



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**TRANSFERENCIA DE MARCADORES EST-SSR Y COS DESDE ESPECIES
MODELO A *PASPALUM NOTATUM* Y ESTUDIOS DE MAPEO
COMPARATIVO**

LIC. LORENA ADELINA SIENA

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR

DR. JUAN PABLO A. ORTIZ

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. CC 14 (S2125ZAA), Zavalla, (Provincia de Santa Fe), Argentina.

2011

Transferencia de marcadores EST-SSR y COS desde especies modelo a *Paspalum notatum* y estudios de mapeo comparativo

Lorena Siena

Licenciada en Biotecnología – UNR

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 Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias –UNR, y en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE), durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2007 y Diciembre de 2011, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz.

Lic. Lorena Adelina Siena

(Tesisista)

Dr. Juan Pablo A. Ortiz

(Director)

Agradecimientos

Especialmente quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Juan Pablo A. Ortiz por aceptarme bajo su dirección y haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Valoro sobremanera su dedicación y paciencia así como su optimismo frente a los resultados y disposición para analizarlos.

Quiero agradecer a mi co-directora de beca de CONICET, la Dra. Silvina Pessino, por aceptarme para trabajar con ella y siempre estar dispuesta a colaborar en la planificación de los experimentos y la discusión de los resultados.

Agradezco a las instituciones que hicieron posible que este trabajo de tesis pueda realizarse. En primer lugar, quiero brindar mi agradecimiento a las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario por aceptarme desde mi etapa de estudiante de grado y brindarme el espacio donde realicé el presente trabajo de tesis. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado las becas de postgrado tipo I y II por medio de las cuales fue posible realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco al Prof. Camilo Quarín por recibirme para trabajar en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET) y por su paciencia para enseñarme a pensar e interpretar los resultados. A todos los integrantes de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, por su hospitalidad y predisposición para el trabajo. Especialmente le doy las gracias a la Dra. María Esperanza Sartor y al Dr. Francisco Espinoza por su disposición para brindarme material y su colaboración para el análisis de los resultados.

Al Dr. Hugo R. Permingeat por brindarme la posibilidad de incorporarme como docente a la Cátedra de Química Biológica de la UNR.

Al Prof. Eligio Morandi y a todos los integrantes de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la UNR por facilitarnos parte de la infraestructura donde se mantuvo el material vegetal.

A todos mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular: María Pía Rodríguez, Maricel Podio, Luciana Delgado, Ana Ochogavía, Micaela Mancini, Paola

D`Attilio y Lucas Lieber, por su amistad, ayuda, apoyo y disposición permanente para discutir los experimentos y analizar los resultados. Especialmente quiero agradecer a la Dra. Juliana Stein por haberme transmitido sus conocimientos y experiencia cuando ingresé al laboratorio y a la Dra. Silvina Felitti por su colaboración en los experimentos de biología molecular.

Agradezco y valoro la paciencia de mis amigos que me entendieron y brindaron su ayuda en todo momento.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres que me apoyaron y alentaron incondicionalmente. A Walter, Ariel, Vanesa y Silvia que estuvieron dispuestos a colaborar cada vez que fue necesario. Y a los más chiquitos, Valentina, Martín, Federico y Santiago por alegrarme cada día.

Lorena

Durante el desarrollo de esta tesis se han realizado las siguientes contribuciones científicas:

Artículos en revistas:

STEIN J, PESSINO SC, MARTÍNEZ EJ , RODRÍGUEZ MP, SIENA LA, QUARIN CL and ORTIZ JPA (2007). **A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* (Bahagrass) based on single-dose markers**. *Molecular Breeding* 20: 153-166 (Reino Unido) (Publicado).

FELITTI SA, SEIJOJ JG, GONZÁLEZ AM, PODIO M; LASPINA NV, SIENA LA; ORTIZ JPA and PESSINO SC (2010). **Differential expression of lorelei-like genes in aposporous and sexual *Paspalum notatum* plants**. *Plant Molecular Biology*. *Plant Mol Biol* 77, N° 4-5 DOI 10.1007/s11103-011-9814-9.

PODIO M, RODRÍGUEZ MP, FELITTI S, STEIN J, MARTÍNEZ EJ, SIENA LA, QUARIN CL, PESSINO SC and ORTIZ JPA (2012). **Sequence characterization, *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum***. Enviado para su publicación.

Congresos internacionales:

SIENA LA, QUARIN CL, Y ORTIZ JPA (2010). **Identification of rice EST-SSR markers flanking the Apospory Specific Genomic Region (ASGR) in *Paspalum notatum***. The 6th Internacional Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf- MBFT 2010-Argentina. Póster. pp.202-203.

PODIO M, FELITTI SA, SIENA LA Y ORTIZ JPA (2010). **Cloning a somatic embryogenesis like-kinase (serk) gene of *Paspalum notatum***. The 6th Internacional Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf- MBFT 2010-Argentina. Póster. pp.189.

SIENA LA, FELITTI SA, Y ORTIZ JPA (2009). VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina – II Congreso Internacional-REDBIO-Argentina. **Desarrollo de marcadores EST-SSR en *Paspalum notatum* a partir de bases de datos publicas de arroz y maíz.** Poster. pp.146.

FELITTI SA, PODIO M, RODRÍGUEZ MP, SIENA LA Y ORTIZ JPA (2009). VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina – II Congreso Internacional-REDBIO-Argentina. **Clonado de genes asociados al desarrollo del saco embrionario en *Paspalum notatum* por estrategias de caminata cromosomal.** Póster. pp.132

ORTIZ JPA, STEIN J, RODRÍGUEZ MP, SIENA LA, PODIO M, PESSINO SC AND QUARIN CL (2007). **Molecular characterization of the apospory-specific genomic region in *Paspalum notatum* (Bahigrass).** The 9th Gatersleben Research Conference - 3rd International Apomixis Conference - 3rd International Apomixis Conference. Póster

Congresos Nacionales:

SIENA LA, REBOZZIO R, ESPINOZA F, QUARIN CL Y ORTIZ JPA (2011). **Utilización de marcadores microsatélites génicos (EST-SSR) para estudios filogenéticos en especies del género *Paspalum*.** XXXV Congreso Argentino de Genética (SAG). Póster. pp.202.

FELITTI SA, SIENA LA, STEIN J, RODRÍGUEZ MP, PODIO M Y ORTIZ JPA (2008). **Identificación de genes candidatos de la apomixis en razas tetraploides de *Paspalum notatum*.** XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Póster.

INDICE	Pag.
INDICE	i
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS	vi
RESUMEN	ix
SUMMARY	xi
I- INTRODUCCIÓN	1
I.1- El género <i>Paspalum</i>	1
I.1.1- <i>Paspalum notatum</i> (pasto horqueta, "bahiagrass")	4
I.1.1.1-Distribución, adaptación y centro de origen de <i>P. notatum</i>	5
I.2- Apomixis	6
I.2.1- Definición del término apomixis	6
I.2.2- La reproducción apomítica y sus diferentes formas	8
I.2.2.1-Rasgos distintivos del carácter apomixis y complejos agámicos	12
I.2.3- La apomixis en <i>Paspalum</i>	13
I.3- Marcadores Genéticos	16
I.3.1- Características generales de los marcadores genéticos	16
I.3.2- Marcadores moleculares	17
I.3.2.1- Marcadores moleculares basados en PCR	18
I.3.2.1.1- Marcadores SSR	18
Función potencial de los marcadores microsatélites	20
Los microsatélites como marcadores moleculares	20
Categorías y características de los microsatélites	21
Desarrollo de marcadores microsatélites genómicos (SSR) en <i>P.notatum</i>	23
I.3.2.1.2- Marcadores microsatélites génicos o EST-SSR	24
Función de los SSR en los genes	25
Utilidad de EST-SSR como marcadores moleculares	26
Minería de datos para el desarrollo de marcadores EST-SSRs en gramíneas	26
Búsqueda de ESTs que contengan motivos SSR	26
Agrupamiento de los EST	27

Desarrollo de marcadores EST-SSR para trigo hexaploide	29
Transferibilidad de EST-SSR entre especies de gramíneas	31
I.3.2.1.3-Desarrollo de Marcadores COS (<i>Conserved Ortholog Set</i>)	32
I.4-Mapas genéticos	35
I.4.1-Mapas de ligamiento genético	36
I.4.1.1-Análisis de ligamiento	39
I.4.1.2-Mapas de ligamiento genético de <i>Paspalum notatum</i>	41
I.4.1.2.1-Construcción de un mapa genético a nivel diploide	41
I.4.1.2.2-Desarrollo de un mapa genético a nivel tetraploide	42
I.4.1.2- Mapeo de marcadores EST-SSR en trigo hexaploide	44
I.4.2- Mapeo comparativo	46
I.4.2.1-Utilidad de los EST-SSR para mapeo comparativo	47
I.4.2.1.1-Marcadores EST-SSR en mapeo comparativo entre trigo y arroz	48
I.5-Utilización de marcadores moleculares para estudios filogenéticos	50
I.5.1- Explotación de datos y frecuencia de alelos	53
I.5.2- Parámetros de divergencia genética utilizados en este trabajo	54
I.5.2.1- Índice de Shannon en genética de poblaciones	54
I.5.2.2- PhipT	54
I.5.2.3- Análisis de Varianza Molecular	54
I.5.2.4- Análisis de Coordenadas Principales	55
I.5.3- Estudios filogenéticos en el genero <i>Paspalum</i> con marcadores moleculares	56
I.5.4-Estudios filogenéticos con marcadores moleculares EST-SSR	56
I.6-Hipótesis de trabajo	58
II- OBJETIVOS	59
II.1- Objetivo General	59
II.2- Objetivos Específicos	59
III- MATERIALES Y MÉTODOS	61
III.1- Material vegetal	61
III.1.1-Material vegetal utilizado en los experimentos de amplificación de	61

marcadores EST-SSR y mapeo genético en <i>Paspalum notatum</i>	
III.1.2-Material vegetal utilizado en el análisis de transferibilidad de los marcadores EST-SSR	62
III.2- Extracción de ADN genómico	64
III.3- Generación de marcadores moleculares en <i>Paspalum</i>	64
III.3.1- Amplificación de marcadores EST-SSR	64
III.3.2- Amplificación de marcadore SSR genómicos	65
III.3.3- Generación de Marcadores COS	66
III.4-Electroforesis de marcadores microsátélites en geles de acrilamida desnaturalizantes	67
III.5- Clasificación de los marcadores moleculares en la población de mapeo	68
III.6- Mapeo y localización de marcadores SSR y COS en <i>P. notatum</i>	69
III.7- Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes, transformación de bacterias y clonado de fragmentos de amplificación	72
III.7.1- Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	72
III.7.2- Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con cloruro de calcio	72
III.7.3- Obtención de células electrocompetente y transformación por electrotransformación	73
III.7.4- Clonado de fragmentos de amplificación y validación de las secuencias de EST-SSR	74
III.8- Parámetros utilizados para el análisis de secuencias de amplificones obtenidos en <i>Paspalum notatum</i>	74
III.9-Parámetros utilizados en el mapeo <i>in silico</i> para la identificación de genes ortólogos en arroz y maíz	75
III.10- Análisis de agrupamiento y estimación de parámetros de variabilidad de especies del género <i>Paspalum</i> mediante el empleo de marcadores EST-SSR	76
IV- RESULTADOS	79
IV.1- Desarrollo y Mapeo de marcadores EST-SSR en <i>Paspalum notatum</i>	79
IV.1.1- Selección de un conjunto de marcadores de EST-SSR distribuidos uniformemente por el genoma de arroz a partir de bases públicas	79
IV.1.2-Detección de polimorfismo entre los genotipos parentales de la población de mapeo	80

IV.1.3-Análisis de segregación de marcadores EST-SSR	84
IV.1.4-Clonado y validación de las secuencias de EST-SSR	87
IV.1.5-Localización de marcadores EST-SSR en el mapa genético de <i>Paspalum notatum</i>	91
IV.2-Análisis y mapeo de microsatélites genómicos de <i>P. notatum</i>	94
IV.2.1-Amplificación de los microsatélites genómicos en los genotipos Q4188 y Q4117	94
IV.2.2-Localización de marcadores SSR genómicos en <i>P. notatum</i>	95
IV.3-Desarrollo de marcadores COS a partir de genes relacionados a componentes de la apomixis en especies de gramíneas	98
IV.4-Expansión del mapa genético de <i>Paspalum notatum</i> a partir de la incorporación de maracores SSR y COS	102
IV.5- Estudios de mapeo comparativo	114
IV.5.1-Cobertura del genoma de arroz alcanzada con los marcadores mapeados en <i>P. notatum</i>	114
IV.5.2-Localización de marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS en arroz y maíz mediante mapeo <i>in silico</i>	116
IV.5.3-Comparación de la localización de los marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS en <i>P. notatum</i> , arroz y maíz.	122
IV.5.3.1- Detección de regiones <i>sinténicas</i> entre <i>P. notatum</i> , arroz y maíz	124
IV.5.3.1.1-Estudio de mapeo comparativo en el mapa del genotipo Q4188	124
IV.5.3.1.2-Estudio de mapeo comparativo en el mapa del genotipo Q4117	126
IV.5.3.1.3- Estudio de mapeo comparativo de la región genómica responsable de la aposporía	132
IV.6- Análisis de transferencia de marcadores EST-SSR y SSR genómicos a distintas especies de <i>Paspalum</i> y evaluación de su capacidad para la realización de estudios de filogenia	135
IV.6.1-Transferencia de EST-SSR en distintas especies de <i>Paspalum</i>	135
IV.6.2-Transferencia de SSR en distintas especies de <i>Paspalum</i>	145

V- DISCUSIÓN	147
V.1- Transferencia y localización de marcadores de secuencias conocidas (EST-SSR, SSR genómicos y COS) a <i>Paspalum notatum</i>	147
V.2- Evaluación de marcadores EST-SSR en especies del género <i>Paspalum</i>	156
VI- CONCLUSIONES	163
	166
VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
VIII- ANEXOS (DEFINICIONES, FIGURA, TABLAS DE CEBADORES DE MARCADORES)	I-VIII

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

AgNO₃: nitrato de plata

ARNasa: ribonucleasa

BAC: cromosoma artificial de bacteria

BSA: albúmina sérica bovina 1- acetilada

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo, pH).

COS: Secuencia Ortóloga Conservada

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio

°C: grados centígrados

HCl: ácido clorhídrico

H₂O_d: agua destilada

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

EST: “Expressed sequence tag”

BrEt: bromuro de etidio

F₁: primera generación en un cruzamiento

gr/l: gramos por litro

KAc: acetato de potasio

Kit: equipo comercial

M: molar

mA: miliamperes

mg: miligramo

mg/l: miligramos por litro

MgAc: acetato de magnesio

MgCl₂: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mM : milimolar

N: normal

***n*:** número cromosómico haploide de una especie

***2n* :** número cromosómico diploide de una especie

NaOH: hidróxido de sodio

NaCl: cloruro de sodio

NCBI: “National Center for Biotechnological Information”

ng: nanogramos

NH₄OAc: acetato de amonio

nm: nanómetro ($1 \cdot 10^{-6}$ m)

LOD score: “logarithm of odds”

OTP: “off-type plants”, plantas fuera de tipo

OTU: Unidad Taxonómica Operacional

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa

RAPD: polimorfismos por amplificación al azar del ADN

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

rpm: revoluciones por minuto

SDS: sulfato de dodecil sódico

SSR: “Simple sequence repeats”; Secuencia Simple Repetida

T: temperatura

TAE: Tris-ácido acético-EDTA

Taq polimerasa: enzima polimerizante del ADN obtenida de *Thermus aquaticus*

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tm: “melting temperature ”; temperatura de fusión

Tris: N-Tris-(hidoximetil)-aminoetano

U: unidad de actividad enzimática

UBC: Universidad de la Columbia Británica

µg: microgramos ($1 \cdot 10^{-6}$ g)

μl: microlitro ($1 \cdot 10^{-6}$ l)

UV: ultravioleta

V: voltios

W: wats

x: número cromosómico básico de una especie

χ²: prueba de bondad de ajuste.

