. *Crop Breed. Appl. Biot.* S1: 27-34.
- Jank, L., Barrios, S.C., do Valle, C.B., Simeão, R.M., Alves, G.F. 2014. The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop Pasture Sci.* 65: 1132–1137.
- Jauhar, P.P. 1970. Chromosome behavior and fertility of the raw and evolved synthetic tetraploids of pearl millet *Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb. *Genetica* 41: 407–24
- Jean, Shiuan-Yuh, Juang, Tzo-Chuan. 1979. Effect of bahiagrass mulching and covering on soil physical properties and losses of water and soil of slopland (First report). *J. Agric. Assoc. China (Taipei)*. 105: 57-66.
- Jessup, R.W. 2005. Molecular tools for marker-assisted breeding of buffelgrass. Ph.D. Thesis. Texas A&M University, College Station, TX. 75 pp.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Brettschneider, R., Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular breeding*, 3(5), 381-390.
- Karlin, S., Brocchieri, L., Bergman, A., Mrazek, J., Gentles, A.J. 2002. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 333-8.
- Killinger, G.B., Ritchey, G.E., Blinckensderfer, C.B., Jackson W. 1951. Argentine Bahia grass. *Circ. S31. Fla. Agric. Exp. Stn., Gainesville*.
- Kosman, E., Leonard, K.J. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol. Ecol.* 14: 415–424.
- Knox, R.B. 1967. Apomixis: seasonal and population differences in a grass. *Science* 157: 325-326.

- Lindblad-Toh, K., Tanenbaum, D.M., Daly, M.J., Winchester, E., Lui, W.O., Villapakkam, A., Stanton, S.E., Larsson, C., Hudson, T.J., Johnson, B.E., Lander, E.S., Meyerson, M. 2000. Loss of heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nature Biotechnology* 18: 1001-1005.
- Litt, M., Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 398-401.
- Lundqvist, A. 1956. Self-incompatibility in Rye I. Genetic control in diploids. *Hereditas* 42: 293-348.
- Lundqvist, A. 1957. Self-incompatibility in Rye II. Genetic control in tetraploids. *Hereditas* 43: 467-511.
- Lundqvist, A. 1958. Self-incompatibility in Rye IV. Factors related to self seeding. *Hereditas* 44: 193-256.
- Lutts, S., Ndikumana, J., Louant, B.P. 1994. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. *Euphytica* 78: 19-25.
- Martínez, E.J., Urbani, M.H., Quarín, C.L., Ortiz, J.P.A. 2001. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19–25.
- Martínez, E.J., Urbani M.H., Quarín C.L., Ortiz J.P. 2001. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135:19–25.
- Martínez, E.J., Hopp, H.E., Stein, J., Ortiz, J.P.A., Quarín, C.L. 2003. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Mol. Breed.* 12: 319–327.
- Martínez, E.J., Acuña, C.A., Hojsgaard, D.H., Tcach, M.A., Quarín, C.L. 2007. Segregation for asexual seed production in *Paspalum* achieved by male gametes of apomictic triploid plants. *Ann. Bot.* 100: 1239–1247.
- Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J.* 21:97–108.

- Miles, J.W. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Sci.* 47: 238–249.
- Miles, J.W., Valle, C.B. do. 1996. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In J.W. Miles et al. (ed.) *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. CIAT, Cali, Colombia, and CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brazil. p. 164–177.
- Miles, J.W., Escandón, M.L. 1997. Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. *Can. J. Plant Sci.* 77: 105–107.
- Miles, J.W., Valle, C.B. do, Rao, I.M., Euclides, V.P.B. 2004. Brachiariagrasses.. In L.E. Moser et al. (ed.) *Warm-season (C4) grasses*. Agron. Monogr. 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 745–783.
- Miles, J.W., Cardona, C., Sotelo, G. 2006. Recurrent selection in a synthetic Brachiariagrass population improves resistance to three spittlebug species. *Crop Sci.* 46: 1088–1093.
- Mills, P.F.L., Boultonwood, J.N. 1978. A comparison of *Paspalum notatum* accessions for yield and palatability. *Zimbabwe Agric. J.* 75: 71-74.
- Moreno, S., Martin, J.P., Ortiz, J.M. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101: 117-125.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175–182.
- Morrone, O., et al., (10 authors), 2012. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics* 28: 333–356.
- Moser, L.E., Burson, B.L., Sollenberger L.E. 2004. Warm-season (C<sub>4</sub>) grass overview. In: L.E. Moser, et al., editors, *Warm-season (C4) grasses*. Agron. Monogr. 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 1-14.
- Ndikumana, J. 1985. Etude de l'hybridation entre espèce apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria*. Ph.D. Dissertation. Université Catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, Belgium.



- Newman, Y., Vendramini, Y., Blount, A. 2010. Bahiagrass (*Paspalum notatum*): Overview and management. Series of Agronomy Department SS-AGR-332. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Extension. Gainesville, Florida, USA.
- Ngendahayo, M., Coppens D'eckenbrugge, G., Louant, B.P. 1988. Self-incompatibility studies en *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard, *Brachiaria decumbens* Stapf and *Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf and their interspecific hybrids. *Phytomorphology* 38: 47-51.
- Nogler, G.A. 1984a. Gametophytic apomixis. In *Embryology of Angiosperms*, ed. BM Johri, pp. 475–518. Berlin: Springer.
- Nogler, G.A. 1984b. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94: 411-422.
- Ortiz, J.P.A., Pessino, S.C., Leblanc, O., Hayward, M.D., Quarin, C.L. 1997. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor. Appl. Genet.* 95: 850–856.
- Ortiz, J.P.A., Quarin C.L., Pessino S.C., Acuña C.A., Martínez E.J., Espinoza F., Hojsgaard D.H., Sartor M.E., Cáceres M.E., Pupilli F. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: What we have learnt from *Paspalum*. *Ann. Bot.* 112: 767–787.
- Ozias-Akins, P., van Dijk, P.J. 2007. Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu. Rev. Genet.* 41:509–37.
- Parihar, S.S., Pathak, P.S. 2006. Flowering phenology and seed biology of selected tropical perennial grasses. *Tropical Ecology* 47: 81-87.
- Paun, O., Greilhuber J., Temsch E., Hörandl E. 2006. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). *Mol. Ecol.* 15:897–910.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pernès, J., René-Chaume, R., René, J., Savidan, Y. 1975. Schéma d'amélioration génétique des complexes agamiques du type *Panicum*. *Cahiers O.R.S.T.O.M. Ser. Biol.* 10: 67–75.

- Phan N.T., Min-Kyung K., Sung-Chur S. 2016. Genetic variations of F1 tomato cultivars revealed by a core set of SSR and InDel markers. *Scientia Horticulturae* 212: 155-161.
- Pinheiro, A.A., Pozzobon, M.T., Valle, C.B. do, Penteado, M.I.O., Carneiro V.T.C. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Reports* 19: 274-278.
- Podio, M., Siena, L.A. Hojsgaard, D., Stein, J., Quarin, C.L., Ortiz, J.P.A. 2012. Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 298: 1625–1633.
- Pozzobon, M.T., Valls, J.F.M. 1997. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Braz. J. Genet.* 20: 29–34.
- Pupilli, F., Martínez, E.J., Busti, A., Calderini, O., Quarin, C.L., Arcioni, S. 2004. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol. Genet. Genomics* 270: 539–548.
- Qu, J., Huang, C., Zhang, J. 2016. Genome-wide functional analysis of SSR for an edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Gene* 575: 524-530.
- Quarin, C.L. 1986. Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromyorrhizon*. *Euphytica* 35: 515-522
- Quarin, C.L. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Quarin, C.L., Burson, B.L. Burton, G.W. 1984. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Bot. Gaz.* 145: 420–426.
- Quarin, C.L., Norrmann, G.A., Urbani, M.U. 1989. Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsletter* 1: 28–29.
- Quarin, C.L., Espinoza, F., Martínez, E.J., Pessino, S.C., Bovo, O.A. 2001. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex. Plant Reprod.* 13: 243-249.