Resumen

Paspalum es un género perteneciente a la familia de las Poaceae que cuenta con más de 300 especies. Las mismas muestran una gran variación en los niveles de ploidía y modos de reproducción. En general, los citotipos diploides son sexuales y los poliploides sexuales o apomícticos. Dada su complejidad, el género ha sido dividido en subgéneros y grupos informales. Varias especies representan importantes recursos forrajeros de las regiones tropicales y subtropicales de América. En particular, *P. notatum* Flügge es una gramínea rizomatosa perenne cuyas razas tetraploides se reproducen casi exclusivamente por apomixis de tipo apospórica. La aposporía en *P. notatum* está controlada por un *locus* simple dominante con segregación distorsionada. Trabajos previos posibilitaron el desarrollo de mapas genéticos al nivel tetraploide y la identificación de la región genómica responsable de la aposporía. A partir de los proyectos de secuenciación masiva de genomas se han desarrollado distintos tipos de marcadores moleculares de secuencia conocida. Los microsatélites génicos (EST-SSR) derivan de secuencias expresadas que contienen repeticiones microsatélites (SSR) internas. Los marcadores COS provienen de genes que contienen regiones conservadas entre especies poco relacionadas. Estos tipos de marcadores son relativamente simples de desarrollar y han mostrado un alto nivel de polimorfismo y transferibilidad entre especies. Los objetivos de este trabajo de tesis fueron transferir marcadores de secuencia conocida (EST-SSR, SSR genómicos y COS) a *P. notatum* y caracterizar los grupos de ligamiento de la especie por medio de análisis comparativos. Asimismo, se realizaron estudios para determinar la utilidad de estos marcadores en otras especies del género y su aptitud para la realización de estudios de filogenia. Como material vegetal se emplearon los genotipos tetraploides de *P. notatum* Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico) y una población F₁, derivada de ambos. Además fueron incluidas 33 accesiones correspondientes a 11 especies y seis grupos taxonómicos diferentes. Marcadores EST-SSR de trigo y SSR genómicos de *P. notatum* fueron ensayados sobre los genotipos Q4188 y Q4117. Paralelamente se desarrollaron marcadores COS a partir de genes asociados a componentes de la apomixis en gramíneas. Los marcadores obtenidos fueron localizados en los mapas de Q4188 y Q4117 utilizando los programas de mapeo Mapmaker 3.0/exp y JoinMap 3.0. Cuarenta y cuatro y 66 nuevos marcadores fueron integrados a los mapas de Q4188 y Q4117, respectivamente. Los marcadores

incorporados extendieron las distancias genéticas cubiertas por ambos mapas y posibilitaron la identificación de nuevos grupos de ligamiento. Las secuencias de varios EST-SSR de *P. notatum* mostraron similitudes con los clones originales de trigo (de los cuales derivan) y confirmaron la identificación de secuencias ortólogas entre ambas especies. Paralelamente un análisis de mapeo *in silico* permitió determinar la localización de los marcadores empleados en los genomas de arroz y maíz. Los estudios comparativos detectaron varios segmentos cromosómicos conservados entre *P. notatum*, arroz y maíz. En especial, se determinó que 12 marcadores resultaron asociados a los grupos de ligamiento relacionados con la aposporía. Los marcadores *Ksum206dd* y *Ksum219bd* fueron localizados a ambos lados del *locus* responsable del carácter. La utilidad de los marcadores EST-SSR y SSR genómicos en otras especies del género y su capacidad para realizar estudios de filogenia fueron analizadas. Como control externo se utilizó trigo pan (*Triticum aestivum* L.) cv. Federal. Los marcadores EST-SSR generaron 166 fragmentos con un promedio de 6,16 fragmentos polimórficos por grupo. Los SSR genómicos produjeron 104 fragmentos totales con un promedio de 4,39 fragmentos polimórficos por grupo. Los análisis de agrupamiento permitieron discriminar entre grupos taxonómicos y especies dentro de cada grupo. Los resultados presentados en esta tesis demuestran la factibilidad de transferir marcadores EST-SSR y COS a *P. notatum* y contribuyen al conocimiento de la estructura genómica de las razas tetraploides de la especie. En particular, la identificación de secuencias ortólogas entre *P. notatum*, arroz y maíz permitió detectar varios segmentos cromosómicos conservados en las tres especies e iniciar estudios de mapeo comparativo. La localización de varios marcadores en los grupos de ligamiento asociados a la aposporía permitió una mejor caracterización de esta región genómica y la definición de un segmento del genoma de arroz que contendría genes candidatos a controladores del carácter. Se demostró asimismo la posibilidad de emplear estos marcadores en varias especies del género y su utilidad para la realización de estudios de filogenia.

Summary

Paspalum is a genus of the grass family with more than 300 species. Due to its taxonomic complexity, it has been divided in several subgenera and informal groups. Many *Paspalum* species consist of sexual-diploid and apomictic-polyploid cytotypes, and several have arisen through hybridization. Moreover, some members of the genus are important natural forages for tropical and subtropical regions of America. In particular, tetraploid race of *P. notatum* (bahiagrass) reproduces by aposporous apomixis. Apospory in the species is controlled by a single dominant locus with a distorted segregation ratio. Previous research reported the construction of a genetic linkage map for the species and the localization of the genomic region responsible for apospory (ASGR). The objectives of this study were *i*) to transfer molecular markers of known sequences (EST-SSR, genomic SSR and COS) to *P. notatum* and characterize the genome of the species by a comparative analysis, and *ii*) to determine the usefulness of these kind of markers for taxonomic studies in the genus *Paspalum*. As plant material the tetraploid genotypes Q4188 (sexual) and Q4117 (apomicts) and a F₁ mapping population derived from them were used. Moreover, 33 accessions belonging to 11 species and six informal taxonomic groups were included. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) was used as external control. Sequences of both wheat EST-SSR and *P. notatum* genomic SSR markers were retrieved from public databases. COS markers were developed from genes associated with components of apospory. All markers tested showed a high rate of transferability and a good level of polymorphism. Sequence of several EST-SSR markers isolated from *P. notatum* showed similarity with the corresponding wheat clones from which they derived, and thus, confirmed the identification of orthologous sequences between the two species. The localization of markers in the genetic maps of Q4188 and Q4117 extend the genetic coverage of both maps and allowed the recognition of several chromosome segments conserved between bahiagrass, wheat and rice. Two markers at both sides of the ASGR were identified. Assays of markers on *Paspalum* accessions confirmed they capability for detecting polymorphic *loci*. Moreover, markers specific of species and groups were detected. Clustering analysis was in agreement with previous reports. Results presented in this work proved the transferability of EST-SSR markers to *Paspalum* species and contribute to the genetic characterization of the *P. notatum* genome. Moreover, a new set of markers for phylogenetic analysis in the genus is presented.

I INTRODUCCIÓN

I- INTRODUCCIÓN

I.1- El género *Paspalum*

Paspalum es un género perteneciente a la familia de las Gramíneas (subfamilia *Panicoideas*, tribu *Paniceas*) que comprende alrededor de 330 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Zuloaga y Morrone, 2005). Varios de sus integrantes constituyen importantes recursos forrajeros para las regiones tropicales y subtropicales de América, donde se encuentran ampliamente distribuidos, siendo particularmente abundantes en Brasil, este de Bolivia, Paraguay y nordeste de Argentina (Burton, 1974). Existe una gran variación en los niveles de ploidía de las especies que lo componen que incluyen desde diploides (2x) hasta excepcionalmente decahexaploides (16x), como por ejemplo en *Paspalum floridanum* Michx. (Burton, 1940; Quarin y Lombardo, 1986). La poliploidía es una característica ampliamente difundida en el género. Se estima que aproximadamente el 80 % de las especies son poliploides y que aproximadamente la mitad de éstas son tetraploides (Quarin 1992). En general los diploides son de reproducción sexual y los poliploides sexuales o apomícticos (Quarin y Norrmann, 1987; Quarin, 1992). Es común que muchas especies tetraploides apomícticas presenten razas co-específicas diploides, autoincompatibles y de reproducción sexual (Quarin, 1992).

El gran número de especies que lo componen, la amplia distribución geográfica que presenta y las características en cuanto a calidad de forraje, palatabilidad y producción de materia seca, hacen del género *Paspalum* uno de los más importantes y promisorios para el desarrollo de cultivares forrajeros adaptados a las regiones cálidas y templadas de América. Sin embargo, hasta el presente sólo unas pocas especies han sido domesticadas y cultivadas en forma extensiva. Se dispone de cultivares de *P. guenoarum* Arechav. en Paraguay, *P. plicatulum* Michx. en Australia, *P. notatum* Flügge en Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) y recientemente de *P. atratum* Swallen en EEUU, Argentina y Tailandia (Quarin CL, comunicación personal). Existe una enorme variación genética aún inexplorada en este grupo de especies que puede aprovecharse para el mejoramiento y la obtención de nuevos cultivares forrajeros. Varias especies del género presentan un gran potencial agronómico que podría ser utilizado a partir del conocimiento sobre los niveles de ploidía, modo/s de reproducción y características agronómicas. La utilización de estas especies permitiría mejorar la calidad y oferta forrajera de los campos naturales y contribuir a la producción agropecuaria de las áreas subtropicales que han sido consideradas como marginales para la actividad ganadera hasta hace relativamente poco tiempo.

Debido al elevado número y a la alta variabilidad de las especies que lo componen, el género ha sido dividido en subgéneros y varios grupos informales sobre la base de caracteres morfológicos, principalmente de las inflorescencias y de las espiguillas (Zuloaga y Morrone, 2005). Las características sobresalientes de los grupos taxonómicos correspondientes a Sudamérica fueron recientemente compiladas por Zuloaga y Morrone (2005) y publicadas como Monografía de Botánica Sistemática del Missouri Botanical Garden. Brevemente, se describen a continuación las características principales de los grupos a los cuales pertenecen las especies utilizadas en este trabajo de tesis:

Grupo Dilatata: compuesto por plantas perennes, cespitosas a estoloníferas, inflorescencias con pocos a numerosos racimos con espiguillas en pares y pilosas, con los márgenes ciliados, plano-convexas. La gluma superior y lemma inferior presentan entre 3-5-nervaduras, antecio superior endurecido, pajizo. Comprende 4 especies que son frecuentemente encontradas en praderas templadas de América del Sur. Entre las especies del grupo se encuentran *P. dilatatum* Poit. y *P. urvillei* Steud. que fueron introducidas en América del Norte (Zuloaga y Morrone, 2005).

Grupo Livida: este grupo incluye a plantas perennes, con cañas usualmente comprimidas, erectas a decumbentes y multinodes. Las inflorescencias presentan pocos a numerosos racimos, espiguillas en pares, lisas a escabrosas, antecio superior pajizo, papiloso. Con aproximadamente nueve especies entre las que se encuentra *P. alcalinum* Mez (Zuloaga y Morrone, 2005).

Grupo Plicatula: compuesto por plantas perennes o anuales, terrestres o palustres, inflorescencias usualmente con numerosos racimos, rígidos, espiguillas marcadamente plano-convexas, antecio superior castaño-oscuro. Habitan en América del Sur Austral 16 especies. Las especies de este grupo son fácilmente reconocibles por las características morfológicas de la espiguilla; sin embargo la delimitación de los taxones se dificulta por la marcada variabilidad de los caracteres vegetativos y reproductivos. Se han propuesto numerosas variedades y especies pertenecientes a este grupo, particularmente en Sudamérica, y es necesario un estudio integral del grupo para dilucidar las relaciones entre taxones (Zuloaga y Morrone, 2005). Entre las especies del grupo se pueden nombrar: *P. atratum*, *P. lenticulare*, *P. limbatum* Henrard, *P. guenoarum* y *P. nicorae* Parodi.

Grupo Decumbentes: en este grupo se incluyen a plantas perennes, con inflorescencias terminales y axiales con 1 a varios racimos, gluma inferior dimorfa en el par de espiguillas, espiguillas pilosas o glabras, en pares, plano-convexas, antecio superior endurecido. Incluye un total de 21 especies, ocho en Sudamérica austral entre las que se encuentra *P. unispicatum* (Scribn. & Merr.) Nask utilizada en este trabajo. De acuerdo a Zuloaga y Morrone (2005) este grupo posiblemente sea reconocido en un futuro cercano a nivel de subgénero. Se distingue por la presencia de gluma inferior dimorfa en el par de espiguillas y por tener inflorescencias terminales y axiales (Zuloaga y Morrone, 2005).

Grupo Notata: el grupo incluye plantas perennes, cespitosas a largamente rizomatosas, inflorescencias terminales formadas por dos racimos conjugados, raquis de los racimos triquetro, glabro, espiguillas solitarias, plano-convexas, pilosas o glabras, gluma superior y lemma inferior 5-7-nervias, antecio superior endurecido, glabro. Abarca un total de 21 especies (Zuloaga y Morrone, 2005). Se incluye en este grupo la especie *P. notatum* (utilizada en este trabajo) que es una de las especies del género más utilizadas como forrajera.

Grupo Anachyris: presenta plantas perennes aunque raramente se encuentran también especies anuales (*P. costellatum* Swallen). Son cespitosas y menos frecuente estoloníferas como en *P. procurrens* Quarin, con espiguillas naviculares, gluma inferior y superior ausentes, ocasionalmente presentes en *P. volcanensis* Zuloaga, Morrone & S.S. Denham y *P. usteri* Hack., lemma inferior y superior con nervios notorios. Incluye un total de seis especies de distribución restringida a América del Sur, llegando *P. malacophyllum* Trin. hasta México (Zuloaga y Morrone, 2005). *Paspalum simplex* Moroug es la especie de este grupo que se estudia en este trabajo.

I.1.1- *Paspalum notatum* (pasto horqueta, “bahiagrass”)

En particular *Paspalum notatum* Flügge, de nombre vulgar pasto horqueta o “bahiagrass” (en inglés), es una especie rizomatosa perenne distribuida desde México a Argentina que presenta varios niveles de ploidía y un sistema reproductivo complejo con citotipos diploides autoincompatibles de reproducción sexual y poliploides (3x, 4x, 5x) con reproducción apomíctica,seudógamos y autocompatibles (Quarin, 1992; Tischler y Burson, 1995) (Figura 1). Aproximadamente el 98 % de los poliploides son tetraploides, siendo los triploides y pentaploides excepcionales (Tischler y Burson, 1995; Pozzobon y Valls, 1997). La forma natural de reproducción más frecuente de las razas poliploides de la especie es la apomixis gametofítica de tipo apospórica (ver I.2.3.).

Figura 1: *Paspalum notatum*, fotografía de la accesión Q4117



I.1.1.1- Distribución, adaptación y centro de origen de *P. notatum*

Las razas tetraploides de *P. notatum* se distribuyen en tierras abiertas, sabanas y pasturas hasta 2000 metros sobre el nivel del mar desde México central hasta el centro de Argentina (Chase, 1929). El pasto horqueta es uno de los principales constituyentes de los campos naturales de las regiones tropicales y subtropicales del sur de Brasil, Paraguay, noreste de Argentina y Uruguay. Asimismo, la especie ha sido introducida en Estados Unidos y otros países alrededor del mundo (Gates et al., 2004). La forma diploide (*P. notatum* var. *saurae* Parodi), variedad botánica conocida como “*Pensacola bahiagrass*” (en EEUU), es nativa de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay en el área central de Argentina (Burton, 1967). Las poblaciones naturales de este citotipo son poco frecuentes y están restringidas a los suelos sueltos sobre los márgenes de los ríos Uruguay, Paraná y sus afluentes en las planicies de las islas del río Paraná (Burton, 1967). Luego de ser introducida accidentalmente a principios del siglo XX en Florida, es hoy una de las forrajeras cultivadas más importantes de los estados del Golfo de México en el sur de los Estados Unidos (Gates et al., 2004). La búsqueda del centro de origen de “*Pensacola bahiagrass*” condujo al Prof. G. Burton a descubrir una gran población natural del citotipo diploide en la isla Berduc, en la Provincia de Santa Fe (Burton, 1967). Otra gran población, con una gran variación genética, fue encontrada en Cayastá, a aproximadamente 70 Km al noreste de Santa Fe, alrededor de las ruinas del sitio donde la ciudad fue fundada originalmente. Como los biotipos diploides de *P. notatum* var. *saurae* son nativos de esta región y debido a que los estudios citogenéticos sugieren que las razas tetraploides fueron originadas por autoploidización ya que comparten juegos de cromosomas homólogos con los diploides, la región es considerada el centro de origen de la especie (Forbes y Burton, 1961; Gates et al., 2004).

Gran parte de los estudios realizados en esta tesis fueron conducidos en dos genotipos tetraploides de *P. notatum* (Q4188 y Q4117) y una población segregante obtenida a partir del cruzamiento entre ellos. Ambos genotipos parentales y su progenie fueron previamente utilizados en diversos estudios sobre el modo de reproducción, las características genéticas de las razas tetraploides, el mapeo genético y estudios de variabilidad (ver más adelante).

I.2- Apomixis

I.2.1- Definición del término apomixis

La apomixis es un modo de reproducción asexual, por semillas, que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler, 1984). El término apomixis deriva del griego “*apo*” que significa falta o ausencia y “*mixis*” que significa unión o mezcla. En este sentido la palabra apomixis hace referencia a la falta de unión de las gametas femeninas y masculinas que se produce en la reproducción sexual. El carácter fue descrito por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* (Js. Sm.) Müll. Arg. por J. Smith cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica (llevado a los Kew Gardens de Richmond cerca de Londres desde Asia), que se encontraba creciendo en forma aislada, floreció y produjo semillas en abundancia. Este hecho puso al carácter en evidencia y permitió el estudio de este tipo particular de reproducción (Savidan, 2000). Paradójicamente, los primeros experimentos con plantas apomícticas fueron realizados en forma involuntaria por Gregor Mendel, quien estudió cruces entre especies del género *Hieracium* a fin de confirmar los resultados obtenidos en sus trabajos de herencia en la arveja de jardín (*Pisum sp.*). Mendel describió la curiosa situación que en sus experimentos con *Hieracium* obtenía progenies F₁ segregantes (no uniformes) y numerosas F₂ no

segregantes (uniformes). Atribuyó erróneamente la falta de segregación observada en estas poblaciones a una “frecuente autopolinización” (tomado de Savidan, 2000). Actualmente es conocido que muchas especies de este género (*Hieracium*) se reproducen por apomixis de tipo apospórica (Asker y Jerling, 1992).

La apomixis ha sido observada en al menos 400 especies de plantas que abarcan 35 familias diferentes, siendo frecuentemente encontrada en *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* y *Rutaceae* (Hanna y Bashaw, 1987). Debido a los distintos tipos de apomixis que han sido descritos, se postula que el carácter debe haber surgido varias veces en forma independiente durante la evolución de las angiospermas (Koltunow y Grossniklaus, 2003). Se considera que este tipo de reproducción ha evolucionado como un sistema alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de desarrollo del ovario (Carman, 1997; Grimanelli et al., 2001). Carman (1997) propuso que la apomixis surgió como consecuencia de la desregulación en el tiempo y espacio de la expresión de genes relacionados con la sexualidad como consecuencia de una expresión heterocrónica causada por la hibridación. Esta hipótesis fue confirmada experimentalmente por observaciones citológicas en *Tripsacum* (Grimanelli et al., 2001) y recientemente por análisis transcriptómicos globales en *Boechea* (Sharbel et al., 2009 y 2010). Si la apomixis efectivamente resulta en una alteración del proceso sexual, sería en teoría posible desarrollar sistemas apomícticos experimentales a partir de especies sexuales como *Arabidopsis* (Chaudhury y Peacock, 1993). Esta línea de investigación ha llevado a la identificación de numerosos genes asociados a fenotipos mutantes que reproducen algunos de los componentes de la apomixis. Los mismos están relacionados a determinantes de la célula madre de la megáspora, la meiosis y la selección de la megáspora funcional y al desarrollo del embrión y el endosperma (revisado en Pupilli y Barcaccia, 2011). Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de conocimientos que se ha generado en los últimos años, no ha sido posible aún recrear completamente el fenotipo apomíctico en especies de reproducción sexual. Es por esto que el estudio de la apomixis en los sistemas apomícticos naturales es de gran importancia y puede contribuir no solo a la identificación del/los gene/s responsables del carácter sino a validar los genes candidatos que se detecten en especies sexuales.

I.2.2- La reproducción apomíctica y sus diferentes formas

La apomixis elude la ruta sexual de las angiospermas evitando la reducción meiótica durante la formación de las gametas y la fecundación (*mixis*) de la célula huevo para la formación del embrión. Como consecuencia de esto las progenies que se originan por este tipo de reproducción resultan genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler 1984). Nogler (1984) dividió a la apomixis en dos mecanismos distintos de acuerdo al origen de los embriones asexuales: la ruta esporofítica y la ruta gametofítica.

En la ruta esporofítica, también llamada **embrionía adventicia**, los embriones se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo (Lakshmanan y Ambegaokar, 1984; Koltunow et al., 1995). Comúnmente se forman embriones múltiples (esporofíticos) que comparten el ovario junto con el embrión de origen sexual y que utilizan su endosperma para desarrollarse (Figura 2). Las células nucelares destinadas a formar embriones son morfológicamente distinguibles de las otras células normales por tener un núcleo grande y un citoplasma denso. Se desconocen los mecanismos fisiológicos y el momento en el cual se determina el destino de estas células para que se transformen en iniciales embrionarias (Koltunow, 1993). Las células nucelares iniciales son similares a la ovocélula en cuanto al potencial de desarrollo pero no están contenidas en una estructura de megagametofito, sino que están adyacentes a un saco embrionario meiótico (de tipo sexual) y rodeadas por otras células nucleares. Entre las especies de importancia económica que presentan este tipo de apomixis se encuentran los cítricos, los cuales representan un sistema modelo para estudiar el proceso, el mango (*Mangifera indica* L.) y las orquídeas (Naumova, 1992; Koltunow, 1993).

En la **apomixis gametofítica**, se forma un saco embrionario en el cual todos los núcleos celulares que lo componen son no reducidos ($2n$). De acuerdo con el origen de la célula que genera al saco embrionario y el embrión, la apomixis gametofítica se subdivide en dos grupos: *diplosporía* y *aposporía*. Ambos procesos son designados con el término *apomeiosis*, haciendo referencia a la formación de gametas femeninas no reducidas (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). En ambos casos, una célula del saco embrionario $2n$ actúa como célula huevo y desarrolla un embrión por partenogénesis. Así, la ausencia de reducción meiótica se complementa con la partenogénesis. Sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de los núcleos polares. Aunque en

algunos casos el endosperma puede desarrollarse en forma autónoma, fundamentalmente en especies de la familia *Asteraceae*, en muchas especies (la mayoría de las gramíneas tropicales como *Panicum*, *Pennisetum*, *Tripsacum* o *Paspalum*), es necesario que una gameta masculina se fusione con el/los núcleos polares de la célula central para formar el endosperma. Este proceso es conocido como seudogamia (Asker y Jerling, 1992). La falla en el desarrollo del endosperma es una de las causas más frecuentes de la imposibilidad de formación de semillas en las especies apomícticas (Quarin, 1999).

a) **Diplosporía:** en este tipo de apomixis gametofítica, los sacos embrionarios se generan a partir de la célula madre de la megáspora directamente por mitosis (tipo *Antennaria*) o luego de una falla en la meiosis (tipo *Taraxacum*). Los sacos embrionarios diplospóricos conservan la estructura típica de los sacos de origen meiótico (tipo *Polygonum*), generalmente con siete células y ocho núcleos (Savidan, 2000). En la diplosporía mitótica (tipo *Antennaria*), forma más ampliamente difundida, la célula madre de la megáspora no inicia la meiosis, sino que después de una larga interfase se produce un crecimiento celular acompañado por una profunda vacuolización, seguido de tres mitosis sucesivas que dan origen a un saco embrionario maduro compuesto por ocho núcleos (todos no reducidos) (Nogler, 1984) (Figura 2). En la diplosporía meiótica de tipo *Taraxacum*, la célula madre de las megáspora inicia la profase meiótica, pero a consecuencia de una *asinapsis* parcial o total, la mayoría o la totalidad de los cromosomas permanecen sin aparearse en forma de univalentes. Estos univalentes no migran hacia los polos. Por el contrario, restituyen el núcleo (núcleo de restitución) en el centro celular y luego, uniéndose a las fibras del huso se separan en sus cromátidas dando origen a dos núcleos no reducidos. La posterior citocinesis origina una díada de megásporas, no reducidas. Generalmente, en la célula del extremo chalazal de la díada, se producen tres mitosis consecutivas para formar un saco embrionario octonucleado (Figura 2) (Nogler, 1984). Existen descriptos otros dos tipos de diplosporía meiótica, tipo *Ixeris* y tipo *Allium*, pero son mucho menos frecuentes que el tipo *Taraxacum* (Nogler, 1984; Savidan, 2000). En las plantas diplospóricas el proceso sexual se ve completamente comprometido ya que es la misma célula madre de la megáspora la que sufre las modificaciones descriptas. Sin embargo, existen individuos diplospóricos facultativos en los cuales algunos óvulos siguen la ruta sexual y otros la diplospórica. Observaciones de mutantes, poco frecuentes, con algunos de los componentes de la diplosporía en especies sexuales, sugiere que esta vía no es

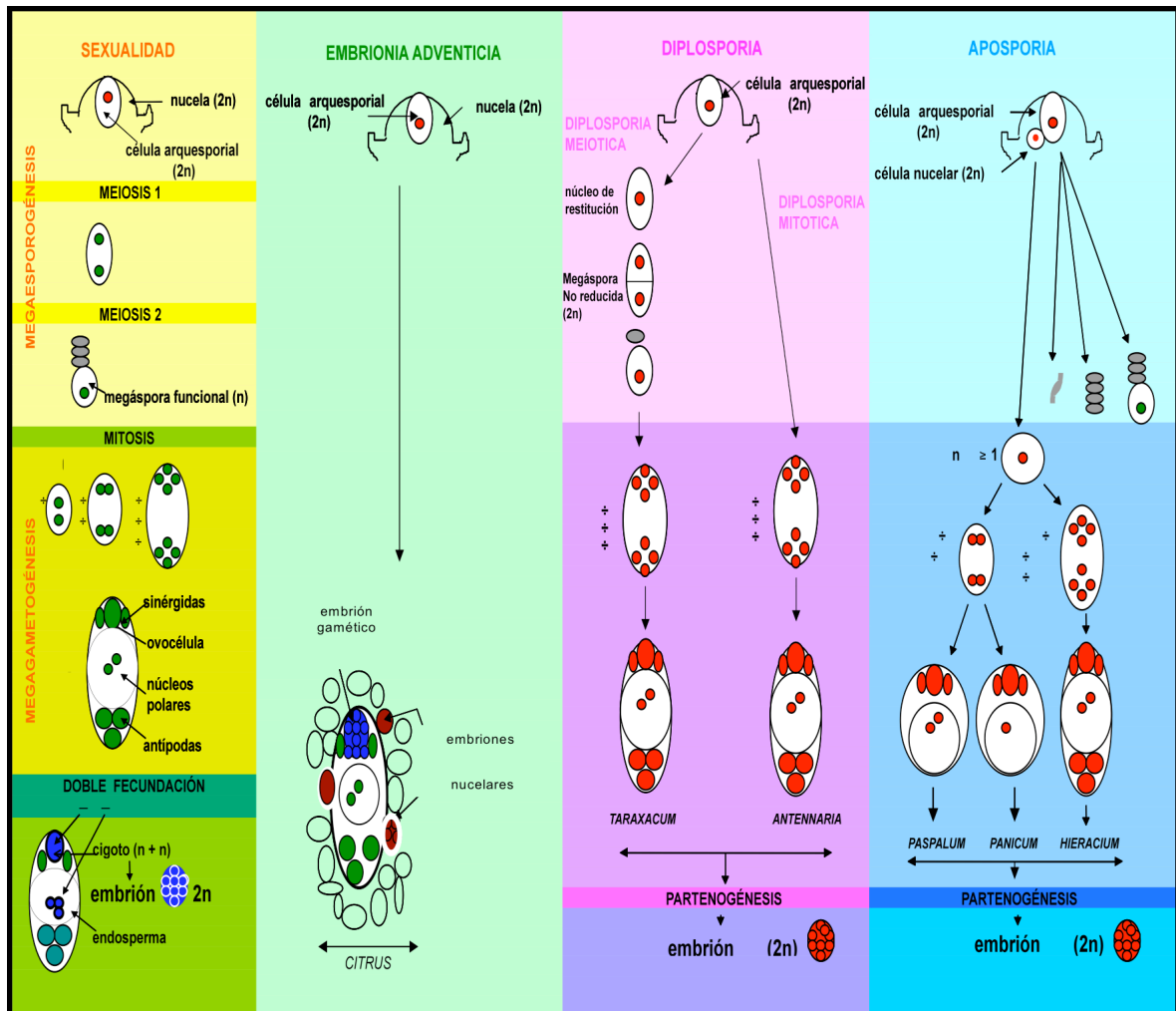
completamente independiente de la vía sexual y que los genes que controlan la misma pueden estar alterados a nivel regulatorio (Ozias-Akins y van Dijk, 2007).

b) **Aposporía:** en la apomixis de tipo apospórica los sacos embrionarios no reducidos son generados por mitosis a partir de células somáticas del óvulo, generalmente provenientes de la nucela (Figura 2). Los sacos embrionarios apospóricos tienen una constitución distinta y muy variable tanto entre taxones como así también en algunos casos dentro de un mismo taxón. Es posible encontrar distintas morfologías: tipo *Hieracium* (Rosenberg, 1908 y 1930), tipo *Panicum* (Warmke, 1954), además de algunas variantes típicas del género *Paspalum* (Quarin y Burson, 1991). Las células nucelares iniciales de la aposporía (AI) poseen un núcleo grande y un citoplasma denso al igual que las células que se diferencian como células arquesporales. A diferencia de la diplosporía, en los óvulos de las plantas que presentan aposporía pueden coexistir el proceso sexual y el apomítico al mismo tiempo. Observaciones citológicas de diferentes especies apospóricas mostraron que las AI pueden diferenciarse de la nucela próxima a las células arquesporales en cualquier estadio de la megasporogénesis o megagametogénesis. Cuanto más temprano ocurre esta diferenciación, es más probable que el proceso sexual sea inhibido (Nogler, 1984). El desarrollo de los sacos embrionarios apospóricos es más rápido que el de los sexuales posiblemente por evitar la división meiótica. En general, el desarrollo de los sacos embrionarios meióticos queda detenido en el estadio de célula arquesporial o en el de megáspora y los productos del proceso sexual degeneran (Koltunow, 1993). En la aposporía tipo *Hieracium*, la formación del saco se produce después de tres divisiones mitóticas, originándose ocho núcleos que se distribuyen hacia ambos polos, conformando una estructura similar a los sacos embrionarios de tipo *Polygonum* de las especies sexuales. La diferencia con este último reside en que cada núcleo no está reducido (Figura 2). Los sacos embrionarios tipo *Panicum* se forman a partir de células de la nucela del óvulo, mediante dos mitosis consecutivas, dando origen a solo cuatro núcleos, los cuales se distribuyen hacia un solo polo. Los sacos están constituidos por dos sinérgidas, la ovocélula y una célula central con un solo núcleo polar, careciendo de antípodas (Figura 2). La apomixis apospórica está ampliamente distribuida entre las Gramíneas. Muchas gramíneas tropicales y subtropicales poseen el tipo *Panicum* de desarrollo de saco embrionario; mientras otras tantas de clima templado poseen sacos embrionarios del tipo *Hieracium* (Savidan, 2000). En las especies apospóricas del género *Paspalum* los sacos son similares a los de

tipo *Panicum* pero tienen una célula central con dos y a veces tres núcleos polares (Quarin CL, comunicación personal).

La apomixis gametofítica ha sido más profundamente estudiada que la apomixis esporofítica, principalmente por ser el tipo presente en las gramíneas, donde muchas especies de valor agronómico presentan este modo de reproducción. Aunque durante los últimos años ha habido un gran progreso en la descripción y entendimiento de las bases moleculares de la apomixis, los genes disparadores del carácter no han sido aún identificados. Una de las teorías sobre el origen de este tipo de reproducción, basada en datos genéticos, sugiere que las especies apomícticas derivan de antecesores sexuales que sufrieron un número limitado de mutaciones en la vía del desarrollo del gametofito femenino (revisado en Nogler, 1984; Koltunow, 1993; Grimanelli et al., 2001; Grossniklaus et al., 2001). En la reproducción sexual, la meiosis está activamente regulada en determinados puntos de control cuya función es asegurar que los eventos futuros no sucedan antes que los previos hayan sido completados satisfactoriamente. Una de las hipótesis supone que la diplosporía induce una salida heterocrónica de la meiosis afectando el desarrollo normal de la esporogénesis. Sin embargo, las funciones básicas requeridas para la misma *per se* (el potencial para la meiosis femenina) permanecerían inalteradas (Grimanelli et al., 2003). Así, en la diplosporía la progresión en la formación de la espora, la célula huevo y el embrión sufre alteraciones respecto a la vía sexual, posiblemente debido a una falla en los puntos de control. Por el contrario, en las plantas apospóricas son las células somáticas de la nucela las que se diferencian a espora (sin pasar por una meiosis) y sufren los procesos post-meióticos de gametogénesis. Esto implica que la primera consecuencia de la aposporía es un cambio en el destino celular de algunas células del tejido nucelar. Consecuentemente se propone que la aposporía y la diplosporía se basan en mecanismos diferentes (Grossniklaus et al., 2001). Se puede considerar que ambas imitan las diferencias observadas entre mutantes heterocrónicos y homeóticos: en la diplosporía se altera el destino celular dentro de dominios temporales (es heterocrónica) mientras que en la aposporía se cambia el destino celular dentro de dominios espaciales (similar a lo que ocurre en los mutantes homeóticos) (Grimanelli et al., 2003). En el otro extremo, se considera a la partenogénesis como una consecuencia pleiotrópica de la apomeiosis (Nogler, 1984; Grossniklaus et al., 2001).

Figura 2: Representación esquemática de diferentes tipos de apomixis y su comparación con el proceso sexual.



Esquema mostrando una comparación de los modos de reproducción sexual y apomítico. Dentro de la apomixis se distinguen la ruta esporfítica (embrionía adventicia) y la ruta gametofítica (diplosporia y aposporia). ±: indica número de divisiones mitóticas. Tomado de Stein J, Tesis Doctoral (2006), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

I.2.2.1- Rasgos distintivos del carácter apomixis y complejos agámicos

En general se considera que la apomixis no afecta la formación del microgametofito y que la meiosis ocurre normalmente en las anteras generando granos de polen viables portadores de gametas reducidas (Nogler, 1984). Debido a esto el carácter apomixis puede ser transmitido por el polen (Savidan, 2000). Sin embargo, se han observado irregularidades meióticas (cromosomas retrasados, puentes de cromatina y micronucleos) en la microesporogénesis de varias especies de gramíneas apomíticas como *Brachiaria decumbens* Stapf. (Naumova et al., 1999), *Paspalum notatum* (Stein et al., 2004) y *Pennisetum squamulatum* Fresen. (Roche et al., 2001).

La apomixis y la sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes ya que en el caso de la aposporía pueden aparecer simultáneamente sacos meióticos y apospóricos en una misma planta, en una misma inflorescencia y aún en un mismo óvulo (Harlan et al., 1964). Como criterio general se considera como apomíctico a cualquier individuo que tenga la capacidad de generar progenies por apomixis (independientemente del grado de expresión del carácter). Así, una planta apomíctica capaz de generar al menos una parte de su progenie por medios sexuales se conoce como apomíctica facultativa. Las progenies de los genotipos apomícticos facultativos pueden segregarse como clases maternas ($2n + 0$), derivadas de apomixis y aberrantes o fuera de tipo ($n + n$) que provienen de reproducción sexual (Asker y Jerling, 1992). Dentro de los individuos aberrantes pueden encontrarse: 1) híbridos BII ($n + n$) que resultan de la unión de dos gametas reducidas, 2) híbridos BIII ($2n + n$) que se originan por la fecundación de una ovocélula no reducida por una gameta masculina reducida y 3) haploides ($n + 0$) generados por partenogénesis a partir de la ovocélula reducida (Savidan, 2000). La apomixis es considerada obligada cuando el 100 % de las progenies posee un origen materno.