- Quarin, C.L., Urbani, M.H., Blount, A.R. Martinez, E.J., Hack, C.M., Burton, G.W., Quesenberry, K.H. 2003. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Sci.* 43: 745–746.
- Quesenberry, K.H., Dampier, J.M., Lee, Y.Y., Smith, R.L., Acuña, C.A. 2010. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica* 175: 43-50.
- Quiroga, R.E. 2011. Variación morfológica en once poblaciones del pasto nativo *Trichloris crinita*. *Rev. Argent. Prod. Anim.* 31: 539.
- Randolph, L.F. 1935. Cytogenetics of tetraploid maize. *J. Agric. Res.* 50: 591–605.
- Randolph, L.F, Fischer, H.E. 1939. The occurrence of pathenogenetic diploids in tetraploid maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25: 161–64
- Rearte, D.H. 2010. Situación actual y prospectiva de la producción de carne vacuna. II Programa Nacional de Carnes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina.
- Rebozzio, R.N., Sartor, M.E., Quarin, C.L. Espinoza, F. 2011. Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. *Biologia plantarum* 55: 391-395.
- Rebozio, R.N., Rodríguez, M.P., Stein, J., Ortiz, J.P.A., Quarin, C.L., Espinoza, F. 2012. Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. *Mol. Breed.* 29: 189-198.
- Reyno, R., Narancio, R., Speranza, P., Do Canto, J., López Carro, B., Hernández, P., Burgueño, J., Real, D., Dalla Rizza, M. 2012. Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) native to Uruguay. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59: 1823–1832.
- Richards, A.J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358: 1085–1093.
- Rios, E., Blount, A., Harmon, P., Mackowiak, C., Kenworthy, K., Quesenberry, K. 2015. Ergot resistant tetraploid bahiagrass and fungicide effects on seed yield and quality. *Plant Health Progress* 2: 16: 56-62.

- Rommel, M. 1961. Aneuploidy, seed set and sterility in artificially induced autotetraploid *Hordeum vulgare* L. *Can. J. Genet. Cytol.* 3:272–82
- Sartor, M.E., Quarin, C.L., Espinoza, F. 2009. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Sci.* 49: 1270-1276.
- Sartor, M.E., Rebozzio, R.N., Quarin, C.L., Espinoza, F. 2013. Patterns of genetic diversity in natural populations of *Paspalum* agamic complexes. *Plant Syst. Evol.* 299: 1295–1306.
- Savidan, Y.H. 1975. Hérité de l'apomixie. Contribution à l'étude de l'hérité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analyse dessacs embryonnaires). *Cahiers O.R.S.T.O.M. Ser. Biol.* 10:91–95.
- Savidan, Y.H. 1983. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). p. 182–184. In J.A. Smith and V.W. Hays (ed.) *Proc. Intl. Grassl. Congr., 14th, Lexington, KY. 15–24 June 1981.* Westview Press, Boulder, CO.
- Savidan, Y.H. 1981. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). p. 182-184.
- Savidan, Y.H., Jank, L., Costa, J.C.G., do Valle, C.B. 1989. Breeding *Panicum maximum* in Brazil: Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. *Euphytica* 41: 107–112.
- Savidan, Y.H. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. *Plant Breed. Rev.* 18: 13-86.
- Scott, J.M. 1920. Bahiagrass. *J. Am. Soc. Agron.* 12: 112-113.
- Senior, M.L., Heun, M. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the target repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884–889.
- Senior, M.L., Chin, E.C.L., Lee, M., Smith, J.S.C., Stuber, C.W. 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GENE BANK database: Map construction. *Crop Sci.* 36: 1676–1683.
- Shattuck-Eidens, D.M., Bell, R.N., Neuhausen, S., Helentjaris, T. 1990. DNA sequence variation within maize and melon: Observations from polymerase chain reaction and direct sequencing. *Genetics* 126: 207–217.
- Sherwood, R.T., Berg, C.C., Young, B.A. 1994. Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Sci.* 34: 1490–1494.

- Siena, L.A., Sartor, M.E., Espinoza, F., Quarin, C.L., Ortiz, J.P.A. 2008. Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sex. Plant Reprod.* 21: 205-215.
- Stebbins, G.L. 1950. Variation and evolution in plants. New York: Columbia Univ Press.
- Stein, J., Quarin C.L., Martínez E.J., Pessino S.C., Ortiz J.P.A. 2004. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor. Appl. Genet.* 109:186–191.
- Stein, J., Pessino, S.C., Martínez, E.J., Rodriguez, M.P., Siena, L.A., Quarin, C.L., Ortiz, J.P.A. 2007. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol. Breed.* 20: 153–166.
- Stout, A. B. 1938. The genetics of incompatibilities in homomorphic flowering plants. *Bot. Rev.* 4: 275-359.
- Swenne, A., Louant, B.P., Dujardin, M. 1981. Induction par la colchicine de formes autotétraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). *Agron. Trop.* 36: 134–141.
- Thaikua, S., Ebina, M., Kouki, K., Inafuku, M., Akamine, H., Shimoda, K., Suenaga, K., Kawamoto, Y. 2014. Preliminary evaluation on digestibility and the relation to morphology and water content of *Brachiaria* spp. and their heritability. *Grassland Science* 61: 92–100.
- Tischler, C.R., Burson, B.L. 1995. Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicular wax content. *Euphytica* 84: 229–235
- Toutz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463–6471.
- Trang, Q.S., Wricke, G., Weber, W.E. 1982. Number of alleles at the incompatibility loci in *Secale cereale* L. *Theor. Appl. Genet.* 63: 245-248.
- Urbani, M.H., Acuña, C.A., Doval, D.W., Sartor, M.E., Galdeano, F., Blount, A.R., Quesenberry, K.H., Mackowiak, C.L., Quarin C.L. 2016. Registration of 'Boyero UNNE' Bahiagrass. *J. Plant Regist.* doi:10.3198/jpr2016.04.0021crc.

- Vázquez, P., Rojas, M.C., Burges, J.C. 2007. Caracterización de la ganadería bovina en la Cuenca del Río Salado. *Revista Argentina de Producción Animal* 27 Supl. 1: 295-296.
- Vázquez Platero, R. 2010. Lineamientos estratégicos para la cadena de ganados y carnes de la republica argentina. ABC Consorcio de Exportadores de Carnes Argentinas. 33 pp.
- Vogel, K.P., Burson, B.L. 2004. Breeding and genetics. In L.E. Moser et al. (ed.) Warm-season (C4) grasses. *Agron. Monogr.* 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 51–94.
- Vos, P.R., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M. van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Weimarck, A. 1973. Cytogenetic behaviour in octoploid Triticale. I. Meiosis, aneuploidy and fertility. *Hereditas* 74: 103–18
- Williams, E.G., Webb, M.C. 1987. Enclosure of pollinated flowers weakens the gametophytic self-incompatibility response in *Lycopersicon peruvianum*. *J. Exp. Bot.* 38: 1756-1764.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, D.L., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6536.
- Wilkins, P.W., Thorogood, D. 1992. Breakdown of self-incompatibility in perennial ryegrass at high temperature and its uses in breeding. *Euphytica* 64: 65-69.
- Worthington, M., Heffelfinger, C., Bernal, D., Quintero, C., Zapata, Y.P., Perez, J.G., De Vega, J., Miles, J., Dellaporta, S., Tohme, J. 2016. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics* 203: 1117–1132.
- Young, B.A., Sherwood, R.T., Bashaw, E.C. 1979. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Can. J. Bot.* 57: 1668–1672.
- Zilli, A.L., Brugnoli, E.A., Marcón, F., Billa, M.B., Rios, E.F., Martínez, E.J., Acuña, C.A. 2015. Heterosis and Expressivity of Apospory in Tetraploid Bahiagrass Hybrids. *Crop Sci.* 55: 1189–1201.

Zuloaga, F.O., Morrone, O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 102: 1–297.

## ANEXO

**Tabla I.** Número total de pistilos diafanizados (PT), número de pistilos portando sacos meióticos (SM), sacos meióticos más apospóricos (SM+SA), sacos apospóricos (SA), sacos inmaduros (Si) y sacos abortados (Sa) en los diferentes híbridos F<sub>1</sub> evaluados por la técnica citoembriológica.