La apomixis gametofítica está fuertemente asociada a la poliploidía. La mayoría de las especies con este tipo de reproducción son poliploides (Asker y Jerling, 1992). Sin embargo, existen especies en las que se ha demostrado la expresión del carácter apomixis al nivel diploide, aunque en baja frecuencia, como *Boechera holboellii* (Hornem.) Á. Löve & D. Löve (apomixis diplospórica tipo *Taraxacum*) (Kantama et al., 2007) y *Paspalum rufum* Ness ex Steud. (apomixis apospórica de tipo *Paspalum*) (Siena et al., 2008). Estos antecedentes aportan evidencias a la hipótesis de que la expresión del carácter derivaría de la desregulación de genes comunes a la sexualidad, ya que el carácter estaría presente al nivel diploide (aunque con una expresión marginal) y solo se haría evidente al nivel poliploide como consecuencia de la desregulación de la vía sexual normal. Esta capacidad de reproducción apomíctica residual presente en los diploides, fundamenta la formación recurrente de nuevos tetraploides apomícticos en *P. rufum* (Siena et al., 2008).

1.2.3- La apomixis en *Paspalum*

El carácter apomixis está muy difundido en el género *Paspalum* y está presente

en un importante número de especies de interés agronómico. La mayoría de ellas son apospóricas, debido a que la diplosporía es infrecuente en el género (Bonilla y Quarín, 1997). En general los diploides presentan sacos embrionarios meióticos de tipo *Polygonum* produciendo exclusivamente un saco por óvulo. Las razas tetraploides presentan sacos embrionarios apospóricos, de estructura globular, conteniendo una ovocélula acompañada por una o dos sinérgidas y una célula central binucleada (Martínez et al., 2001). Esta última característica es importante porque debido a la pseudogamia, la relación genómica materna/paterna de las células del endosperma en las semillas apomícticas es 4/1 (madre $2n \times 2 +$ padre n). Los nucleolos en la célula central tienen un volumen que supera en dos veces o más al volumen del nucleolo de la ovocélula (Quarín y Burson, 1991). La célula central está constituida en un 70 u 80 % por espacio vacuolar. La característica más notable de estos sacos es la ausencia de antípodas (Norrman et al., 1989). En las plantas apomícticas se pueden distinguir cuatro tipos de óvulos: a) con un saco meiótico, b) con un saco meiótico y uno apospórico (sacos mixtos), c) con sacos apospóricos únicamente y d) con saco embrionario abortado (sin desarrollo).

Si bien está establecido que la apomixis está genéticamente controlada y asociada a la poliploidía, la presencia de sacos apospóricos en óvulos de citotipos diploides de *Paspalum cromyorrhizon* Trin. ex Döll, *Paspalum equitans* Mez, *Paspalum intermedium* Munro ex Morgan & Brittan, *Paspalum quadrifarium* Lam., *Paspalum haumanii* Parodi, *Paspalum brunneum* Mez y *Paspalum notatum* (Quarín, 1986; Quarín y Norrman, 1987; Norrman et al., 1989; Quarín et al., 2001), indican que el carácter estaría presente a nivel diploide en varias especies del género además de lo demostrado en *P. rufum* (Siena et al., 2008), aunque con una expresión muy reducida o completamente reprimida. Esta dependencia de la poliploidía puede involucrar alternativamente: a) efectos de dosaje que actúan sobre un *locus* secundario que requeriría una dosis mayor del alelo para regular la expresión del *locus* que gobierna el carácter (Quarín et al., 2001) o b) efectos epigenéticos que afecten la región genómica responsable de la aposporía u otra que controla su expresión (Pessino SC y Ortiz JPA, comunicación personal). Hasta el momento ambas hipótesis deben ser demostradas.

Trabajos realizados durante los últimos 10 años en *P. notatum* han determinado que la aposporía en la especie está controlada por un *locus* único, con segregación distorsionada posiblemente debido a un efecto pleiotrópico o al ligamiento parcial con un factor letal asociado de las gametas que transfieren el carácter (Martínez et al.,

2001). Asimismo se han identificado numerosos marcadores moleculares ligados al carácter (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004). Los mismos sugieren que el *locus* responsable de la aposporía se encuentra localizado en una región genómica que presenta restricción de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004). Al menos 20 marcadores moleculares completamente ligados al carácter fueron identificados en la especie (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004; Pupilli et al., 2004; Stein et al., 2007; Rebozzio et al., 2010). Los mismos definen un bloque de ligamiento que contiene la región genómica responsable de la aposporía. El mismo correspondería a un segmento cromosómico de aproximadamente 36 Mbp, *synténico* a segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz (Pupilli et al., 2004). Este bloque génico aparece conservado en ecotipos de una amplia distribución geográfica (Rebozzio et al., 2010). En coincidencia con otras especies, se ha determinado que esta región contiene sectores de copia única, así como también gran cantidad de elementos repetitivos (Akiyama et al., 2004; Calderini et al., 2006; Podio et al., 2012). La región está abundantemente metilada en genotipos apomícticos y sexuales, aunque secuencias específicas se hallan desmetiladas en el genotipo apomíctico (Rodríguez et al., 2012). Estas características indican que los genes responsables del carácter podrían estar organizados en forma de *linkat*, es decir asociados por función y aislados por recombinación.

I.3- Marcadores Genéticos

I.3.1- Características generales de los marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son características heredables que permiten establecer diferencias (polimorfismos) entre individuos (genotipos) de la misma especie (o especies emparentadas), cuya herencia responde a las leyes de Mendel y que pueden utilizarse como puntos de referencia en el genoma (Brown, 2000). El concepto de marcador genético surge con los propios trabajos de Gregor Mendel quién utilizó los colores de las flores y otros caracteres morfológicos para estudiar los patrones de la herencia. Los marcadores genéticos deben existir en 2 o más formas alélicas fácilmente distinguibles, de manera que los genotipos de una progenie puedan ser claramente identificados. Los marcadores morfológicos (por ejemplo, color de flor, largo de tallos) y bioquímicos (perfiles electroforéticos de isoenzimas y de proteínas de reserva) se detectan a través del producto de los genes que los controlan. Si bien estos marcadores son relativamente fáciles de evaluar, tienen la desventaja de ser reducidos en número, estar generalmente influenciados por el ambiente, no permitir una buena cobertura del genoma, presentar bajo nivel de polimorfismo entre individuos y ser dependientes del estado de desarrollo (Phillips y Vasil, 1996). Otra limitación importante es la imposibilidad de concentrar un grupo grande de marcadores en un mismo fondo

genético, debido a los efectos negativos sobre el fenotipo que causan muchos de ellos. Esto lleva a que no sea posible evaluar muchas características simultáneamente en la misma población segregante.

I.3.2- Marcadores moleculares

A partir de la década del 80' y conjuntamente con el desarrollo de técnicas de ADN recombinante se desarrollaron los marcadores moleculares (Young, 1994). Este tipo de marcadores se detectan directamente al nivel del ADN y pueden corresponder a secuencias codificantes o no codificantes. Estas técnicas de estudio de los genomas se han desarrollado enormemente y han posibilitado la identificación de genes y la construcción de mapas de ligamiento genético en un gran número de especies. Durante las últimas décadas, las estrategias clásicas para la evaluación de la diversidad genética, tales como anatomía comparativa, morfología, embriología y fisiología han sido enormemente complementadas por técnicas moleculares (Weising et al., 2005). Estas tecnologías han catalizado la investigación en una variedad de disciplinas tales como la taxonomía, ecología, filogenia y el mejoramiento en plantas y animales (Weising et al., 2005).

A partir del desarrollo de los marcadores de RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y la construcción de un mapa de ligamiento genético en humanos a principios de la década del 80' (Botstein et al., 1980) se han desarrollado numerosas técnicas de generación de marcadores. Las mismas se basan en: *i*) restricción del ADN + hibridación (ej. RFLP, Botstein et al., 1980), *ii*) amplificación por PCR de secuencias al azar (ej. RAPD (polimorfismo por la amplificación al azar de ADN), Williams et al., 1990; Welsh y McClelland, 1990) o de fragmentos específicos (ej. SSR (Secuencias simples repetidas)), *iii*) restricción del ADN y amplificación por PCR (por ejemplo; AFLP (polimorfismos en el largo de los fragmentos de amplificación) (Vos et al., 1995), *iv*) conformación de ADN de cadena simple en electroforesis parcialmente desnaturalizantes (ej. SSCP) (Orita et al., 1989), *v*) amplificación de sitios-específicos del genoma (STS Sequence-Tagged Sites) (Olson et al., 1989) y *vi*) identificación de variaciones de nucleótidos simples (SNPs) (Rafalski, 2002).

Entre las principales propiedades esperadas para un determinado tipo de marcador molecular se pueden citar: que presenten elevado nivel de polimorfismo, que muestren un patrón de herencia codominante (la cual permite la discriminación de los estados homo y heterocigotos), que posibiliten la asignación no ambigua de alelos, que presenten una distribución uniforme en el genoma, que posean un comportamiento selectivo neutral (es decir, sin efectos pleiotrópicos), que puedan obtenerse fácilmente y sean aptos para la automatización, que presenten una elevada reproducibilidad y un fácil intercambio entre laboratorios y que requieran bajos costos de desarrollo y aplicación (Awise, 1994; Bachmann, 1997). Lamentablemente, un único tipo de marcador no reúne todas las condiciones mencionadas simultáneamente. Sin embargo, es posible elegir entre una variedad de sistemas de marcadores cada uno de los cuales combina algunas de ellas (Weising et al., 2005).

I.3.2.1.-Marcadores moleculares basados en PCR

A pesar de que los métodos más tradicionales para generar marcadores moleculares, tal como el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), son aún utilizados en algunos laboratorios debido a su confiabilidad, actualmente este tipo de marcadores ha sido reemplazado por los métodos más simples basados en la tecnología de PCR (Weising et al., 2005). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988; Mullis et al., 1994) revolucionó la biología molecular. La tecnología de PCR tiene la habilidad de generar un gran número de marcadores en cortos periodos de tiempo a partir de bajas cantidades de ADN (del orden de nanogramos). Más aún, los marcadores generados por PCR son posibles de automatizar, lo cual es un requisito importante para su aplicación en programas de mejoramiento (Weising et al., 2005). Entre los tipos más utilizados de marcadores basados en PCR se pueden citar: RAPD (Williams et al., 1990) y SSR (Weising et al., 1998).

I.3.2.1.1-Marcadores SSR

Los microsatélites, también conocidos como secuencias simples repetidas (SSR, sigla derivada de la expresión en inglés: *Single Sequence Repeats*), consisten en

motivos cortos (1-5 pb) de secuencias de ADN repetidas en tándem. Estos marcadores son frecuentemente polimórficos debido al número variable de repeticiones del motivo SSR. Los microsatélites son componentes de todo genoma eucariota, y fueron también hallados en procariotas (Field y Wills, 1996; Van Belkum et al., 1998; Gur-Arie et al., 2000). Numerosas estrategias de marcadores moleculares se han desarrollado explotando la variación de microsatélites y sus vecindades cercanas (Powell et al., 1996; Weising et al., 1998). Entre las más empleadas se utiliza la información de secuencias de regiones flanqueantes a las repeticiones para diseñar pares de cebadores *locus*-específicos útiles para la amplificación del microsatélite por PCR (Weising et al., 2005). La exitosa amplificación por PCR de regiones polimórficas de ADN repetitivos en tándem se demostró primero para minisatélites, los cuales consisten de unidades repetitivas de entre 15 y 50 pb (Jeffreys et al., 1988; Horn et al., 1989). En 1989, cuatro grupos independientes aplicaron un método para repeticiones más cortas del tipo (CA)*n* para detectar variaciones en humanos (Litt y Luty, 1989; Smeets et al., 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Litt y Luty (1989) también incorporaron el término microsatélites a la nomenclatura de ADN repetitivo polimórfico. Estos estudios iniciales demostraron que:

- Normalmente son amplificados *locus* específicos, resultando en una o dos bandas dependiendo del estado homo- o heterocigoto en organismos diploides, es decir, los marcadores microsatélites resultaron ser *locus*-específicos y codominantes.
- Muchos alelos de tamaños diferentes pueden existir en una población y el nivel de heterocigosis puede ser extremadamente elevado.
- El polimorfismo alélico de los microsatélites es principalmente causado por un número variable de unidades repetitivas. Por ejemplo, diferentes alelos de un microsatélite tipo (CA)*n* usualmente difieren por 2, 4, 6, 8, 10, bases.
- Los marcadores microsatélites amplificados por PCR presentan herencia mendeliana.

Pronto se descubrió que los marcadores microsatélites son más útiles que los minisatélites ya que son más cortos, fáciles de amplificar, más abundantes y mejor distribuidos en el genoma. El gran número de alelos y los elevados niveles de

variabilidad entre organismos cercanamente relacionados hacen de los microsatélites el sistema marcador de elección para una amplia variedad de aplicaciones (Weising et al., 2005).

Función potencial de los microsatélites

El impacto funcional de la presencia de microsatélites en el genoma eucariota aún no se comprende completamente. La mayoría de las copias se amplifican y propagan en ausencia de una presión selectiva (Orgel y Crick, 1980). Sin embargo, una amplia variedad de roles posibles han sido discutidas en numerosos trabajos. Entre ellas se pueden nombrar: *i*) repeticiones tipo microsatélites son elementos estructurales de telómeros y centrómeros. Se ha demostrado que las repeticiones teloméricas realmente representan una “versión especial” de microsatélites (Weising et al., 2005), *ii*) algunos microsatélites unen proteínas nucleares (Eppelen et al., 1996) y pueden, por ejemplo, servir como un sitio de unión a factores de transcripción que aumentan o reducen la expresión de genes vecinos (por ej. el factor GAGA, Gilmour et al., 1989; Granok et al., 1995) y *iii*) algunos microsatélites (especialmente repeticiones de tri-nucleótidos) son transcritos y a menudo codifican secuencias de aminoácidos idénticos (Young et al., 2000; Borstnik y Pumpernik, 2002). Por ejemplo, las repeticiones CAG son traducidas en repeticiones de glutamina, las cuales son componentes de secuencias integrales de varios factores de transcripción (Gerber et al., 1994). Las expansiones de repeticiones CAG, GAA, y GCG/GCA en genes humanos se encontró asociada a enfermedades neurodegenerativas (Cummings y Zoghbi, 2000; Brown y Brown, 2004).

Los microsatélites como marcadores moleculares

La elevada frecuencia de polimorfismo asociada a la longitud de los microsatélites provee una base para el desarrollo de marcadores moleculares con amplia aplicación en investigaciones genéticas incluyendo los estudios de variabilidad, análisis de ligamiento, marcado de genes y evolución (Kantety et al., 2002). Se han desarrollado numerosos métodos que explotan a los microsatélites como marcadores moleculares, de una forma u otra. La variante más importante es la ya mencionada amplificación *locus*-específica por PCR de microsatélites nucleares utilizando

cebadores flanqueantes al motivo repetitivo. Sin embargo otros métodos utilizan los propios motivos microsatélites como cebadores de PCR (Gupta et al., 1994; Ender et al., 1996; Ramser et al., 1997), o como sondas de hibridización (Ali et al., 1986; Weising et al., 1998).

Categorías y características de los microsatélites

Los microsatélites compuestos por motivos de tri-, tetra- y penta-nucleótidos son generalmente menos comunes que las repeticiones mono- y di-nucleótidos. Esto es extremadamente variable, dependiendo del motivo, la localización genómica (intrónica vs. exónica; regiones 5'- y 3'-no-traducidas vs. regiones inter-génicas, entre otras), y las especies bajo consideración (Toth et al., 2000). Como una regla general, las repeticiones de tri-nucleótidos son el tipo predominante de los microsatélites hallados en los exones, mientras que repeticiones que consisten en múltiplos de una, dos, cuatro, y cinco pares de bases son raras en los genes (Aitman et al., 1991; Beckmann y Weber, 1992; Jurka y Pethiyagoda, 1995; Toth et al., 2000; Young et al., 2000). Esto no es sorprendente, considerando el hecho de que el deslizamiento de la ADN polimerasa por una o más unidades de tri-nucleótidos no afecta la periodicidad impuesta por el marco de lectura abierto, mientras que mutaciones en este marco como consecuencia de la inserción/delección de otros tipos de unidades repetitivas cambiaría completamente la secuencia de aminoácidos por delante del sitio mutado (Weising et al., 2005). Otra forma de categorizar a los microsatélites relaciona el grado de perfección de las secuencias repetitivas. Weber (1990) reconoció tres clases, que comprenden:

- **repeticiones perfectas**, las cuales consisten de una secuencia repetitiva única e ininterrumpida de un motivo particular (por ejemplo; $\dots(\text{AG})_{32}\dots$).
- **repeticiones imperfectas**, en las cuales la secuencia repetitiva es interrumpida por una o varias bases fuera de marco (por ejemplo; $\dots(\text{TC})_6\text{A}(\text{TC})_{13}\dots$).
- **repeticiones compuestas**, con intercalados de secuencias repetitivas de varios motivos perfectos o imperfectos (por ejemplo; $\dots(\text{AT})_6(\text{GT})_{42}\text{AT}(\text{GT})_5(\text{GT})_{10}\dots$, $\dots(\text{AT})_{14}(\text{AG})_8\dots$).