	<b>PT</b>	<b>SM</b>	<b>SM+SA</b>	<b>SA</b>	<b>Si</b>	<b>Sa</b>
<b>A 4</b>	31	30			1	
<b>A 12</b>	23	22			1	
<b>A 14</b>	29	29				
<b>A 15</b>	26	22			3	1
<b>A 19</b>	29	20			3	6
<b>A 36</b>	26	23			2	1
<b>A 41</b>	28	21			4	3
<b>B 2</b>	28	1	6	20	1	
<b>B 3</b>	29	11	15	3		
<b>B 6</b>	28	26			2	
<b>B 16</b>	28	26			1	1
<b>B 30</b>	27	26			1	
<b>B 37</b>	29	3	2	23		1
<b>C 2</b>	25	24			1	
<b>C 19</b>	25	24				1
<b>C 22</b>	22	19			3	
<b>C 29</b>	25	19			6	
<b>C 34</b>	31	24			3	4
<b>C 43</b>	27	24			3	
<b>C 44</b>	26	22			3	1
<b>D 2</b>	31	30			1	
<b>D 6</b>	28	5	6	16		1
<b>D 21</b>	22	21			1	
<b>D 25</b>	26	7	10	8		1
<b>D 27</b>	28	28				
<b>D 31</b>	30	29			1	
<b>D 34</b>	29	23			6	
<b>E 1</b>	23	5	4	14		
<b>E 7</b>	28		4	23		1
<b>E 17</b>	28	23			2	3
<b>E 19</b>	29	12	16	1		
<b>E 31</b>	24	4			4	16
<b>E 42</b>	25	16			8	1
<b>E 47</b>	24	13			4	7
<b>F 9</b>	23	3	6	14		
<b>F 19</b>	22	20				2



<b>F 22</b>	27		2	23	2	
<b>F 23</b>	25	12	8	2	2	1
<b>F 29</b>	24	21			3	
<b>F 45</b>	26	21			5	
<b>F 47</b>	28	27				1
<b>G 3</b>	26	7	3	11	2	3
<b>G 37</b>	28	17			4	7
<b>G 39</b>	33	24	2		5	2
<b>G 40</b>	33	24			6	3
<b>G 42</b>	26	15			6	5
<b>G 47</b>	26	16			8	2
<b>G 48</b>	27	19			6	2
<b>H 7</b>	29		8	19	2	
<b>H 8</b>	31	30			1	
<b>H 21</b>	29	27			2	
<b>H 24</b>	30	26			4	
<b>H 32</b>	22	19			3	
<b>H 34</b>	30	26			4	
<b>H 37</b>	27	1	5	21		
<b>I 2</b>	29	20			5	4
<b>I 4</b>	31	26			5	
<b>I 12</b>	30	26			3	1
<b>I 25</b>	26	18			5	3
<b>I 42</b>	23	13			5	5
<b>I 44</b>	24	18			3	3
<b>I 48</b>	26	15			2	9
<b>J 7</b>	23		12	11		
<b>J 16</b>	28	5	8	12	2	1
<b>J 21</b>	26	1	15	10		
<b>J 23</b>	25	1	10	13	1	
<b>J 28</b>	29	22			2	5
<b>J 29</b>	30	20			9	1
<b>J 30</b>	28	23			4	1
<b>K 2</b>	24	19			3	2
<b>K 3</b>	23	21			2	
<b>K 7</b>	24	19			1	4
<b>K 8</b>	29	18			7	4
<b>K 19</b>	27	21			3	3
<b>K 20</b>	21	13			6	2
<b>K 36</b>	28	21			6	1
<b>L 2</b>	31	6			5	20
<b>L 9</b>	32	23				9
<b>L 15</b>	28	23			1	4
<b>L 28</b>	27	21			2	4

<b>L 30</b>	29	17	1	11
<b>L 32</b>	29	15		14
<b>L34</b>	27	17	6	4

**Tabla II.** Intercruzamientos realizados entre genotipos F<sub>1</sub>s sexuales de las diferentes familias híbridas de *P. notatum*. Número total de espiguillas polinizadas, número de semillas y porcentaje de semillas para los diferentes genotipos F<sub>1</sub> sexuales intercruzados.

<b>Genotipo F<sub>1</sub> sexual</b>	<b>Espiguillas polinizadas</b>	<b>N° de semillas</b>	<b>% de semillas</b>
A 24	67	41	70
A 32	247	128	56
A 35	88	53	57
A 41	269	130	64
C 6	314	169	57
C 29	314	169	42
C 46	88	53	47
E 8	142	68	40
E 13	275	98	48
E 41	315	228	23
F 13	354	192	80
F 47	335	181	55
G 11	164	125	25
G 19	121	88	42
G 24	372	210	55
H 11	110	89	81
H 12	285	213	74
H 21	372	210	57
H 29	133	58	44
I 29	112	53	5
I 48	128	84	22
J 10	395	302	51
J 13	183	139	60
J 18	189	71	61
J 42	133	58	35
K 19	143	78	32
L 5	370	168	78
L 25	276	154	46
L 45	348	192	51

**Tabla III.** Prueba de homogeneidad de las varianzas para cada variable entre grupos de genotipos.

<b>Variable</b>	<b>Grupo(1)</b>	<b>Grupo(2)</b>	<b>n(1)</b>	<b>n(2)</b>	<b>Var(1)</b>	<b>Var(2)</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Altura</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	114,12	371,36	0,31	0,09
<b>Altura</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	408	114,12	112,21	1,02	0,89
<b>Altura</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	408	371,36	112,21	3,31	0,02
<b>Diámetro</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	34,93	67,69	0,52	0,33
<b>Diámetro</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	408	34,93	45,45	0,77	0,28
<b>Diámetro</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	408	67,69	45,45	1,49	0,32
<b>L.Hoja</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	39,88	69,82	0,57	0,41
<b>L.Hoja</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	408	39,88	55,69	0,72	0,17
<b>L.Hoja</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	408	69,82	55,69	1,25	0,53
<b>A.Hoja</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	1,65	1,38	1,2	0,84
<b>A.Hoja</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	408	1,65	1,47	1,12	0,61
<b>A.Hoja</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	408	1,38	1,47	0,94	0,77
<b>A.E.F.</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	93,74	295,17	0,32	0,09
<b>A.E.F.</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	367	93,74	137,32	0,68	0,12
<b>A.E.F.</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	367	295,17	137,32	2,15	0,06
<b>L.Racimo</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	7,73	5,3	1,46	0,60
<b>L.Racimo</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	371	7,73	4,45	1,74	0,02
<b>L.Racimo</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	371	5,3	4,45	1,19	0,61
<b>MS</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	16419,75	23215,46	0,71	0,63
<b>MS</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	410	16419,75	17598,67	0,93	0,74
<b>MS</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	410	23215,46	17598,67	1,32	0,46
<b>Tol. frío</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	0,53	0,61	0,87	0,90
<b>Tol. frío</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	411	0,53	1,37	0,39	0,02
<b>Tol. frío</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	411	0,61	1,37	0,45	0,05
<b>Rebr. inv.</b>	{GTAN}	{GTSE}	30	9	0,94	1,03	0,91	0,96
<b>Rebr. inv.</b>	{GTAN}	{PTSS}	30	408	0,94	1,12	0,84	0,46
<b>Rebr. inv.</b>	{GTSE}	{PTSS}	9	408	1,03	1,12	0,92	0,74

**Tabla IV.** Media y desvío estándar (D.E.) para las distintas variables morfo-agronómicas evaluadas sobre la PTSS, los GTSE y GTAN. **Altura:** altura de planta; **Diám.:** diámetro de planta; **L.Hoja:** largo de hoja; **A.Hoja:** ancho de hoja; **A.E.F.:** altura del eje floral; **L.Rac.:** longitud del racimo; **MS:** producción de materia seca; **Tol. frío:** tolerancia al frío; **Rebr. Inv.:** rebrote invernal.

Planta		Altura	Diám.	L.Hoja	A.Hoja a	A.E.F.	L.Rac.	MS	Tol. frío	Rebr. inv.
A24#1	Media	40,67	20,83	31,5	9	52	11,5	122,37	2,67	3
	D.E.	6,66	2,84	6,54	0,87	0	2,12	16,87	0,58	0
A24#3	Media	47	26,33	36,67	8,67	58,33	14,33	192,61	3	3,33
	D.E.	7,55	3,25	6,37	0,76	3,79	1,04	54,48	0	0,58
A24#4	Media	31,67	18,67	32,17	7,67	45,83	9,83	40,71	2,33	2
	D.E.	3,06	3,01	2,02	0,29	1,76	0,76	12,19	0,58	0
A24#7	Media	47,5	18,5	37,75	8,5	74,75	13,5	112,91	2,67	2,67
	D.E.	3,54	1,41	1,77	0,71	1,77	0,71	86,96	0,58	0,58
A24#9	Media	42,33	19,67	31,5	7,33	50,75	13	109,45	3	3
	D.E.	4,62	4,31	1,8	0,76	1,77	1,41	29,81	0	0
A32#1	Media	42,67	23	36,83	8,83	63,5	13,5	157,78	2,33	3,33
	D.E.	11,59	9,64	6,37	0,29	5,66	0,71	33,04	0,58	0,58
A32#11	Media	41,33	31,67	31,67	8,83	64,5	12,33	209,21	3	2,67
	D.E.	10,02	3,33	5,8	0,58	3,91	1,04	110,3	1	0,58
A32#2	Media	37,67	15,5	28,5	7,17	54,75	10,5	100,19	2,33	1,67
	D.E.	18,01	9,17	12,38	1,04	6,72	0	91,81	1,15	0,58
A32#4	Media	52	25,33	32,17	9,5	57,17	12,83	169,64	2	2
	D.E.	4,36	12,29	1,76	0,5	3,69	0,29	42,15	1	0
A32#6	Media	42,67	22,33	33	10,33	61,25	13,75	171,82	2,67	2,33
	D.E.	4,04	2,25	4,5	0,58	3,18	0,35	24,82	0,58	0,58
A35#11	Media	52	18,67	35	9	70	15,5	139,67	2,33	2,67
	D.E.	13	9,31	7,37	1	0	0	71,21	1,53	1,15
A35#4	Media	49,33	26	35,5	8	63,17	12,83	206,23	2	2,67
	D.E.	6,66	3,12	8,35	1	7,29	0,76	97,03	1	0,58
A35#5	Media	40,67	25,67	29,33	10	50,5	12	138,03	2,33	2,33
	D.E.	5,13	5,39	5,11	0,87	6,76	1,32	103	1,15	1,15
A35#7	Media	37,33	29,67	26,67	8,83	55,33	13,17	211,01	3,33	3
	D.E.	6,81	5,92	5,8	0,76	2,25	0,76	65,99	0,58	0
A35#9	Media	37,5	11,75	25,5	8,25	sd	sd	28,29	1,33	1,33
	D.E.	3,54	5,3	0	1,77	sd	sd	16,81	0,58	0,58
A41#1	Media	44	18,5	29,17	8,33	61,75	14,25	164,76	3	3
	D.E.	18,19	10,11	11,15	2,93	20,86	1,77	136,47	1,73	1,73
A41#3	Media	39	28,67	23,17	8,17	52	10,5	141,96	3,33	3
	D.E.	8,54	2,75	2,25	1,15	8,85	0,5	55,96	0,58	0
A41#4	Media	51,5	24,5	33	9,75	68,25	16	203,4	3	3
	D.E.	19,09	0,71	1,41	0,35	10,96	1,41	173,15	2	1,73
A41#6	Media	49,33	25,33	32,33	9,5	68,33	13,5	217,2	3,33	3,67

	D.E.	11,02	0,76	9,29	0,5	4,37	0,87	34,5	0,58	0,58
<b>A41#8</b>	Media	49,33	21,17	36	8,67	49,17	10,83	241,08	3,67	3,67
	D.E.	10,07	2,75	3,28	0,76	8,75	1,26	54,98	0,58	0,58
<b>B229</b>	Media	31,67	35,5	26,33	8,83	61,33	12,67	84,61	2,33	2
	D.E.	9,5	8,66	6,25	0,29	3,88	1,15	60,19	0,58	0
<b>C29#10</b>	Media	43,33	25,67	25,5	8	57,67	13,5	195,7	3,33	3,33
	D.E.	5,77	2,02	4,77	1	6,33	1,32	124,4	1,15	1,15
<b>C29#3</b>	Media	36	29,5	22,83	7,5	55	12,33	120,33	2,33	2
	D.E.	2	2,65	3,18	0,87	2,65	1,04	81,5	1,53	1
<b>C29#5</b>	Media	47,67	25,17	31,33	6,17	58,17	11,33	169,1	2,67	2,67
	D.E.	2,52	9,29	3,51	1,26	7,37	1,44	124,33	2,08	1,15
<b>C29#6</b>	Media	34,67	32,33	26,67	8	59,5	12,5	114,76	2	2
	D.E.	5,51	5,25	1,61	0,87	2,6	0,87	28,98	1	1
<b>C29#9</b>	Media	39	23,5	30,67	7,5	56,17	14,17	191,39	3	3
	D.E.	7,21	4,09	8,46	0,5	5,69	1,76	113	1	1
<b>C4#4X</b>	Media	19,33	15,5	19,5	6	29,33	10,17	10,45	1,33	1,33
	D.E.	7,37	3,91	1,32	0	2,08	2,47	9,45	0,58	0,58
<b>C46#1</b>	Media	50	27	32,5	8	62,83	14	262,45	2,33	3
	D.E.	13,75	1,32	2,18	0	12,27	1,5	128,46	1,15	1,73
<b>C46#2</b>	Media	40,67	25	24,33	7,83	50,33	12,67	119,32	2	2,33
	D.E.	9,02	5,07	1,04	0,29	3,01	0,29	82,87	1	1,15
<b>C46#4</b>	Media	36	27,17	27,83	10,17	58,5	15,25	146,55	2	2,33
	D.E.	6,08	9,83	3,79	0,58	7,07	1,06	154,13	1	1,53
<b>C46#5</b>	Media	27	9,17	22,5	8,5	sd	sd	15,07	1	1
	D.E.	6,56	3,33	0,87	1	sd	sd	1,58	0	0
<b>C46#7</b>	Media	54	19,83	31,5	9,5	70,75	15,75	224,71	3	3
	D.E.	10,39	8,1	4,92	1	2,47	0,35	133,43	1	1
<b>C6#1</b>	Media	50	21,5	33,67	9,17	61,67	13,5	258,87	3,33	4
	D.E.	4,58	2,29	4,54	1,04	5,75	0,5	161,04	1,53	1
<b>C6#2</b>	Media	51,67	20,17	36,5	10,33	54	15	241,92	3,67	3,67
	D.E.	6,66	7,85	4,44	1,53	9,9	0	153,13	1,15	0,58
<b>C6#7</b>	Media	52,67	15	32,5	7,17	52,5	10,5	183,09	4	3,67
	D.E.	9,45	1,5	8,54	0,29	2,83	0,71	146,44	1	1,15
<b>C6#8</b>	Media	38,33	17	25,33	10	63	13	120,02	2,67	2,67
	D.E.	19,35	10,33	3,79	0	2,12	0,71	138,93	1,15	1,15
<b>C6#9</b>	Media	51,67	20,83	35,67	9,17	60,17	14	164,73	2,33	3
	D.E.	5,77	6,66	13,7	1,04	6,9	0,87	112,26	1,15	1
<b>CyA1556</b>	Media	42	36,83	35,5	10	66,83	15,17	317,48	2,67	4
	D.E.	7,21	5,51	3,5	0	9,93	1,04	152,6	0,58	0
<b>E13#10</b>	Media	36,33	15,67	28,67	9,33	60	12	205,46	4	3
	D.E.	9,02	3,51	6,29	0,76	0	0	77,06	1,73	1
<b>E13#2</b>	Media	42	23,5	28	8,25	67	12,5	104,98	1,5	2
	D.E.	21,21	3,54	8,49	1,06	0	0	51,71	0,71	0
<b>E13#3</b>	Media	55,67	25,17	38	9	71,67	13,33	299,93	3	3,33