Generalmente se observa una correlación directa entre el número de repeticiones perfectas y el nivel de polimorfismo exhibido por amplificación (Weber, 1990; Saghai-Marooft et al., 1994; Smulders et al., 1997). Aunque la mayoría de los estudios se han realizado sobre repeticiones de di-nucleótidos, otros tipos de microsatélites también probaron ser útiles. Las repeticiones de mononucleótidos representan el más frecuente tipo de microsatélite, sin embargo presenta un fuerte efecto de sombreado (“*shadow*”). Estas bandas adicionales, que se originan por el deslizamiento de la ADN Polimerasa, pueden conducir a una difícil detección de las diferencias de una única base (Hauge y Litt, 1993). Los microsatélites compuestos por motivos tri-, tetra-, y penta-nucleótidos son mucho más fáciles de analizar (menor efecto de sombreado y mayor diferencia de tamaño entre alelos) y tienen una mayor posibilidad de ser conservados entre diferentes taxas, aunque son también menos abundantes que las repeticiones A-, CA- y GA- (Edwards et al., 1991; Kijas et al., 1997; Scotti et al., 2002; Song et al., 2002; Weising et al., 2005).

Los microsatélites son marcadores codominantes, al igual que los RFLPs (Weising et al., 2005), lo cual implica que la totalidad de los alelos presentes en un determinado *locus* pueden ser detectados. Sin embargo, se observan comúnmente alelos que no amplifican (alelos nulos) derivados de mutaciones en uno o varios sitios de unión al cebador que impiden la amplificación de la PCR (Callen et al., 1993; Paetkau y Strobeck, 1995; Pemberton et al., 1995; Ishibashi et al., 1996; Jones et al., 1998; Kijas et al., 1997; Russell et al., 1997). Individuos homocigotos para un alelo nulo no muestran ninguna banda, mientras que los heterocigotos tienen solamente una banda y por lo tanto aparentan ser homocigotos cuando se los visualiza en un gel. Los alelos nulos no detectados pueden dar la impresión equivocada de un aparente exceso de homocigotos en una población en estudio (White y Powell, 1997). Estos también pueden conducir a una mala interpretación de los datos de herencia (Kijas et al., 1997). El problema puede resolverse mediante rediseño de los cebadores de manera de evitar el sitio mutado de unión al cebador (Callen et al., 1993; Paetkau y Strobeck, 1995; Ishibashi et al., 1996; Jones et al., 1998). Más aún, múltiples *loci* microsatélites deben ser examinados en el estudio de una población de manera de reducir la influencia del alelo nulo en la misma (Weising et al., 2005).

La popularidad de los microsatélites nucleares es debida a una única combinación de ventajas importantes como su naturaleza codominante, su gran

abundancia, la enorme extensión de diversidad alélica, y la facilidad de determinar variaciones alélicas debido al tamaño del fragmento amplificado. Por otro lado, la más seria desventaja de este tipo de marcadores es la necesidad de información de secuencia para el diseño de los cebadores. La falta de esta información ha impedido el desarrollo de microsatélites en muchas especies. A pesar de esto y dada la creciente información genómica que se dispone para las especies de importancia económica, actualmente es posible identificar secuencias microsatélites en las bases de datos genómicos. En humanos y en organismos modelo como *Arabidopsis*, arroz, maíz y tomate, la identificación de microsatélites *in silico* (asistida por computadora) provee una valuable fuente para la generación de marcadores (Smulders et al., 1997, Cho et al., 2000). En algunos ejemplos cebadores heterólogos (derivados de marcadores microsatélites de taxas relacionadas) pueden encontrarse disponibles y ser informativos (Westman y Kresovich, 1998). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el clonado molecular y la secuenciación de los fragmentos amplificados son necesarios para obtener los datos de secuencia para el diseño de los cebadores que flanquean del microsatélite de interés (Weising et al., 2005).

Desarrollo de marcadores microsatélites genómicos (SSR) en *P. notatum*

Cidade et al. (2009) desarrollaron marcadores SSR de *Paspalum notatum* a partir de una biblioteca genómica enriquecida en secuencias repetitivas. Por medio del programa DNASTAR diseñaron un total de 27 pares de cebadores flanqueantes a regiones repetitivas. Los mismos fueron evaluados para determinar polimorfismo en 25 accesiones de la colección de germoplasma de la Estación Pecuaria Sudeste del EMBRAPA, São Carlos, Brasil, en donde de los 27 pares de cebadores ensayados 11 resultaron polimórficos. En total se obtuvieron 87 alelos a partir de las 25 accesiones, con un número de alelos por *locus* que varió desde 3 a 22 (con un promedio de 7.9). Cidade et al. (2009) determinaron que los 11 pares de cebadores generaron un patrón de *locus* dominantes por lo cual no fue posible estimar la frecuencia alélica. Para comparar la eficiencia de los marcadores en la identificación de cada individuo se calculó el Poder de Discriminación (PD) (Tessier et al., 1999) de cada *locus*. Los rangos estimados para los 11 *loci* fueron de 0.44-0.90 (un promedio de 0.70) para la heterocigosis esperada, 0,36-0.89 (con un promedio de 0.66) para el PIC y de 0.55- 0.97 (un promedio de 0.82)

para PD. Además se realizó amplificación cruzada que determinó su aplicación en otras tres especies de *Paspalum*: *P. subciliatum* Chase, *P. cromyrorhizon* y *P. ionanthum* Chase demostrando que los mismos pueden transferirse a otras especies del género.

Estos marcadores moleculares son los primeros *loci* microsatélites desarrollados en *P. notatum*. De acuerdo a los datos que informaron los autores son adecuados para el estudio de diversidad genética de colecciones de *P. notatum* de Brasilia y la estructura genética de poblaciones naturales de esta importante especie forrajera (Cidade et al., 2009).

I.3.2.1.2- Marcadores microsatélites génicos o EST-SSR

Una de las estrategias clásicas de secuenciación de genomas es el análisis de bibliotecas de EST (sigla derivada de la expresión en inglés: *expressed sequence tags*). Estas bibliotecas consisten en el conjunto completo de los RNA mensajeros (ARNm) de una célula, un tejido, un órgano, o un organismo (en caso de organismos unicelulares) convertido a ADNc, los cuales son direccionalmente clonados dentro de un vector adecuado y parcialmente secuenciados desde sus extremos 5' o 3' en un procedimiento de un solo paso (Weising et al., 2005). Las secuencias resultantes de entre 300 a 800 pb permiten la identificación de los genes correspondientes mediante la búsqueda de similitudes con secuencias de funciones conocidas en bases de datos públicas. En la base Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) se encuentran las secuencias de ESTs de 500 organismos diferentes (Benson et al., 2004). Estos pueden ser analizados en cuanto a su polimorfismo y ser mapeados en un mapa de EST o alternativamente ser incorporados en un mapa genético existente (Pelgas et al., 2004). En cualquier caso los ESTs marcan la porción expresada de un determinado genoma.

Las secuencias derivadas de los ESTs son una fuente potencialmente importante de marcadores moleculares (Yu et al., 2004a). Se ha observado que muchas de las secuencias de EST presentan microsatélites internos altamente variables que pueden ser utilizados como marcadores genéticos (Kantety et al., 2002). Existen grandes ventajas en la utilización de genes expresados comparado con secuencias anónimas como marcadores moleculares. Primero, si se determina que un marcador de EST está genéticamente asociado con un rasgo de interés, es posible que este pueda ser el gen que

afecta a ese rasgo directamente (Chen et al., 2001; Thiel et al., 2003). Por lo tanto los marcadores derivados de ESTs pueden proveer oportunidades para el descubrimiento de genes, e incrementar el rol de los marcadores genéticos en los estudios de variabilidad y en genes de funciones conocidas. Segundo, los marcadores derivados de ESTs son probablemente más transferibles entre especies que los marcadores derivados de secuencias anónimas (Cordeiro et al., 2001; Taylor et al., 2001; Decroocq et al., 2003). Tercero, los ESTs que muestran homología con genes candidatos pueden ser específicamente empleados para mapeo genético y pueden ser útiles para estudios de colinearidad entre especies relacionadas por medio de análisis comparativos (Holton et al., 2002).

Función de los SSR en los genes

La presencia de SSRs en transcritos de genes conocidos sugiere que los mismos pueden tener un rol en la expresión y/o la función de determinado gen. Sin embargo, la función biológica de los motivos SSRs en la región codificante de genes en plantas y si existe una asociación entre su longitud y una determinada variación fenotípica no ha sido del todo esclarecida (Kantety et al., 2002; Li et al., 2004). Como se mencionó más arriba, en humanos se ha informado que las expansiones de repeticiones de trinucleótidos en algunos genes están asociados con desordenes neurológicos como la enfermedad de Huntington (Sasaki et al., 1996).

En plantas, se determinó que la variación en el número de repeticiones GA/CT en la región 5`NTR del gen *waxy* está correlacionada con el contenido de amilasa en arroz (Ayres et al., 1997). Además, Cho et al. (2000) informó 27 genes de arroz que contienen SSRs en los exones (8), intrones (5), regiones 5`-UTR (8) o 3`-UTR (5). En un análisis a gran escala llevado a cabo por Kantety et al. (2002) se identificaron numerosos transcritos de genes con motivos SSR. Un análisis de sus similitudes con genes conocidos indicó que estos tienen un rango de funciones, tales como enzimas metabólicas, proteínas estructurales, señales de enfermedades y factores de transcripción (Kantety et al., 2002).

Utilidad de los EST-SSR como marcadores moleculares

Como marcadores genéticos, los EST-SSR han sido evaluados en varios estudios y tienden a ser considerablemente menos polimórficos que los SSR derivados de ADN genómico (Cho et al., 2000; Cordeiro et al., 2001; Eujayl et al. 2002; Thiel et al., 2003). Eujayl et al. (2002) demostraron que los cebadores EST-SSR de trigo producen alta calidad de marcadores, pero revelan un bajo nivel de polimorfismo (25 %) comparado con los marcadores SSR genómicos (53 %) (Röder et al., 1998). En cebada, los EST-SSRs de la región 3' no-traducida (3' NTR) resultaron más polimórficos que aquellos de la región 5' NTR (Thiel et al., 2003), sin embargo un estudio en caña de azúcar ha mostrado el resultado opuesto (Cordeiro et al., 2001). Scott et al. (2000) reportaron que el grado de polimorfismo depende de los genotipos utilizados. A pesar del bajo polimorfismo, fue demostrado en varios estudios que un pequeño número de marcadores (10) generó un elevado poder discriminatorio (Eujayl et al., 2002) y mostró una alta frecuencia de transferibilidad entre especies (Cordeiro et al., 2001; Taylor et al., 2001; Decroocq et al., 2003). Las últimas características mencionadas hacen que estos marcadores sean especialmente útiles para realizar estudios de mapeo comparativo.

Minería de datos para el desarrollo de marcadores EST-SSRs en gramíneas

Búsqueda de ESTs que contengan motivos SSR

La existencia de microsátélites en secuencias de ESTs ha sido informada para diferentes especies vegetales incluyendo maíz (Kantety et al., 2002), cebada (Holton et al., 2002; Thiel et al., 2003), arroz (Temnykh et al., 2001), trigo duro (Eujayl et al., 2002), trigo pan (Kantety et al., 2002), centeno (Hackauf y Wehling, 2002), caña de azúcar (Cordeiro et al., 2001), *Eragrostis curvula* (Schrad.) Ness (Cervigni et al., 2008) y uva (Scott et al., 2000). De esta manera, la generación de marcadores SSR derivados de EST se ha vuelto un atractivo complemento a las colecciones de SSRs existentes (Yu et al., 2004a).

Kantety et al. (2002) estimó la frecuencia de SSR a partir de las bases de datos públicas disponibles de ESTs para cinco cultivos diferentes de cereales (cebada, maíz, arroz, sorgo y trigo). La misma varió de 1,5 % para maíz a 4,7 % para arroz con un promedio de 3,2 % en las cinco especies. La frecuencia de SSR en los ESTs de trigo fue

de 3,2 % con una representación de motivos repetitivos de di-, tri-, y tetra-nucleótidos de 10 %, 83 %, y 7 %, respectivamente. El motivo GA-CT fue el motivo repetitivo de di-nucleótido más abundante en todas las especies (Morgante y Olivieri, 1993). Un motivo di-nucleótido puede representar codones múltiples dependiendo del marco de lectura y traducirse a diferentes aminoácidos. Por ejemplo, el motivo GA/CT puede representar los codones GAG, AGA, UCU y CUC en una población de ARNm y traducirse a los aminoácidos Arg, Glu, Ala y Leu respectivamente. Los aminoácidos Ala y Leu se encuentran presentes en proteínas en frecuencias elevadas, aproximadamente con un porcentaje del 8 % y 10 %, respectivamente. Está podría ser la razón por la cual los motivos GA/CT están presentes a alta frecuencia en las colecciones de EST (Kantety et al., 2002). Temnykh et al. (2000) encontraron que este motivo es la clase más polimórfica de repetición SSR en arroz. En los ESTs de trigo, el motivo de repetición de tri-nucleótido más abundante es AAC-TTG (Kantety et al., 2002); sin embargo, el mismo difiere del reportado para ADN genómico (Song et al., 2002). Basados sobre un estudio de los SSRs genómicos por Song et al. (2002), se determinó que el motivo TAA-ATT fue más abundante e informativo como marcador que el motivo AAC-ATT. Sin embargo, el motivo GGC-CCG es la repetición de tri-nucleótidos más común en la mayoría de los cereales, consistente con una elevada proporción de contenido GC en las regiones codificantes (Moore, 2000; Varshney et al., 2005a).

Los EST-SSRs representan una oportunidad única para la identificación de nuevos marcadores debido a que la información de secuencias se encuentra fácilmente disponible en bases públicas, evitando la necesidad de crear y secuenciar bibliotecas genómicas enriquecidas en SSRs. Por otro lado, la característica más importante es que es más probable que los pares de cebadores diseñados a partir de EST-SSRs funcionen en especies poco relacionadas que los generados a partir de bibliotecas genómicas (Kantety et al., 2002).

Agrupamiento de los EST

La gran cantidad de información derivada de los proyectos de secuenciación de bibliotecas de EST de especies de interés económico ha llevado al desarrollo de diversas estrategias *in silico* tendientes a organizar y sistematizar las bases de datos. Un primer análisis consiste en realizar agrupamientos o “clusters” de EST. Un “cluster” de EST

es definido como un grupo de secuencias de EST que se solapan. El propósito de este agrupamiento es eliminar la redundancia en un conjunto de datos y mejorar la calidad y longitud de las lecturas. Posibilita además obtener una secuencia consenso después del alineamiento de secuencias de EST (similar a un ensamblado genómico). Predominantemente se han utilizado dos estrategias para realizar el agrupamiento (“*clustering*”): (1) un agrupamiento generalizado y simple basado en similitud de secuencias que no pretende obtener una secuencia consenso (NCBI Unigene set, Schuler y Boguski, 1996) y (2) una metodología de agrupamiento basada en el índice génico (TGI) (<http://www.tigr.org/tdb/tgi>) (Lee et al., 2005) de la base de datos TIGR (Ouyang et al., 2007) que obtiene una secuencia consenso de alta calidad después de aplicar condiciones muy astringentes de agrupamiento (Quackenbush y Liang, 2000). Ambos métodos poseen ventajas y desventajas. Kantety et al. (2002) empleó una metodología que incorpora características de las dos anteriores, llamada sistema StrackPACK (Miller et al., 1999). El sistema StrackPACK divide el proceso de agrupamiento en tres pasos principales con incremento en los niveles de astringencia, combinando la información ganada a partir del agrupamiento con la simplicidad de una secuencia consenso (La Rota, 2000). Brevemente, un paso preliminar remueve cualquier secuencia remanente del vector de clonado. Luego, en el primer paso, grupos aproximados (poco seguros) son definidos sobre las bases de similitud (usando el programa “*d2_cluster*” en StackPACK). Algunos ESTs pueden ser dejados como secuencias individuales si ellos no coinciden con ninguna otra secuencia del grupo. Algunas similitudes espurias pueden formarse, pero el primer estadio permite a miembros de EST de la misma familia de genes ser agrupados. Un segundo paso más astringente usa el programa PHRAP (Green, 1999) y ensambla los ESTs presentes en cada grupo, para verificar el grupo y generar un contiguo (“*contig*”), o para dividir el grupo en dos o más contiguos o en secuencias únicas (“*singleton*”), si las diferencias en secuencia exceden el criterio establecido. El alineamiento de las secuencias que se solapan dentro de cada contiguo genera una nueva secuencia consenso y si dos o más contiguos fueron creados ellos mantienen una relación de unidad debido a su participación en el mismo grupo original (esta relación no se mantiene en la metodología utilizada por TIGR). Mayores refinamientos a las secuencias consenso son posibles con la ayuda de un tercer paso que utiliza el programa CRAW (del sistema StackPACK), el cual permite la identificación de secuencias de “*splicing*” alternativo o variantes similares del mismo gen (Kantety et al., 2002).