	D.E.	9,29	6,21	2,78	0,87	11,02	0,29	151,04	2	0,58
<b>E13#4</b>	Media	43,33	24	34,5	8,33	63,17	13,17	243,54	3,33	3,33
	D.E.	14,64	9,64	9,12	0,76	21,1	2,75	138,74	2,08	1,15
<b>E13#7</b>	Media	51	22,83	28,17	8,67	65,17	12,67	217,37	3,67	3,33
	D.E.	8,54	2,02	4,25	0,29	5,92	0,76	141,62	2,31	1,15
<b>E41#10</b>	Media	38,67	17,5	31,5	10	40,83	10,33	149,46	2,67	2
	D.E.	5,69	2	6,5	1	5,75	0,58	88,34	0,58	1
<b>E41#11</b>	Media	36	24	27,33	8	57	12,67	116,2	2,33	2
	D.E.	7,94	8,26	4,25	0,5	7,7	0,76	66,86	1,15	1
<b>E41#2</b>	Media	51,67	13,33	40,33	8,33	43,5	10,5	179,14	3,67	3
	D.E.	5,13	0,76	6,43	2,47	0	0	51,17	0,58	0
<b>E41#3</b>	Media	41,33	19,67	32,83	9,83	57,17	12,33	88,19	1,33	1,67
	D.E.	8,08	1,15	6,66	0,29	5,3	2,89	104,23	0,58	1,15
<b>E41#7</b>	Media	38,33	17,67	28,83	9	56,33	12,5	132,59	3	2,33
	D.E.	5,77	1,76	6,33	1	9,5	0,5	80,85	1	1,15
<b>E8#1</b>	Media	49	25	32,33	8,17	59,83	11,17	296,18	3,33	3,33
	D.E.	6,56	3,28	8,25	1,61	6,35	2,93	51,62	0,58	0,58
<b>E8#10</b>	Media	35,5	13	27	8	40	10	81,32	3,5	2,5
	D.E.	9,19	1,41	0,71	1,41	0	0	66,58	2,12	0,71
<b>E8#11</b>	Media	20	13,25	19,25	6,25	18	6,75	37,24	2	1,5
	D.E.	7,07	7,42	4,6	1,77	2,83	1,06	1,21	1,41	0,71
<b>E8#4</b>	Media	27	19,83	25,83	7,17	34,75	8,83	28,39	1	1
	D.E.	8,54	5,75	4,25	1,89	2,47	2,25	10,7	0	0
<b>E8#7</b>	Media	32,5	11,5	25,5	6,5	37	11	25,89	1	1
	D.E.	3,54	1,41	2,83	0,71	0	0	2,72	0	0
<b>F13#11</b>	Media	52,33	23,17	37,5	9,17	58,83	14	278,01	2,67	3
	D.E.	3,06	4,75	4,77	0,76	4,86	0,5	206,33	1,53	1,73
<b>F13#2</b>	Media	55,67	25,17	37,17	9,33	75,17	13,5	388,97	3	3,67
	D.E.	6,03	7,51	7,52	0,58	8,84	1	217,4	1,73	1,53
<b>F13#3</b>	Media	48,33	23	31,83	9,5	64,17	11,83	210,97	3	3,33
	D.E.	12,58	1,32	1,61	0,87	5,8	1,15	52,96	1	0,58
<b>F13#6</b>	Media	42	23,67	28,5	8,67	61	14,17	199,53	2,67	3
	D.E.	10,58	1,04	4,58	0,76	11,76	2,57	163,09	1,53	1,73
<b>F13#8</b>	Media	55	22	34,67	9,33	68,5	13	370,35	4,33	4
	D.E.	13,23	1,32	6,43	0,58	14,6	1,32	294,85	1,15	1,73
<b>F47#1</b>	Media	42,67	28	30,5	9,17	60	15,67	125,42	2,67	2,33
	D.E.	3,06	6,73	1,8	0,76	8,41	1,15	81,49	0,58	1,15
<b>F47#5</b>	Media	40	23,67	24,33	8,5	48,5	11,5	103,9	1,67	1,67
	D.E.	7	6,81	3,4	0,87	11,79	2,78	134,49	1,15	1,15
<b>F47#6</b>	Media	40	25,17	30	8,67	61,67	12,83	100,21	1,67	2
	D.E.	5	4,93	1	0,76	6,83	0,58	74,11	0,58	1
<b>F47#8</b>	Media	39	31	28,5	8,17	58,67	12	195,97	2	2,33
	D.E.	3,61	6,14	2,18	0,76	4,54	0	139,98	1	1,15
<b>F47#9</b>	Media	42,67	35,33	26,83	8,33	63,67	12,67	144,91	2,33	2

	D.E.	6,11	5,35	5,39	0,29	1,15	0,76	86,47	0,58	1
<b>G11#2</b>	Media	42,67	23,83	32,67	7,17	53,33	12,83	117,81	2,33	2,33
	D.E.	8,74	9,81	10,37	0,29	13,77	2,25	122,52	0,58	1,15
<b>G11#4</b>	Media	36	18,5	27,83	7,83	58,67	11,67	86,51	2,33	2,67
	D.E.	8,19	9,12	1,76	1,53	10,98	2,31	54,62	1,15	1,15
<b>G11#6</b>	Media	51,33	21	33	9,17	62,67	11,17	167,32	3	3
	D.E.	7,09	6,95	6,73	2,02	8,02	0,29	47,03	1	0
<b>G11#7</b>	Media	46,33	29	36,67	8,5	65	10	222,4	2,33	3,33
	D.E.	6,03	4,92	4,8	1,32	9,85	3,61	167,62	1,53	1,53
<b>G11#9</b>	Media	51,67	21,33	39,83	8	64,33	12,5	310,98	4	3,67
	D.E.	18,93	5,48	16,65	0,5	7,08	1	253,06	1	1,53
<b>G19#10</b>	Media	45	17,25	29	8	58,5	14	169,2	2,33	3
	D.E.	7,07	10,96	0	0	0	0	58,49	1,53	0
<b>G19#2</b>	Media	42,67	22,83	33,67	8,5	43,67	11,17	191,89	2,67	3
	D.E.	17,67	4,01	13,82	1,73	21,3	2,08	222,68	1,15	1,73
<b>G19#3</b>	Media	46	15	30,5	9	70,25	14	238,38	3	3,33
	D.E.	13,89	2,65	2,18	1	5,3	0,71	153,42	1	1,15
<b>G19#6</b>	Media	45,67	23,5	32,83	9,17	64,17	12,5	283,38	3	3,67
	D.E.	11,59	4,58	6,53	0,29	2,75	1	80,66	1	1,15
<b>G19#7</b>	Media	36	19,67	31,5	7,33	45,67	10	153,16	2,67	3
	D.E.	6	4,07	2,18	0,58	2,52	0,87	150,98	1,15	1
<b>G24#1</b>	Media	49,67	17,67	30	9,17	52,5	11,83	193,32	3	2,33
	D.E.	6,66	5,3	1,5	0,29	12,99	2,02	98,45	1	0,58
<b>G24#10</b>	Media	48	22	28,5	8	58,67	12,17	204,88	1,67	2,67
	D.E.	5,29	0,87	4,09	0,5	11,02	1,53	22,18	0,58	0,58
<b>G24#11</b>	Media	44,33	31,33	33,33	7,83	57,17	11,33	364,84	3	3,33
	D.E.	7,51	2,52	3,06	0,29	4,54	0,29	166,48	0	0,58
<b>G24#2</b>	Media	48,33	17,33	34,83	8,83	54,33	12	187,15	2,33	2,67
	D.E.	11,5	1,04	5,25	0,76	9,46	1,5	79,33	0,58	0,58
<b>G24#8</b>	Media	48,33	20,83	35,5	9	64,17	13,67	213,68	2,67	2,67
	D.E.	11,55	5,75	2,5	1	9,61	2,52	50,02	1,53	1,53
<b>H11#1</b>	Media	54,67	26	34,5	8,83	65	11,83	254,52	2,67	2,67
	D.E.	4,51	2,78	4,77	1,26	7,55	1,53	144,27	0,58	0,58
<b>H11#2</b>	Media	40,67	23,67	28	9,5	74,25	14,25	156,89	1,33	2
	D.E.	16,92	11,47	4,58	0,5	3,18	1,77	130,09	0,58	1
<b>H11#3</b>	Media	47,67	26,67	36,5	8,33	70,67	13,67	124,43	2	2,67
	D.E.	10,21	2,36	2,6	0,76	6,71	1,04	107,08	1	1,53
<b>H11#6</b>	Media	49	28,17	29,33	8,67	68	15,33	291,42	2	3
	D.E.	6,56	3,79	3,88	0,58	5,89	0,58	135,47	1	0
<b>H11#8</b>	Media	45,67	28,5	35	8,5	66	12,83	227,59	2	2
	D.E.	9,29	6,08	11,14	0,5	2,29	0,58	155,27	1	1
<b>H12#1</b>	Media	59	27,33	46,83	10,17	91,67	18,17	490,46	3,33	4,33
	D.E.	6,56	6,6	19,53	0,29	5,39	1,76	300,43	1,15	1,15
<b>H12#10</b>	Media	57	27,67	42,67	9,33	76,5	16,5	407,91	2,33	3,67

	D.E.	2,65	2,75	3,4	0,76	6,54	1	63,83	0,58	0,58
<b>H12#4</b>	Media	47,67	23,67	32,33	9,17	67	13,17	161,87	1	1,67
	D.E.	3,21	4,86	2,75	0,58	5,22	0,58	120,23	0	0,58
<b>H12#6</b>	Media	42	24	30,17	9,17	64	12,5	167,39	1,67	2,67
	D.E.	5,2	5,41	2,57	0,58	6,36	0,71	109,79	0,58	0,58
<b>H12#9</b>	Media	56	23,17	37,67	9,33	73,5	14,5	333,97	2,67	4
	D.E.	4,58	2,02	5,35	0,58	9,1	1,32	158,09	0,58	1
<b>H21#10</b>	Media	60,67	19,17	51,5	8,83	80,67	14,33	479,95	4,33	4
	D.E.	8,96	4,16	5,57	0,58	5,48	0,58	123,71	0,58	0
<b>H21#3</b>	Media	58,33	16,67	40,67	8	58,25	12,83	251,56	3,33	3
	D.E.	5,69	6,25	3,06	0,5	3,89	1,61	102,83	1,53	0
<b>H21#4</b>	Media	43	14,25	29,25	6,25	40,75	11,25	99,99	1,33	2
	D.E.	1,41	1,06	6,01	0,35	6,01	1,77	64,28	0,58	0
<b>H21#6</b>	Media	51	17,67	42,5	8,67	67	12,83	216,41	3,33	3,33
	D.E.	4	3,01	9,37	0,76	4,95	0,76	26,54	1,53	0,58
<b>H21#8</b>	Media	48,33	24	35,5	9,5	65	14,83	355,25	4	4,33
	D.E.	2,89	5,41	3,46	0,5	1,8	0,58	52,53	1	0,58
<b>H29#10</b>	Media	48	20,5	27,33	7,17	59,67	11,5	258,02	3,33	4
	D.E.	7,21	1,8	1,53	0,58	8,43	0,5	10,04	1,15	0
<b>H29#11</b>	Media	36,33	23,67	26,83	7,17	47,67	11,17	137,76	1,67	2,33
	D.E.	9,29	5,06	6,29	1,26	6,83	1,15	103,23	0,58	0,58
<b>H29#2</b>	Media	58,67	18,67	33,33	8,67	60	15,17	389,86	4,33	4,67
	D.E.	10,12	3,82	8,55	0,58	6,06	0,76	21,05	0,58	0,58
<b>H29#3</b>	Media	48,67	19,83	33	8	64,67	14,83	212,64	3,33	3
	D.E.	14,22	6,83	4,77	0,5	13,14	1,44	117,57	1,53	0
<b>H29#6</b>	Media	61,67	19,83	54,67	9,33	73	12,83	453,96	4,67	4,67
	D.E.	1,53	0,58	2,93	0,58	2,18	0,58	99,68	0,58	0,58
<b>I48#1</b>	Media	42	24,83	33,5	9,67	50,5	12,67	243,88	3,33	2,67
	D.E.	6,24	3,79	5,22	0,29	7,78	3,01	105,06	1,15	0,58
<b>I48#10</b>	Media	39	28	30	8	51,83	11,17	164,7	2	2,33
	D.E.	8,72	6,14	11,17	2,6	7,75	2,84	88,58	0	0,58
<b>I48#4</b>	Media	44	24,5	37	8,83	56,83	13,17	250,88	3	2,67
	D.E.	11,53	2,78	11,14	0,29	10,07	1,15	123,66	1	1,15
<b>I48#8</b>	Media	33,5	20,25	31,5	9,75	53,25	9,5	122,41	3	2,5
	D.E.	2,12	8,13	8,49	0,35	10,96	0,71	27,42	1,41	0,71
<b>I48#9</b>	Media	46	26,5	35,67	11,33	53,67	12,83	294,79	3,33	3
	D.E.	1	0	1,53	1,15	7,77	0,58	160,95	1,15	1
<b>J10#10</b>	Media	50	25,67	39,5	9	75,17	15	151,59	1,67	2,67
	D.E.	0	3,82	3,61	0,5	1,76	0,87	73,69	0,58	0,58
<b>J10#2</b>	Media	55,33	15,83	41	9,17	49,17	12,5	155,04	3	2,67
	D.E.	0,58	1,15	7,47	0,58	2,36	1	74,5	1	0,58
<b>J10#3</b>	Media	41	14,83	33,17	8,17	41	9	80,21	3	2,33
	D.E.	4,58	4,16	7,02	0,76	13,31	1,32	49,89	1	0,58
<b>J10#6</b>	Media	60,67	19,33	38,67	10,17	73	16,33	326,45	3,67	4,67



	D.E.	7,51	1,61	4,8	0,29	6,56	1,53	187,23	1,53	0,58
<b>J10#9</b>	Media	35	9,5	25,5	10	36	10	0	sd	sd
	D.E.	0	0	0	0	0	0	0	sd	sd
<b>J13#10</b>	Media	54,67	24,17	40	7,17	57,5	14	281,45	2	3,67
	D.E.	9,29	1,53	4,82	0,58	2,29	1,32	118,25	1	0,58
<b>J13#2</b>	Media	45,67	22,83	38	9,5	58	14,83	136,67	2	3
	D.E.	1,15	0,76	1,8	1	0,87	1,76	53,24	1	1
<b>J13#5</b>	Media	38,33	13	34,83	7,33	44,33	15,5	51,17	1,33	2
	D.E.	5,77	3,5	1,89	0,76	7,57	0,87	18,3	0,58	0
<b>J13#7</b>	Media	50	12,33	40,5	8,33	61,25	14,25	128,44	1,67	2,33
	D.E.	8,66	5,03	6,54	1,04	15,2	3,18	87,33	0,58	0,58
<b>J13#9</b>	Media	41,33	20	37,17	9	54,67	15	217,74	2,33	3,67
	D.E.	5,51	3,91	5,75	0,5	3,51	1,32	120,85	1,15	0,58
<b>J18#1</b>	Media	40	22,67	28,17	8	63,17	11,5	213,05	3	3
	D.E.	13,45	5,97	2,57	0,5	12,5	2,18	210,99	0	1
<b>J18#4</b>	Media	58,33	24,67	32,83	7,67	75,33	11,83	200,51	3	3,67
	D.E.	10,69	5,75	14,51	0,76	12,79	3,33	64,24	1	0,58
<b>J18#5</b>	Media	46,33	29,67	36,5	8,33	73,33	16,67	232,05	2,67	3
	D.E.	5,51	3,4	0,5	1,04	6,25	0,58	103,62	0,58	0
<b>J18#6</b>	Media	27,33	13	27,5	6,83	44,25	11,5	22,55	1	1
	D.E.	4,62	10,48	6,06	0,76	0,35	0,71	13,72	0	0
<b>J18#9</b>	Media	50,33	16,5	30,33	8,83	56,33	10,33	145,67	1,67	2,33
	D.E.	4,16	1,32	7,75	0,58	2,57	1,44	83,61	0,58	0,58
<b>J42#1</b>	Media	30,33	21,67	24,5	7,5	38,5	11,83	27,99	1,33	1,33
	D.E.	9,07	7,23	0,87	0,5	4,77	2,93	34,01	0,58	0,58
<b>J42#10</b>	Media	42,67	31,5	32,67	9,83	67	14,5	254,47	3	2,67
	D.E.	15,04	3,61	7,15	0,29	9,85	1	177,14	1	0,58
<b>J42#5</b>	Media	63,33	21,5	38,5	10,67	68,67	13,33	268,28	2,33	3,67
	D.E.	2,89	3,28	5,57	0,76	1,04	0,76	151,17	1,15	0,58
<b>J42#7</b>	Media	47	14,67	35,33	7,5	47,83	10,17	135,53	2	3
	D.E.	2,65	6,17	1,04	0,5	14,63	0,29	81,71	0	1
<b>J42#8</b>	Media	49	27,67	34,17	9,33	60,75	11,75	282,09	3,33	3
	D.E.	5,29	6,93	3,33	0,29	2,47	0,35	226,09	0,58	1
<b>K19#10</b>	Media	43	29,17	31,17	8,5	62,67	12,83	193,14	3	2,33
	D.E.	3,46	4,54	1,04	0,5	5,58	1,15	109,64	1	0,58
<b>K19#11</b>	Media	24,33	25,17	20,67	5,17	43,75	8	47,01	1	1
	D.E.	2,89	9,09	1,15	0,29	8,84	0,71	21,81	0	0
<b>K19#5</b>	Media	41,33	27,83	27,67	7,83	63,33	11,5	169,93	3	3,33
	D.E.	5,51	10,54	3,69	0,29	8,81	0,5	70,7	1	0,58
<b>K19#7</b>	Media	32,33	25,67	27,5	7,5	52,5	11	73,19	2	1,67
	D.E.	6,43	7,32	7,81	2,29	2,12	1,8	29,35	1	1,15
<b>K19#8</b>	Media	33,67	27,83	28,17	7,67	62,67	13	60,21	1,67	1,67
	D.E.	7,77	1,53	3,75	0,29	8,08	0,5	31,4	0,58	0,58
<b>L25#1</b>	Media	47	22,17	32,17	9,17	63,17	14,5	207,43	3	3