El agrupamiento de ESTs reduce la redundancia en el conjunto de datos y crea una secuencia consenso más larga de un gen particular. Kantety et al. (2002) trabajó con un grupo de datos de ESTs de gramíneas que comprende un cuarto de millón de secuencias de cinco especies diferentes. De estas alrededor de 8.500 secuencias contienen motivos SSR. Para reducir la redundancia emplearon un agrupamiento de ESTs en dos fases con dos pasos principales dentro de cada una de ellas. En el primer paso de cada fase las secuencias fueron agrupadas por especies para generar consensos de EST y secuencias únicas (*singletons*) para cada especie. El resultado de esto fue una colección de secuencias no-redundantes (NR) que contienen SSR para cada una de las cinco especies. En el segundo paso las secuencias NR de todas las especies fueron mezcladas y analizadas con el procedimiento de “*clustering*” StackPACK, con el objetivo de obtener coincidencias entre especies para identificar genes conservados evolutivamente.

Desarrollo de marcadores EST-SSR para trigo hexaploide

A partir de los “*clusters*” realizados por Kantety et al. (2002) sobre la base de 260.000 secuencias de EST de cebada, maíz, arroz, sorgo y trigo fueron identificados 172 “*superclusters*” (“*clusters*” o agrupamientos generados a partir de distintas especies), y 138 secuencias únicas (Kantety et al., 2002). Sin embargo, en un trabajo posterior realizado por Yu et al. (2004a) se establecieron 49 “*superclusters*” adicionales a los previamente establecidos por Kantety et al. (2002). Como resultado, un total de 219 “*superclusters*” y 138 secuencias únicas fueron evaluados para desarrollar marcadores SSR a partir de EST (Yu et al., 2004a) (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/Cornell/>). Brevemente, el análisis realizado previamente por Kantety et al. (2002) fue direccionado al estudio de las relaciones de secuencias de EST-SSR entre cinco especies diferentes; sin embargo en el estudio de Yu et al. (2004a) los autores le dieron prioridad a las secuencias de EST de trigo y arroz facilitando de este modo la evaluación de la transferibilidad inter-específica para el desarrollo de marcadores moleculares y posterior mapeo de los mismos. En este trabajo Yu et al. (2004a) desarrollaron 306 pares de cebadores para 156 de los 219 “*superclusters*”. Para el resto de los mismos no lograron desarrollar cebadores porque no había suficientes secuencias flanqueantes. En algunos casos se diseñaron más de un par de cebadores específicos

para el mismo “*superclusters*”. En contraste la secuencia consenso de cinco “*superclusters*” mostró alta similitud entre trigo y arroz y permitió el diseño de pares cebadores comunes (cebadores no específicos de especie). Las secuencias de EST-SSR desarrolladas por Kansas State University (KSU) fueron integradas en este análisis resultando en varios pares de cebadores para el mismo “*supercluster*”. Sin embargo, solamente un par de cebadores fue elegido para cada “*supercluster*” en los experimentos de mapeo. Además, 138 marcadores EST-SSR fueron diseñados para los ESTs de secuencias únicas dando un total de 444 pares de cebadores. La funcionalidad y transferibilidad del marcador fue evaluada usando 16 genotipos a partir de cuatro especies en geles de agarosa.

Los autores (Yu et al. 2004a) reportaron que de los 444 pares de cebadores, 368 produjeron amplicones en al menos una especie. De los pares de cebadores que amplificaron, 62 % eran de regiones codificantes y 38 % de regiones NTR; sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa, sugiriendo que la funcionalidad del cebador y la región de apareamiento no están relacionadas. Setenta y seis pares de cebadores (15 %) fueron rechazados porque no se obtuvo producto de amplificación o porque dieron un patrón de bandeo complejo y no-específico. De los 181 pares de cebadores desarrollados en la Universidad de Cornell, 129 (71 %) produjo amplicones. Esta funcionalidad fue mayor que la publicada para arroz (54 %) (Cho et al., 2000), caña de azúcar (60 %) (Cordeiro et al., 2001) y cebada (64 %) (Thiel et al., 2003), pero inferior a la informada en centeno (74%) (Hackauf y Wehling, 2002). Un total de 52 pares de cebadores fallaron en producir amplicones, posiblemente por la existencia de intrones dentro de la secuencia codificante que interrumpió la extensión de PCR. Aproximadamente un 46 % de los cebadores amplificaron al menos un fragmento de un tamaño mayor al esperado. La existencia de tales variantes alélicas no es probable que se deba a la variabilidad en la longitud de la repetición dentro del SSR, sino más bien, al resultado de inserciones-delecciones (*indel*) dentro del amplicón.

De los 368 pares de cebadores funcionales desarrollados por Yu et al. (2004a), 160 (43,47 %) fueron polimórficos entre los genotipos parentales de la población de mapeo. Estudios previos realizados en trigo duro (Eujayl et al., 2002) reportaron un polimorfismo aproximado del 25 % de los SSRs derivados de EST y concluyeron que los cebadores de EST-SSR produjeron alta calidad de marcadores. Sin embargo en el estudio de Yu et al. (2004a), el polimorfismo de los marcadores EST-SSRs fue

comparable al los de SSRs genómico (53 %) (Röder et al., 1998). En este trabajo, los autores determinaron que los di-nucleótidos fueron significativamente más polimórficos (74 %) que los tri-nucleótidos (56 %). Además, la mayoría de los di-nucleótidos se localizó en las regiones no-traducidas (81 %), lo cual puede aumentar el polimorfismo comparado con la localización de los tri-nucleótidos (Thiel et al., 2003). Se ha reportado que los marcadores de las regiones NTR son más polimórficos debido a que las secuencias de los NTRs no participan directamente en la función de los genes (Scott et al., 2000; Temnykh et al., 2001; Thiel et al., 2003). Sin embargo en el estudio de Yu et al. (2004a), se ha determinado que los EST-SSRs que provienen tanto de las secuencias codificantes como de las regiones 5`NTR producen una proporción similar de SSRs polimórficos (61 % y 60 %, respectivamente) y ambos fueron significativamente más polimórficos que aquellos en la región 3`NTRs (49 %). De los 160 pares de cebadores que resultaron polimórficos entre los progenitores de la población de mapeo de trigo hexaploide, Yu et al. (2004a) utilizaron 124 para los experimentos de mapeo. Los otros 36 cebadores restantes generaron un patrón complejo de bandeo, bandas con una intensidad demasiado débil, o un tamaño de banda extremadamente largo o corto.

Transferibilidad de EST-SSR entre especies de gramíneas

Además de la utilización de los marcadores EST-SSR desarrollados por Yu et al. (2004a) en los experimentos de mapeo en trigo, los mismos se utilizaron para evaluar su transferibilidad entre especies de gramíneas. En este trabajo, Yu et al. (2004a) utilizaron los 368 pares de cebadores funcionales (ver más arriba) en 16 genotipos correspondientes a cuatro especies de gramíneas (trigo, arroz, cebada, y maíz). Los autores determinaron que 227 pares de cebadores amplificaron exitosamente a partir de ADN de dos o más especies. Además, reportaron que con 49 de los mismos lograron amplificar ADN a partir de las cuatro especies analizadas. Basados en los 227 pares de cebadores exitosos, 67 % produjeron amplicones a partir de regiones codificantes de dos o más especies (22 % a partir de la región 5`NTR y 11 % de la región 3`NTR). Para la construcción de los “*superclusters*” Kantety et al. (2002) utilizaron un umbral de similitud de secuencias del 85 % para agrupar secuencias de EST de dos o más especies. En el estudio de Yu et al. (2004a), los cebadores diseñados a partir de los “*superclusters*” mostraron una frecuencia levemente superior de transferibilidad que

aquellos diseñados sobre secuencias únicas, 74 % y 69 %, respectivamente. Además, se realizaron análisis de BLASTN con un E value $< 1 \times 10^{-10}$ para los alineamientos de los “clusters” y las regiones conservadas flanqueantes a los SSRs. Este criterio permitió el desarrollo de cebadores EST-SSR que amplifican *loci* ortólogos en múltiples especies, aun cuando se usan cebadores específicos de especie (Yu et al., 2004a). De los 337 pares de cebadores derivados de secuencias de EST de trigo, 180 (53 %), 151 (45 %), y 57 (17 %) produjeron amplicones a partir de ADN de cebada, arroz, y maíz, respectivamente. Además de los 57 pares de cebadores derivados de trigo que amplificaron en ADN de maíz, 55 pares de cebadores produjeron amplificación en más de tres especies, sugiriendo que estos marcadores fueron desarrollados en secuencias de genes conservados. Varios estudios han reportado que los SSRs eran altamente conservados entre cebada y trigo pero relativamente menos conservados en arroz y maíz (más distantemente relacionadas) (Holton et al., 2002; Kantety et al., 2002; Thiel et al., 2003). Un total de 162 pares de cebadores generaron polimorfismo entre los parentales de la población de mapeo de arroz (IR64 y Azucena, Temnykh et al., 2001) y el 95 % de los 127 marcadores de arroz que resultaron polimórficos fueron desarrollados basados en secuencias de trigo. Un total de 86 pares de cebadores fueron polimórficos en los parentales de las poblaciones de mapeo de trigo y arroz resultando en 77 *loci* de EST-SSR para aumentar los mapas comparativos entre trigo y arroz (ver punto I.4.4).

I.3.2.1.3- Desarrollo de Marcadores COS (*Conserved Ortholog Set*)

En la última década se ha producido un gran progreso en la unión de los genomas de plantas a través de mapas genéticos comparativos, especialmente para las especies que pertenecen a una misma familia (Paterson et al., 2000). Por ejemplo, la mayoría de las especies económicamente importantes en la familia de gramíneas (maíz, trigo, cebada, mijo, y sorgo) tienen mapas comparativos detallados tales que tanto el contenido como el orden génico a menudo pueden ser pronosticados a través de las especies (Bennetzen et al., 1998; Gale y Devos, 1998; Wilson et al. 1999). Similarmente, la información genética puede compartirse entre muchas especies de leguminosas (soja y frijol) (Menancio-Hautea et al., 1993; Boutin et al., 1995) o entre especies de Solanáceas (tomate, pimienta y papa) (Tanksley et al., 1992; Livingstone et al., 1999). En todos estos ejemplos, las especies dentro de las familias han sido ligadas

por un conjunto de genes ortólogos comunes, detectados a través de hibridización de ADN por la técnica de Southern blot. Contrariamente durante el mismo periodo de tiempo relativamente poco progreso se ha hecho en la genómica comparativa entre especies de plantas más divergentes, esto es, aquellas que pertenecen a diferentes familias de plantas. Evolutivamente el tiempo de divergencia entre familias de plantas es mayor, dando lugar a más re-arreglos genómicos. Más aún, la comparación entre familias ha sido impedida por dificultades técnicas para identificar de genes ortólogos que puedan ser usados para comparar los genomas de estas plantas. Específicamente la similitud reducida de genes entre familias de plantas ha hecho que el mapeo comparativo mediante sondas comunes de ADN e hibridización sea difícil de implementar y a menudo imposible (Fulton et al., 2002).

Con la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y de otras especies modelo, la genómica funcional de una especie puede compararse y explotarse a través de otras especies de plantas. Esto requiere la identificación de un conjunto de genes que hayan permanecido relativamente estables tanto en secuencia como en número de copias desde la radiación de las plantas con flores a partir de su antecesor común.

Fulton et al. (2002) proveyeron las bases para una genómica comparativa más robusta identificando un conjunto de genes conservados a través de la evolución tanto en secuencia como en número de copias. Ese conjunto representa más de 1.000 genes conservados, al que se les dio el nombre de COS (*Conserved Ortholog Set*) obtenido mediante la comparación de secuencias genómicas de *Arabidopsis* contra bases de ESTs de tomate. Esta última comprendía más de 130.000 ESTs y representaba aproximadamente la mitad del contenido génico de tomates (Van der Hoeven et al., 2002). Los criterios de búsqueda requirieron que los EST de tomate tuviesen una única coincidencia con el genoma de *Arabidopsis*, evitando así problemas de coincidencias con familias de multigenes para las cuales la ortología o paralogía no se distinguen fácilmente. Además para asegurar que estos posibles genes ortólogos sean de un bajo número de copias (y así sea probable que sean ortólogos y no parálogos), la mayoría de los marcadores COS también fueron comparados contra ADN genómico de tomate por medio de análisis de hibridización (Fulton et al., 2002).

Como *Arabidopsis* y tomate pertenecen a diferentes familias que divergieron temprano en la evolución de las plantas, los marcadores generados a partir de la

estrategia utilizada por Fulton et al. (2002) podrían ser útiles para estudios de genómica comparativa y estudios taxonómicos en una amplia colección de especies de plantas.

Como estrategia para usar los marcadores COS en mapeo comparativo de otras especies puede utilizarse la hibridización directa. Debido a que los mismos fueron seleccionados por ser altamente conservados y además por poseer única o bajo número copias, es posible que alguna porción de ellos pueda ser directamente utilizada como sonda de hibridización para mapeo por medio de RFLP en otras especies. Dependiendo si esta especie está más cercanamente relacionada a tomate o a *Arabidopsis*, se podría elegir la sonda de tomate o *Arabidopsis* (Fulton et al., 2002).

Una segunda estrategia utilizada para la aplicación de marcadores COS en otras especies es usar la secuencia de cada marcador COS (o la secuencia consenso que deriva del alineamiento entre las secuencias de tomate y *Arabidopsis*) para realizar una búsqueda en la base de datos genómica o de ESTs de otras especies y así hallar la secuencia del marcador COS correspondiente. Aunque esta estrategia está restringida a especies que contengan importantes base de datos, tiene la ventaja de que se pueden emplear sondas homólogas y/o secuencias de cebadores para la amplificación de las regiones conservadas por PCR y el mapeo de los amplicones en la especie de interés.

I.4- Mapas genéticos

A partir del desarrollo de las distintas metodologías de marcadores moleculares fue posible la construcción de mapas de ligamiento genéticos en un gran número de especies. Es posible afirmar que el mayor impacto de la tecnología de marcadores moleculares fue en esta área de la biología animal y vegetal (Young, 1994). A partir del desarrollo de estos mapas comenzaron los estudios genómicos en donde no solo es posible describir la herencia de un carácter en particular, sino que además es posible estudiar un gran número de *loci* simultáneamente y describir la estructura física de los genomas (Brown y Brown, 2004). Actualmente, los métodos genómicos de generación de mapas genéticos se dividen en dos categorías (Brown y Brown, 2004).

Mapas de ligamiento genéticos: se basan en la aplicación de técnicas genéticas para construir mapas de ligamiento que muestran las posiciones de los genes y otras características de las secuencias de un genoma. Las técnicas genéticas comprenden experimentos de cruzamientos o, en el caso de humanos, el examen de los antecedentes familiares (árboles genealógicos).

Mapas físicos: se basan en técnicas de biología molecular para establecer en forma directa la secuencia de determinadas moléculas de ADN y a partir de ellas

construir mapas físicos con las secuencias completas de un genoma, incluyendo los genes y secuencias no codificantes.

Esta tesis solo tratará la construcción y utilización de los mapas de ligamiento genéticos. La temática de los mapas físicos puede consultarse en Brown y Brown (2004).

I.4.1- Mapas de ligamiento genético

En 1913 Alfred Sturtevant generó el primer mapa de ligamiento genético de *Drosophila melanogaster* usando seis marcadores morfológicos (Sturtevant, 1913). Años más tarde Karl Sax (1923) demostró que existía ligamiento genético entre un *locus* que gobernaba un carácter cualitativo (color de semilla) y otro que gobernaba un carácter cuantitativo (tamaño de semilla) en *Phaseolus vulgaris*. A partir de estos estudios pioneros, los marcadores genéticos han evolucionado hasta los marcadores moleculares actuales que permiten el análisis de un gran número de *loci* simultáneamente. Los marcadores morfológicos son fáciles de monitorear pero tienen la desventaja de estar afectados por el ambiente y en algunos casos pueden recién evidenciarse tardíamente durante el desarrollo. En general, son limitados en número y presentan pocas variantes alélicas. Pueden tener efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres y/o ser deletéreos para el individuo que los porta. Asimismo, es muy difícil obtener individuos que acumulen un gran número de marcadores morfológicos en el mismo fondo (*background*) genético para utilizarlos como progenitores de cruzamientos y obtener poblaciones segregantes (Young, 1994). Por otro lado, los marcadores isoenzimáticos si bien aumentan el número de *loci* a evaluar, presentan limitaciones similares a las mencionadas para los morfológicos (Andersen y Lübberstedt, 2003).

Con el advenimiento de los marcadores moleculares de ADN estas limitaciones han sido resueltas. Estos marcadores derivan de pequeñas regiones de ADN que muestran polimorfismos de secuencia entre individuos dentro de una especie. Las diferentes metodologías de generación de marcadores moleculares como por ejemplo: RFLP (Botstein et al., 1980), RAPD (Williams et al., 1990), AFLP (Vos et al., 1995), SSR (Litt y Luty, 1989) entre otros, permiten la generación de miles de marcadores anónimos fenotípicamente neutros que posibilitan la construcción de mapas de

ligamiento saturados en animales y plantas. La información que contienen estos mapas puede utilizarse para correlacionar un fenotipo determinado con una región del genoma e incluso determinar los genes que controlan alguna característica particular (Ribaut y Hoisington, 1998). Actualmente, la información genética obtenida a partir de los mapas de ligamiento en vegetales se utiliza tanto en investigación básica como en mejoramiento, en la caracterización de germoplasma, el aislamiento de genes, la introgresión de caracteres en líneas élite y en la protección varietal (Phillips y Vasil, 1994). Estos mapas han servido asimismo como base fundamental para los proyectos de secuenciación masiva de genomas de vegetales y animales incluyendo el genoma humano (Brown, 2000).