	D.E.	7,55	1,15	1,76	1,76	5,51	0,5	104,54	1,73	1
<b>L25#10</b>	Media	44,33	24,33	33,33	8,33	67	13,83	280,25	3,33	3,33
	D.E.	1,53	6,05	7,08	0,76	2,78	2,52	154,74	1,15	1,53
<b>L25#3</b>	Media	39	27,67	29,17	8,33	62,17	12,17	171,58	2	2,33
	D.E.	9,54	6,83	4,62	0,29	3,82	0,76	75,04	0	0,58
<b>L25#5</b>	Media	36	26,5	30,33	7,83	55	12,33	186,87	2,33	2,67
	D.E.	7,94	9,26	4,37	1,04	5,27	0,76	50,78	0,58	1,15
<b>L25#6</b>	Media	45,67	25,83	29,83	7,5	53,5	11,67	307,69	4	3,67
	D.E.	8,14	9,22	9	0,87	10,83	1,04	84,41	1	0,58
<b>L45#1</b>	Media	50,33	21,83	33,5	8,33	65	12,83	204,4	3	2,67
	D.E.	11,93	8,95	6,61	0,76	8,85	1,61	56,86	1	0,58
<b>L45#10</b>	Media	45,33	26,33	33,33	7	64,17	14	193,4	3	2,67
	D.E.	2,52	7,02	7,25	0,87	2,08	1,73	44,18	1	0,58
<b>L45#2</b>	Media	46,33	22	36,5	8,33	64,17	12,83	219,73	2,33	3
	D.E.	13,65	8,19	12,49	0,29	18,91	1,26	137,29	1,53	1
<b>L45#4</b>	Media	51,67	26	39,67	8,5	73,5	15,83	280,33	3	3,67
	D.E.	7,51	3,91	4,19	1	3,97	0,29	141,79	1,73	1,15
<b>L45#7</b>	Media	50,33	27	30,5	8,5	63,5	14	199,02	3	3
	D.E.	11,68	8,76	2,65	0,5	9,99	0,87	136,89	1,73	1
<b>L5#1</b>	Media	42,33	21,33	30,17	8,33	65,67	13,83	192,15	3,33	2,67
	D.E.	5,51	3,82	5,75	0,29	11,37	0,76	43,41	0,58	0,58
<b>L5#10</b>	Media	44,67	25,5	32,83	8,83	60,83	14,67	305,56	3,33	3
	D.E.	8,39	4,77	7,69	0,29	5,01	1,04	61,19	0,58	0
<b>L5#11</b>	Media	45	26,67	32,17	8,83	62,83	15,33	316,36	3	3,33
	D.E.	6,24	6,03	5,75	0,29	11,34	1,04	148,12	0	0,58
<b>L5#3</b>	Media	40,67	25,67	31,83	8,17	59,33	11,83	289,56	4	2,67
	D.E.	6,03	5,62	13,65	0,76	5,97	1,53	127,86	1	0,58
<b>L5#7</b>	Media	29,33	15,83	25	8	67	14	147,83	2,5	4
	D.E.	14,01	8,39	9,1	0,5	0	0	254,4	2,12	0
<b>Q3775</b>	Media	43	32,83	26,33	9,17	70,83	14,5	215,03	2,33	3,33
	D.E.	11,53	1,53	5,03	0,58	4,25	1,32	137,96	0,58	0,58
<b>Q3776</b>	Media	37	38,5	29,67	8,33	59,33	14	266,54	2,33	2,67
	D.E.	2,65	3,28	4,19	0,29	3,51	0,5	152,25	1,15	0,58
<b>Q3838</b>	Media	20,33	30	17,67	5,5	46,67	7	120,33	2	1,33
	D.E.	3,06	4	2,08	0,5	1,53	0,87	112,3	0	0,58
<b>Q4064</b>	Media	35,67	34,83	29,33	9,33	58,17	15,17	172,07	2,67	2,67
	D.E.	9,29	5,62	3,62	0,29	9,02	1,44	161,42	0,58	0,58
<b>Q4205</b>	Media	43,33	32,67	25	8,17	64	13,33	119,97	2,33	3
	D.E.	12,01	2,75	3,77	0,58	3,61	0,76	71,69	0,58	0
<b>Q4294</b>	Media	30,67	32	26,5	8,83	53,67	13,5	82,34	2,33	1,67
	D.E.	12,01	7,94	5,5	1,04	4,65	1	67,41	0,58	0,58
<b>SV2893</b>	Media	42,67	35,67	29,83	9,17	69,5	14,83	201,97	3	3,67
	D.E.	10,69	7,77	5,11	0,76	3,77	1,04	140,57	1	0,58
<b>SWSB</b>	Media	54,67	27,67	37,17	8,33	62,33	14,33	328,09	2	3,33

<b>TB86</b>	D.E.	17,62	3,75	4,25	0,29	4,07	0,58	97,65	1	0,58
	Media	23,33	25,67	20	7,5	46,83	9,33	50,42	2	1,67
<b>V14327</b>	D.E.	5,77	5,53	2	0	5,51	0,29	52,44	1	0,58
	Media	28	33,5	33	9	51	12	137,59	3,33	3
	D.E.	10,58	1,5	3,12	0	2,18	1,73	57,15	0,58	0

**Tabla V.** Análisis de la variabilidad morfo-agronómica en los GTAN, GTSE y PTSS de *P. notatum*. Población, variable analizada, número de individuos evaluados, media, desvío estándar, coeficiente de variación, mínimos y máximos.