Un proyecto de mapeo comienza a menudo con el objetivo de detectar ligamiento entre uno o más marcadores con un rasgo de interés. Aunque la densidad de los mapas genéticos puede ser extremadamente alta, puede que no sea suficiente para etiquetar (marcar) un gen específico. El etiquetado de genes es un proceso a través del cual son identificados uno o dos marcadores que se hallan ligados con bajos valores de recombinación, y se encuentran en las regiones adyacentes al rasgo estudiado. Idealmente, a distancias de entre 0,1 a 1,0 cM. Así, un mapa que cubre todos los cromosomas aún podría no ser lo suficientemente denso alrededor del *locus* (rasgo o gen) de interés (Weising et al., 2005).

La resolución de un mapa genético depende del número de entrecruzamientos que pueden ser evaluados (Brown y Brown, 2004). En muchos casos de organismos eucariotas no es posible obtener un gran número de descendientes a través de cruzamientos. Por lo tanto, solo un número reducido de meiosis pueden ser valoradas en los análisis de ligamiento lo cual disminuye la resolución del mapa (Brown y Brown 2004). Esta limitación significa que genes (o marcadores) que se encuentran separados por varias decenas de kilobases (Kpb) pueden aparecer juntos en los mapas genéticos (Brown y Brown, 2004). Estas restricciones implican que en la mayoría de los eucariotes se debe controlar y complementar los análisis de ligamiento genético con procedimientos de mapeo físico de manera de determinar la posición exacta de las secuencias de interés.

Entre varias técnicas para el marcado de características particulares, se puede destacar el llamado análisis de segregantes en grupos (*“bulked segregant analysis”* -

BSA) (Michelmore et al., 1991; Giovanonni et al., 1992). Esta técnica consiste en construir, a partir de una población segregante para una determinada característica, dos muestras de ADN (grupos o “bulks”) contrastantes para el carácter de interés mediante la mezcla *in vitro* de muestras del ADN de al menos 10 individuos de cada clase. Estos grupos serán homogéneos para el rasgo particular por el cual se hizo la clasificación, pero serán heterogéneos a todas las regiones no asociadas al carácter en estudio. Los grupos son analizados (de a pares) con una serie de marcadores moleculares y comparados entre ellos para detectar polimorfismos. Cualquier diferencia que se observe (presencia vs. ausencia de una banda en un gel) representará un candidato de marcador ligado genéticamente al rasgo en cuestión. El ligamiento genético entre el marcador y el carácter debe ser verificado posteriormente realizando un análisis de ligamiento en una población segregante (Michelmore et al., 1991).

En las gramíneas se han desarrollado mapas de ligamiento genético de arroz (Mc Couch et al., 1988; Causse et al., 1994; Kurata et al., 1994; <http://rgp.dna.affrc.go.jp>), maíz (Helentjaris et al., 1986; Burr et al., 1988; <http://www.maizegdb.org>), trigo (Devos et al., 1992, 1993; Van Deynze et al., 1995), cebada (Graner et al., 1994), avena (Rayapati et al., 1995), sorgo (Chittenden et al., 1994), caña de azúcar (da Silva et al., 1993; Garcia et al., 2006) y varias especies forrajeras como *Paspalum notatum* (Ortiz et al., 2001; Stein et al., 2007), *Pennisetum glaucum* (Devos et al., 1995), *Setaria italica* (Wang et al., 1998), *Cenchrus ciliaris* (Burrow et al., 2001), *Poa pratensis* (Porceddu et al., 2002), *Panicum maximum* (Ebina et al., 2005) y *Panicum virgatum* (Missaoui et al., 2005).

Los primeros mapas que se construyeron fueron en base a marcadores de RFLP. Si bien el desarrollo de este tipo de marcadores requiere de materiales y metodologías más complejas que los marcadores basados en PCR, fueron por algún tiempo los que permitían realizar estudios de mapeo comparativo entre diferentes especies, inclusive las poco relacionadas. Por otro lado, los marcadores de AFLP son muy eficientes para el mapeo ya que se puede generar un alto número de marcadores en poco tiempo. Tienen la ventaja de que no se necesita conocimiento previo de secuencia para su implementación, además con una sola reacción de amplificación se evalúan varias regiones genómicas simultáneamente y por lo tanto son muy efectivos en la cobertura del genoma. Se han desarrollado mapas en base a marcadores de AFLP de numerosas especies de gramíneas cultivadas incluyendo sorgo (Boivin et al., 1999), *Lolium*

perenne (Bert et al., 1999), *Poa pratensis* (Porceddu et al., 2002), *Festuca pratensis* (Alm et al., 2003), *Panicum maximum* (Ebina et al., 2005) y *Festuca arundinacea* (Saha et al., 2005) y *P. notatum* (Stein et al., 2007). En los últimos años, el desarrollo de marcadores microsatélites ha permitido la construcción de mapas de ligamiento densos en base a estos marcadores en la mayoría de las especies de interés agronómico (Varshney et al., 2005b).

I.4.1.1-Análisis de ligamiento

A partir de los datos de segregación de los distintos *loci* analizados en una población segregante es posible la construcción de mapas de ligamiento genético. El análisis está basado en el hecho de que dos *loci* que están cercanos uno al otro, sobre un mismo cromosoma, tienden a cosegregar en la meiosis, es decir a mantenerse juntos en la misma gameta, con mayor frecuencia que los que se encuentran alejados o en cromosomas distintos. Este ligamiento puede interrumpirse durante el entrecruzamiento de cromosomas homólogos en la recombinación meiótica. Existe una relación entre la frecuencia (θ) con la que ocurre un entrecruzamiento y la distancia física que separa dos *loci* en un cromosoma. Esta relación puede cuantificarse y a partir de ella elaborar un ordenamiento genético de los distintos *loci* en base a las frecuencias de recombinación (Weising et al., 2005).

Análisis estadísticos simples tales como la prueba de Chi^2 se utilizan para determinar la probabilidad de que las clases fenotípicas/genotípicas obtenidas en una progenie se deban al azar de la segregación durante la meiosis o por el contrario al ligamiento genético. Dos hipótesis deben ser discriminadas: H_0 : que los 2 *loci* considerados no estén ligados ($r \geq \frac{1}{2}$), o H_1 : que los *loci* estén ligados ($r < \frac{1}{2}$). En muchos casos, y en especial para familias de un número reducido de individuos, el criterio estadístico para la detección del ligamiento está basado en el LOD score. Este valor representa una medida de la probabilidad de obtener los datos experimentales por azar y fue desarrollado para el mapeo en humanos (Morton, 1955). Dada la gran confiabilidad de este estimador, el método del LOD score es el más ampliamente utilizado actualmente en el mapeo de plantas y animales. Un valor de LOD = 3.0 (probabilidad de 1000:1) se acepta normalmente como un umbral confiable para asignar ligamiento entre dos *loci*. Valores superiores (4,0 – 10,0) aseguran el ligamiento en

poblaciones con gran número de datos e individuos, en donde la probabilidad de obtener ligamientos solo por azar es considerable. Como regla general se considera que a mayor número de progenies y mayor número de marcadores, mayor debe ser el valor umbral de LOD score (Weising et al., 2005).

El número medio de eventos de recombinación por meiosis define la distancia entre dos *loci* (r). La relación entre la frecuencia de recombinación (r) y la distancia genética (R) en mapa está relacionada por la función de mapeo (mf). Esta expresión matemática, expresa las relaciones cuantitativas entre las frecuencias de recombinación y las distancias genéticas (en cM) en un mapa de ligamiento. Existen varias funciones de mapeo pero las más utilizadas son las de Haldane (1919) y Kosambi (1944). La función de Haldane asume ausencia de interferencia (todos los pares de *loci* considerados tienen la misma probabilidad de que ocurra un entrecruzamiento entre ellos), mientras que Kosambi considera la existencia de interferencia positiva, es decir, que debido a un impedimento físico entre las cromátidas, existe menor probabilidad de que ocurran dos entrecruzamientos en la misma meiosis en regiones cercanas (Weising et al., 2005).

Si se confirma el ligamiento entre dos *loci* por un análisis de segregación de las progenies (determinado por la prueba de Chi^2 o LOD score), la distancia entre ellos puede ser calculada matemáticamente por el método de los mínimos cuadrados y/o por el método de máxima verosimilitud. Varios programas de ligamiento (por ejemplo, Mapmaker 3.0) (Lander et al., 1987) hacen uso de este último procedimiento estadístico. El programa de mapeo Mapmaker 3.0 realiza análisis multipunto en el cual muchos *loci* ligados son considerados simultáneamente a fin de encontrar el orden más probable entre ellos. El programa tiene varias rutinas que simplifican este análisis, incluyendo un algoritmo que agrupa marcadores dentro de grupos de ligamiento y otro que sugiere el mejor orden posible de los marcadores. Una vez que un determinado orden es establecido, otro algoritmo compara la confianza para aquel orden contra todos los posibles órdenes alternativos en una rutina llamada “ripple”. El procedimiento confirma el mejor orden de los marcadores dentro de cada grupo.

El arreglo lineal de los *loci* de acuerdo a sus valores de recombinación representa los llamados grupos de ligamiento (GL). La totalidad de los GLs obtenidos representan el mapa genético del organismo considerado. Al comienzo del

procedimiento, usualmente son definidos un número mayor de GLs que cromosomas. A medida que un número mayor de marcadores son adicionados al mapa, el número de GLs eventualmente coincide con el número de cromosomas. Un mapa marco describe en forma general el genoma de la especie y provee puntos de anclaje para identificar regiones genómicas de interés. El mismo puede emplearse para integrar diferentes tipos de información genética (como por ejemplo: caracteres morfológicos y caracteres cuantitativos) y utilizarse como referencia en análisis citogenéticos y de estructura del genoma. Los mapas saturados, en donde los marcadores están espaciados a intervalos no superiores a 5 cM sobre todo el genoma, son ideales para identificar genes o características de interés ya que los *loci* asociados a los mismos estarán probablemente a unos pocos cM de algún/algunos de/los marcador/es localizados en el mapa (Weising et al., 2005).

I.4.1.2- Mapas de ligamiento genético de *Paspalum notatum*

A finales de la década del 90 comenzó el desarrollo de mapas de ligamiento genético de *P. notatum* mediante el mapeo de marcadores moleculares de RAPD, RFLP y AFLP. A partir de estos trabajos se han desarrollado mapas de ligamiento genéticos a los niveles diploide (Ortiz et al., 2001) y tetraploide (Stein et al., 2007).

I.4.1.2.1- Construcción de un mapa genético a nivel diploide

El primer mapa de ligamiento genético marco basado en marcadores de RFLP de citotipos diploides de *Paspalum notatum* (Pensacola “bahiagrass”) fue desarrollado por Ortiz et al. (2001). La construcción del mapa se basó en una población segregante de tipo F₁ derivada de la cruce entre dos genotipos diploides altamente heterocigotas y el uso de clones de RFLP de arroz, maíz y cebada distribuidos uniformemente sobre los mapas de maíz y arroz (Van Deynze et al., 1998). Los marcadores de RFLP definieron un mapa marco, el cual fue posteriormente condensado mediante la utilización de marcadores de AFLP (Vos et al. 1995) y RAPD (Williams et al., 1990). Debido a que la población de mapeo resultó ser una F₁ del tipo “*pseudo-test cross*”, la estrategia utilizada fue la construcción de dos mapas independientes a partir de los datos de segregación de los progenitores femenino y masculino, respectivamente (Ortiz et al.,

2001). Así se construyeron primero los mapas parentales y posteriormente un mapa integrado de la especie mediante la utilización de marcadores segregantes desde ambos progenitores (considerados como puentes alélicos) y el programa de mapeo JoinMap 1.4 (Stam, 1993). El mismo contiene los 10 grupos de ligamiento esperados y se extiende en una longitud de 991 cM. En este mapa se identificaron varias regiones cromosómicas colineares con los mapas de maíz (siete grupos de ligamiento) y arroz (Ortiz et al., 2001).

I.4.1.2.2- Desarrollo de un mapa genético a nivel tetraploide

El primer mapa de ligamiento genético de *Paspalum notatum* al nivel tetraploide fue reportado por Stein et al. (2007). En este trabajo se construyó un mapa marco como base para la generación de un mapa de mayor densidad en trabajos posteriores. En el mismo se logró identificar los grupos de ligamiento asociados con la apomixis en la especie, además de caracterizar el modo de herencia general de las razas tetraploides y organización del genoma. Brevemente, se generó una población segregante de tipo F₁ a partir del cruzamiento entre los genotipos Q4188 (utilizado como progenitor femenino) y Q4117 (empleado como progenitor masculino). El genotipo Q4188 es un tetraploide de origen experimental que se reproduce exclusivamente por sexualidad (Quarin et al., 2003). El mismo fue obtenido a partir de un cruzamiento entre un individuo tetraploide apomítico facultativo obtenido por duplicación con colchicina de un diploide y un genotipo tetraploide apomítico natural (Quarin et al., 2003). El progenitor masculino Q4117 fue colectado en una población natural de la especie del sur de Brasil y se reproduce casi exclusivamente por apomixis (Ortiz et al., 1997). A partir del cruzamiento entre ambos individuos se generó una población de 113 individuos. Los mismos fueron clasificados en cuanto a su modo de reproducción por observaciones citoembriológicas de la morfología de los sacos embrionarios y por marcadores moleculares cosegregantes con la aposporía (Stein et al., 2004). Como resultado de la clasificación obtuvieron 98 y 15 individuos F₁ sexuales y apomíticos, respectivamente (Stein et al., 2004). Sobre esta población se generaron 687 marcadores moleculares de AFLP y RFLP.

La estrategia de construcción de los grupos de ligamiento fue similar a la descrita anteriormente. Los datos de segregación de ambos progenitores fueron

analizados independientemente y se construyeron mapas materno (Q4188) y paterno (Q4117) (Stein et al., 2007). Los análisis de segregación de los marcadores determinaron que la mayoría de ellos presentaba una relación de segregación 1:1. Este tipo de marcadores representa alelos en dosis simples (ADSs) que son útiles para el mapeo en poliploides (Qu y Hancock, 2001). Se analizaron también marcadores segregantes en una relación 5:1 y distorsionados. Los marcadores 5:1 confirmaron el tipo de herencia tetrasómica que presenta la especie de acuerdo a trabajos previos realizados por Stein et al. (2004). También en el análisis se detectaron marcadores que presentaron una distorsión en su segregación (5 % maternos y 13 % paternos). La mayoría de los marcadores distorsionados generados a partir del genotipo Q4117 (al igual que el *locus* de la aposporía) se caracterizaron por estar sub-representados en la progenie. Esta segregación distorsionada puede deberse a la eliminación de gametas o cigotos controlada por un factor letal parcial localizado en las vecindades del marcador (Cheng et al., 1998). La presencia de un factor letal fue propuesta para explicar la distorsión en la segregación de la aposporía en *P. notatum* (Martínez et al., 2001). Interesantemente, la distribución de los marcadores distorsionados difirieron entre los mapas materno y paterno generados (Stein et al., 2007). En el primero la mayoría de ellos aparecieron distribuidos en varios grupos de ligamiento, mientras que en Q4117 la mayoría se localizó en grupos de ligamiento relacionados con la aposporía. Esta distribución particular indica que esta región está afectada por algún factor letal parcial como fue propuesto por Martínez et al. (2001).

El análisis de ligamiento realizado permitió reconstruir 26 grupos de ligamiento para el genotipo Q4188 y 39 para Q4117 (de un total de 40 grupos en acoplamiento esperados) (Stein et al., 2007). Asimismo se estimó que las longitudes de los mapas materno (Q4188) y paterno (Q4117) fueron de 1.815 cM y 2.708 cM respectivamente. Estos valores indicaron una cobertura del genoma aceptable para un mapa de recombinación. Varios grupos de ligamiento resultaron densamente poblados con marcadores mientras que otros solo incluyeron dos marcadores. Del total de marcadores ADS identificados, 74 no pudieron ser asignados a ningún grupo de ligamiento, lo cual indica que el mapa generado fue incompleto. Por esto es de esperar que trabajos posteriores (como el realizado en esta tesis) permitan incrementar la densidad de marcadores del mismo y contribuyan a la adición de los marcadores no ligados a los

existentes o a la formación de nuevos grupos de ligamiento, permitiendo así la identificación de un conjunto de cromosomas completo.

El mapa genético desarrollado por Stein et al. (2007) permitió asimismo identificar el grupo de ligamiento que lleva el *locus* que controla la aposporía (denominado P17a) en el genotipo Q4117. El mismo grupo mostró características particulares que lo diferenciaron del resto de los grupos de ligamiento detectados en el mapa. Entre estas se encuentran: una fuerte restricción de la recombinación (debido a la presencia de un número de marcadores que mapearon completamente ligados entre sí al *locus* de la aposporía con valores de recombinación entre 1.5 y 5.5 %) y apareamiento preferencial de cromosomas (evidenciado por la identificación de ligamientos en repulsión menores al 33,3 %) (Stein et al., 2004). Los marcadores ligados al *locus* de la aposporía definieron un bloque cromosómico (bloque-apo) que físicamente podría corresponder a un gran fragmento cromosomal de gran tamaño. Aunque es difícil hacer una estimación de la longitud física de la región, debido principalmente a la restricción de la segregación, de acuerdo al número de marcadores que mapearon en esta región y a la cobertura del resto de los marcadores del genoma y aceptando una estimación grosera, este segmento cromosómico podría tratarse de un fragmento de aproximadamente 36 Mbp. Esta característica podría seriamente complicar las estrategias de clonados basado en el mapeo genético para aislar genes responsables de la aposporía. Consecuentemente, métodos de análisis basados en transcriptómica o estudios de mapeo comparativo deben ser considerados para intentar identificar los genes presentes en esta región genómica.