<b>Población</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>CV</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>GTAN</b>	Altura	30	33,43	10,68	31,95	17	55
<b>GTAN</b>	Diámetro	30	33,53	5,91	17,62	20,5	42
<b>GTAN</b>	L. Hoja	30	27,42	6,32	23,03	16	39
<b>GTAN</b>	A. Hoja	30	8,57	1,28	15	5	10
<b>GTAN</b>	A.E.F.	30	58,42	9,68	16,57	40,5	74
<b>GTAN</b>	L. Racimo	30	12,82	2,78	21,7	6	16
<b>GTAN</b>	MS	30	164,84	128,14	77,74	15	491,36
<b>GTAN</b>	Tol. frío	30	2,5	0,73	29,24	1	4
<b>GTAN</b>	Rebr. inv.	30	2,6	0,97	37,25	1	4
<b>GTSE</b>	Altura	9	39,11	19,27	49,27	11	75
<b>GTSE</b>	Diámetro	9	25,28	8,23	32,55	11	35,5
<b>GTSE</b>	L. Hoja	9	27,22	8,36	30,69	18	41,5
<b>GTSE</b>	A. Hoja	9	7,5	1,17	15,63	6	8,5
<b>GTSE</b>	A.E.F.	9	51,89	17,18	33,11	27	68
<b>GTSE</b>	L. Racimo	9	12,61	2,3	18,25	8,5	15
<b>GTSE</b>	MS	9	152,84	152,37	99,69	4,02	396,86
<b>GTSE</b>	Tol. frío	9	1,89	0,78	41,39	1	3
<b>GTSE</b>	Rebr. inv.	9	2,56	1,01	39,67	1	4
<b>PTSS</b>	Altura	408	44,79	10,59	23,65	15	71
<b>PTSS</b>	Diámetro	408	22,6	6,74	29,83	4	41,5
<b>PTSS</b>	L. Hoja	408	32,44	7,46	23,01	14,5	68
<b>PTSS</b>	A. Hoja	408	8,53	1,21	14,2	5	12
<b>PTSS</b>	A.E.F.	367	59,83	11,72	19,59	16	95,5
<b>PTSS</b>	L. Racimo	371	12,85	2,11	16,42	6	20
<b>PTSS</b>	MS	410	195,49	132,66	67,86	0	730,43
<b>PTSS</b>	Tol. frío	411	2,65	1,17	44,06	1	5
<b>PTSS</b>	Rebr. inv.	408	2,81	1,06	37,59	1	5

**Tabla VI.** Fuentes de variación (p-valor) para cada una de las variables morfo-agronómicas evaluadas en la PTSS de *P. notatum*.

Variable	Fuente de variación	
	Genotipo	Bloque
Altura	<0,01	<0,01
Diámetro	<0,01	0,01
L. Hoja	<0,01	0,22
A. Hoja	<0,01	0,79
A.E.F.	<0,01	<0,01
L. Racimo	<0,01	<0,01
MS	<0,01	<0,01
Tol. frío	<0,01	<0,01
Rebr. inv.	<0,01	<0,01

**Tabla VII.** Análisis de la varianza para las distintas fuentes de variación y sus interacciones en la evaluación de la producción de semillas.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	48744,95	174	280,14	4,12	0,0004
Método de polinización	11208,48	1	11208,48	164,8	<0,0001
Genotipo	26539,37	76	349,2	5,13	0,0001
Año	3801,9	1	3801,9	55,9	<0,0001
Método de polinización*Genotipo	5479,37	76	72,1	1,06	0,4658
Método de polinización*Año	313,24	1	313,24	4,61	0,045
Genotipo*Año	1402,59	19	73,82	1,09	0,4301
Error	1292,28	19	68,01		
Total	50037,23	193			

**Tabla VIII.** Producción de semillas en condiciones de autopolinización y polinización abierta en genotipos de la PTSS (2014, 2015 y 2016), y en genotipos tetraploides sexuales experimentales y diploides (2016).

<b>Año</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Autopol.</b>	<b>Pol. Abierta</b>
2014	A29 #2	0,0	10,0
2014	A48 #1	0,0	5,1
2014	A48 #8	0,0	0,0
2014	B19 #6	19,8	53,0
2014	B19 #8	12,7	42,2
2014	B19 #11	6,5	17,4
2014	E8 #9	0,0	4,7
2014	E13 #8	0,9	9,2
2014	E41 #7	0,8	25,7
2014	H13 #2	25,2	60,9
2014	H47 #2	16,1	18,1
2014	H47 #6	6,1	20,4
2014	J10 #10	22,3	39,0
2014	J18# 2	12,7	35,9
2014	J42 #2	14,3	31,9
2014	K6 #2	8,8	46,6
2014	K29 #5	11,0	39,7
2014	K46 #2	0,3	9,0
2014	L11 #4	0,8	11,5
2014	L12 #2	8,4	19,3
2014	L29 #3	15,7	16,1
2014	N24 #7	10,0	14,0
2014	N32 #9	3,3	9,5
2014	N35 #5	6,5	24,8
2014	O11 #6	2,1	8,6
2014	O19 #8	12,7	23,4
2014	O24 #2	10,6	44,3
2014	P5 #3	3,9	9,9
2014	P25 #4	10,3	18,4
2014	P45 #4	3,8	9,0
2015	A48 #8	2,6	37,7
2015	B19 #6	20,5	69,0
2015	B19 #8	19,9	44,3
2015	B19 #10	22,7	49,7
2015	E8 #9	7,0	22,3
2015	E13 #8	13,4	45,2
2015	E41 #7	3,1	31,4
2015	H47 #1	31,9	31,1
2015	H47 #11	12,7	44,2

2015	J10 #10	22,3	50,3
2015	J18# 1	19,8	33,0
2015	J18# 2	34,2	28,5
2015	J42 #2	10,6	29,8
2015	J42 #6	63,5	53,7
2015	K6 #2	28,0	39,0
2015	K29 #3	34,0	58,8
2015	K46 #2	10,8	13,4
2015	K46 #3	16,7	31,4
2015	L11 #4	8,6	28,3
2015	L12 #10	13,5	19,6
2015	L29 #3	30,2	36,4
2015	N24 #7	32,2	38,6
2015	N32 #9	8,1	37,9
2015	N35 #4	30,2	51,3
2015	N41 #1	29,8	41,9
2015	O11 #6	16,4	43,4
2015	O19 #8	29,7	63,2
2015	O24 #8	9,8	32,2
2015	P5 #3	25,6	34,2
2015	P25 #4	21,8	38,8
2015	P45 #4	6,8	40,8
2016	A48-1	1,2	2,8
2016	A48-4	13,8	21,5
2016	A48-8	0,0	4,1
2016	B19-10	26,8	38,3
2016	B19-11	0,0	4,8
2016	B19-5	17,2	48,2
2016	E13-2	5,3	8,7
2016	E41-11	39,2	54,5
2016	E8-1	7,9	8,5
2016	H13-8	15,2	24,3
2016	H47-6	1,5	18,6
2016	J10-10	13,9	26,2
2016	J13-2	34,6	51,3
2016	J18-1	4,3	32,2
2016	J42-5	22,5	29,4
2016	K29-5	17,9	58,0
2016	K46-1	26,2	47,2
2016	K6-9	28,5	37,5
2016	L11-8	27,4	51,9
2016	L12-1	10,1	8,5
2016	L21-3	18,1	5,1
2016	L29-11	1,7	12,6

2016	N32-11	31,8	46,9
2016	N35-5	21,4	34,1
2016	N41-3	24,1	36,6
2016	O11-2	11,5	9,6
2016	O19-3	25,2	40,0
2016	O24-11	24,6	18,8
2016	P25-10	16,0	28,7
2016	P45-7	20,5	38,1
2016	P5-3	7,5	21,6
2016	C4-4x	3,4	12,3
2016	Q4205	12,0	24,8
2016	SWSB	14,3	30,3
2016	Hojs 398	24,5	59,2
2016	Tifton 9	9,0	43,5

**Tabla IX.** Porcentajes de semillas y de germinación en los cruzamientos de prueba entre 11 genotipos maternos de la PTSS y los padres apomícticos cv. Boyero UNNE y cv. Argentine.

Madre	Padre			
	Boyero UNNE		Argentine	
	% de semillas	% germinación	% de semillas	% germinación
A24#7	31,7	91	47,4	53
A41#2	41,6	57	21,0	93
C46#3	31,7	83	29,8	65
C6#2	21,2	66	35,5	60
E13#8	31,7	75	17,7	57
F13#2	31,6	46	45,8	67
G19#8	33,7	73	72,6	82
I48#1	31,6	82	7,7	72
J18#1	21,2	76	28,5	70
K19#8	21,2	94	42,4	70
L25#4	11,4	78	48,9	70