I.4.1.2- Mapeo de marcadores EST-SSR en trigo hexaploide

El mapa de ligamiento genético reportado por Yu et al. (2004a) fue realizado utilizando 124 pares de cebadores polimórficos de EST-SSR de los 160 disponibles (ver más arriba) para mapear 213 *loci* en los parentales de la población de mapeo ITMI (*International Triticeae Mapping Initiative*). En el análisis inicial incluyeron cebadores redundantes (más de uno para un determinado “*supercluster*”) por dos motivos, *i*) para evaluar de manera experimental los parámetros utilizados cuando asignaron secuencias coincidentes por medio del análisis de “*supercluster*”, *ii*) para identificar tantos *loci* polimórficos como fueron posibles. Sin embargo, para el experimento de mapeo solo se

tomaron un par de cebadores polimórficos de cada “*supercluster*”. Yu et al. (2004a) determinaron que 75 (61 %) pares de cebadores amplificaron un único *locus* y 48 (39 %) amplificaron dos o más *loci*. Como es esperado, la proporción de marcadores que detectaron múltiples-*loci* fue el doble que el detectado por estudios previos para marcadores derivados de ADN genómico (20 %) (Röder et al., 1998). Los autores argumentan que esta diferencia posiblemente sea debida a la conservación de secuencia en las regiones codificantes, la poliploidía, y al 25 % - 30 % de duplicación de genes estimado en esta especie (Anderson et al., 1992). De los cebadores que detectaron *loci*-múltiples, ocho mapearon en grupos no-homéologos. Un total de 213 *loci* segregantes generados a partir de los 124 pares de cebadores fueron integrados en el mapa marco publicado de RFLP y SSR sobre la población de ITMI (Nelson et al., 1995a, 1995b, 1995c; Van Deynze et al., 1995; Marino et al., 1996; Röder et al., 1998). Los estudios realizados por Yu et al. (2004a) determinaron que los *loci* asignados no se distribuyeron uniformemente a lo largo de todos los cromosomas. Un total de 149 *loci* generados a partir de 90 marcadores EST-SSRs se han asignado a casi todos los cromosomas. Estudios previos realizados con otro tipo de marcadores utilizados para el mapeo de esta población presentaron un 30 % de *loci* con segregación distorsionada (Röder et al., 1998), sin embargo con los marcadores EST-SSR desarrollados por Yu et al. (2004a) solamente el 13 % de los *loci* presentaron ese tipo de distorsión en la segregación. La mitad de los *loci* distorsionados se distribuyeron en la región distal de los cromosomas.

El estudio realizado por Yu et al. (2004a) sugiere que los EST-SSRs tienden a mapear en regiones de alta recombinación donde los marcadores son menos probables de identificar usando marcadores basados en ADN genómico. La localización preferencial en puntos de alta recombinación aumenta el valor de estos marcadores. El uso de EST-SSRs fue un método eficiente para mapeo de genes expresados. Además los autores pudieron asignar las funciones posibles a varios “*superclusters*” mediante el empleo de BLASTX (E value $< 1 \times 10^{-20}$) (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/Cornell/>). Estos estudios confirmaron que las bases de datos proveen una fuente valuable de secuencias para el desarrollo de marcadores SSR que corresponden a genes transcriptos. Por otro lado, el aumento en la densidad de marcadores en el mapa ITMI con EST-SSRs provee una base para el mapeo comparativo con marcadores ortólogos y da la posibilidad de identificar genes expresados asociados con caracteres agrónomicamente importantes en trigo y otras especies de gramíneas (Yu et al., 2004a).

I.4.2- Mapeo comparativo

En la década de los 90, el mapeo de sondas comunes de RFLP sobre los genomas de especies de gramíneas relacionadas reveló la conservación de marcadores dentro de grandes segmentos cromosomales (Foote et al., 1997; Kilian et al., 1997). El término “*sintenia*” describe la presencia y orden de determinadas secuencias de ADN (incluidos los genes) en un rango de aproximadamente 500 kpb de diferentes especies (Weising et al., 2005). Estos trabajos permitieron detectar colinealidad en los genomas de distintos cereales, a pesar de la enorme diferencia en el tamaño de los genomas. Esta particularidad sugiere que estos bloques cromosomales se han mantenido conservados en un periodo evolutivo de alrededor de 60 millones de años (Salse et al., 2003). Los estudios comparativos han permitido la reconstrucción del hipotético genoma ancestral de las gramíneas sobre la base de 25 bloques de ligamiento de arroz. La combinación en el número y localización de estos bloques (como bloques de Lego) permitió a su vez la formación de los genomas de avena, maíz, trigo, sorgo, caña de azúcar y mijo (Moore et al., 1995; Devos y Gale, 1997; Gale y Devos, 1998). Debido a esto se ha tomado al arroz como base del genoma de las gramíneas y se ha propuesto un modelo de círculos concéntricos que permite explicar la evolución de los genomas de las distintas especies estudiadas (Devos et al., 1998).

La extensión de la conservación puede ser visualizada sobre cromosomas completos mediante la técnica de FISH (llamado *macrosintenia*), pero también existe a nivel de grupo de genes (*microsintenia*). Por ejemplo, una región que contiene genes que codifican para la ausencia de lígulas es ampliamente conservada entre arroz, trigo y maíz (Ahn et al., 1993; Moore, 2000). Sin embargo, translocaciones, duplicaciones, e inversiones han generado también re-arreglos de grandes bloques de secuencias en cada especie. Debido a esto los mapas genéticos deben ser ajustados para detectar *sintenia* (Weising et al., 2005). Las relaciones de *sintenia* han impulsado el uso de marcadores comunes dentro de familias de plantas (por ejemplo, las Poáceas, Devos y Gale, 1997; Bennetzen et al., 2003) así como también entre familias (por ejemplo, entre *Arabidopsis* y leguminosas, Benko-Iseppon et al., 2003; Grant et al., 2000; Lee et al., 2001). En muchos casos, la *microsintenia* ha sido utilizada para el aislamiento de genes específicos. Una vez que un gen correspondiente a una determinada especie es clonado y secuenciado, la información de secuencia puede utilizarse para aislar el gen ortólogo en otra especie.

Los mapas comparativos son útiles para (1) transferir información a través de especies relacionadas, (2) incrementar la densidad de marcadores en regiones cromosómicas específicas, y (3) facilitar el clonado de genes en especies con genomas grandes y complejos a partir de genomas más simples y mejor estudiados.

En los últimos años los proyectos masivos de secuenciación han permitido el conocimiento de las secuencias completas de varias especies de gramíneas. En particular, mapas comparativos de genomas completos han sido desarrollados usando el concepto de análisis basado en secuencia de ADN (Sorrells et al., 2003; La Rota y Sorrells, 2004). Sorrells et al. (2003) construyó mapas comparativos de alta resolución, basados en secuencias de trigo y arroz, utilizando marcadores ESTs. Los resultados de este trabajo apoyaron muchos de los resultados obtenidos anteriormente en cuanto al contenido y orden génico, pero revelaron también numerosas discontinuidades dentro de los bloques (Yu et al., 2004b).

Varias observaciones sugieren que la conservación en el orden de genes entre las gramíneas puede ser mucho menos claro que el sugerido por el modelo del círculo concéntrico (Salse et al., 2003). La detección de *macrolinealidad* de los genomas basado en los análisis de hibridización solamente aporta un indicio aproximado de la conservación a nivel de secuencias. Micro-rearreglos (deleciones, inversiones y duplicaciones) pudieron identificarse por medio del mapeo de alta resolución en regiones donde previamente se había detectado *macrolinealidad* (Salse et al., 2003). Los resultados obtenidos por Salse et al. (2003) sugieren que la colinealidad del genoma es menos extensa que la que fue primeramente propuesta mediante los mapeos de baja resolución y que re-arreglos considerables pueden hallarse por medio de la secuenciación de regiones extensas del genoma.

I.4.2.1- Utilidad de los EST-SSR para mapeo comparativo

Varios estudios demostraron la transferibilidad de los marcadores EST-SSR entre especies (Herron et al., 1998; Eujayl et al., 2000; Scott et al., 2000; Sorrells, 2000a,b). Estos trabajos indicaron que este tipo de marcadores tiene un potencial considerable para el mapeo comparativo. Para que un marcador molecular sea útil en mapeo comparativo el mismo debe identificar *loci* ortólogos en dos o más especies y

exhibir suficiente nivel de polimorfismo dentro de una especie para facilitar la determinación de su localización en el mapa. En el caso de marcadores basados en PCR, este criterio es conflictivo debido a que la variación en secuencia de ADN es esencial para el polimorfismo mientras que la conservación de secuencia de ADN es esencial para diseñar cebadores que funcionen entre diferentes especies. Este conflicto se ve disminuido al utilizar marcadores EST-SSR ya que las secuencias que contienen regiones conservadas de un gen que flanquean una región hiper-variable tal como ocurre en los EST-SSRs son más útiles para diseñar cebadores que funcionen en dos o más especies (Kantety et al., 2002).

I.4.2.1.1- Marcadores EST-SSR en mapeo comparativo entre trigo y arroz

En la última década, el concepto de alineamientos múltiples de segmentos conservados ha permitido la realización de numerosas comparaciones de estructuras de genomas de especies relacionadas (Yu et al., 2004b). La familia de las Poáceas es probablemente la mejor caracterizada en este aspecto, con buenos mapas genéticos comparativos entre-especies (Devos y Gale, 2000).

Los genomas de gramíneas son muy diferentes en cuanto a tamaño (0,45 picogramos en arroz a 11,7 picogramos en avena (Ahn y Tanksley, 1993), nivel de ploidia y número de cromosomas; sin embargo, de acuerdo a lo descrito más arriba los estudios de mapeo comparativo han demostrado que el orden lineal (colinealidad) de los genes está generalmente bien conservado a nivel de grandes segmentos cromosomales (Hulbert et al., 1990; Ahn et al., 1993; Kurata et al., 1994; Van Deynze et al., 1995, 1998; Gale y Devos, 1998).

El trigo hexaploide es una especie con un genoma grande y complejo. El entendimiento de la organización de cromosomas y los análisis genéticos de caracteres agrónomicamente importantes de esta especie, se han beneficiado mediante los análisis comparativos realizados con los genomas de especies más simples como el arroz (Kurata et al., 1994; Sorrells et al., 2003; Gallego et al., 1998; Liu y Anderson, 2003). Yu et al. (2004b) han utilizado marcadores EST-SSRs desarrollados en trigo (Yu et al., 2004a) para construir un mapa comparativo con arroz. En su estudio evaluaron la eficiencia de los EST-SSRs como marcadores moleculares para el mapeo comparativo e

integraron a los mismos a un mapa marco existente de arroz. Para el análisis comparativo utilizaron el mapa de ligamiento de EST-SSRs del genoma de trigo basado en la población ITMI (Nelson et al., 1995a, 1995 b, 1995c; Marino et al., 1996; Röder et al., 1998) desarrollado en el trabajo previo de Yu et al. (2004a) (ver apartado I.4.4). Aproximadamente la mitad de los marcadores ensayados amplificaron dos o más *loci* en arroz. A partir de 74 marcadores que resultaron polimórficos en ambas especies, 131 *loci* (generados por 58 cebadores de EST-SSR anclados) fueron integrados en un mapa marco de arroz compuesto de 93 marcadores (RFLPs y SSRs genómicos) (Gramene (<http://www.gramene.org>)). Los autores reportan que en varios casos diferente número de *loci* fueron amplificados entre las dos especies indicando una duplicación diferencial de genes entre las mismas. Si bien esta es una de las limitaciones esperables cuando se utilizan genes expresados (ya que frecuentemente éstos están duplicados), Yu et al. (2004b) determinaron que la colinealidad de los marcadores en los 12 cromosomas de arroz se conservó en relación al genoma de trigo. Además pudieron determinar dos marcadores EST-SSR que se encuentran ligados al gen responsable para la respuesta al fotoperiodo en ambas especies. Estos marcadores podrían de esta manera ser útiles para mapear este gen en otras gramíneas. Los autores concluyeron que los marcadores EST-SSR son particularmente útiles para construir mapas comparativos marcos debido a que amplifican genes relacionados y proveen puntos de anclaje para los mapas de diferentes especies (Yu et al., 2004b). Las perspectivas futuras de los autores son que mapas comparativos enriquecidos con marcadores anclados EST-SSR facilitarán el uso de arroz como una especie modelo para el mejoramiento otras especies de gramíneas tales como el trigo (Yu et al., 2004b).

I.5- Utilización de marcadores moleculares para estudios filogenéticos

El ordenamiento, agrupamiento y la construcción de dendrogramas a partir de datos cuali y/o cuantitativos han sido extensamente utilizados en el campo de la investigación biológica. Estos análisis son utilizados para comparar grupos de individuos con múltiples caracteres (Weising et al., 2005). El principal propósito de los métodos de estadística multivariada, que analizan este tipo de datos, es condensar las diferencias (de numerosos caracteres) que muestran las entradas, en unas pocas variables fácilmente distinguibles en un espacio multidimensional. Este procedimiento permite reducir la complejidad del análisis de datos y al mismo tiempo representar las diferencias y similitudes de las entradas consideradas, llamadas comúnmente Unidades Taxonómicas Operacionales (*OTUs* por sus siglas en inglés). Las *OTUs* pueden ser individuos, cultivares, poblaciones o especies (Weising et al., 2005).

Los marcadores moleculares han realizado numerosos aportes a este campo de la biología (Weising et al., 2005). La posibilidad de determinar un gran número de caracteres (bandas) en cada una de las *OTUs*, brinda la posibilidad de detectar similitudes y diferencias entre ellas con un alto grado de confianza y reproducibilidad. Distintos tipos de marcadores moleculares han sido utilizados para la determinación de la variabilidad genética en bancos de germoplasma, colecciones de accesiones de

especies silvestres y colecciones de cultivares de especies de interés agronómico (Winzer et al., 2010). Como concepto general, se considera que aquellas OTUs que compartan determinados marcadores se encontrarán más relacionadas que aquellas que muestren patrones diferentes. Los resultados obtenidos pueden representarse como dendrogramas, los cuales muestran las relaciones fenéticas (similitud global) o filogenéticas (historia evolutiva) entre las OTUs. Se pueden distinguir tres estrategias principales para la construcción de dendrogramas:

La primera comprende el método de distancias, también nombrado como análisis de agrupamiento o método fenético (Avice, 1994; Swofford et al., 1996). El punto de entrada es una matriz de pares de datos de distancias, la cual es calculada a partir de los datos primarios (presencia/ausencia de un grupo de marcadores) mediante los algoritmos de Dice (1945) o Jaccard (1908). En el primer paso de la construcción del árbol, las dos OTUs que tienen la distancia mínima son agrupadas, y la matriz de distancia es reducida por una fila y una columna. Después de esto, se realiza una segunda ronda de agrupamiento y una nueva OTU es agrupada al primer par. Este procedimiento se reitera hasta que queda un único OTU remanente. El dendrograma resultante expresa similitudes fenéticas entre los OTUs y por lo tanto son llamados fenogramas. Los mismos no necesariamente reflejan relaciones filogenéticas (Weising et al., 2005).

Otro algoritmo para estimar distancia genéticas muy frecuentemente usado es el método de agrupamiento de pares por promedios no ponderados (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). Este método asume un reloj molecular rígido, lo cual significa que las velocidades evolutivas de todas las ramas del árbol necesitan ser idénticas. Saitou y Nei (1987) desarrollaron un método de agrupamiento más sofisticado llamado “*neighbor-joining*” (NJ). Este algoritmo produce árboles aditivos y no asume velocidades evolutivas idénticas a lo largo de todas las ramas. Todos los métodos de agrupamiento están basados en la similitud global entre pares de OTUs, y por lo tanto la información acerca de los caracteres particulares (como por ejemplo marcadores moleculares) se pierde. Ningún fragmento se considera más informativo que otro. Solamente un fenograma óptimo se produce a partir del grupo de datos y no hay posibilidad de comparar o dar un rango de fenogramas sub-óptimos. Una gran variedad de programas de computación están disponibles para el análisis de datos de este tipo (por ejemplo: NTSYS, InfoStat, Genalex, entre otros). Los árboles resultantes pueden ser un buen

punto de entrada para los análisis más elaborados como por ejemplo el de máxima-probabilidad (ML, por sus siglas en inglés).

La segunda estrategia para construir dendrogramas involucra métodos parsimónicos e intenta reconstruir patrones filogenéticos (Hall, 2001; Page y Holmes, 1998; Swofford et al., 1996). Los árboles parsimónicos son reconstruidos de acuerdo a los principios de cladística (Page y Holmes, 1998; Felsenstein, 2004) y son llamados cladogramas. Estos métodos se basan en el carácter de matriz en si mismo (no se involucran cálculos de distancia). El criterio de máxima parsimonia (MP) es aplicado para comparar árboles topológicos alternativos, es decir, solamente aquellos árboles que explican el grupo de datos con un menor número de cambios son seleccionados. Algoritmos específicos son usados para formar árboles que están en máxima concordancia con este criterio. En contraste con los métodos basados en la matriz de distancia, algunos caracteres (tales como las posiciones de fragmentos o bases) pueden ser más importantes para inferir un árbol particular sobre otros, y la extensión de la homoplasia presente en el grupo de datos puede ser inferida. Desafortunadamente los árboles parsimónicos pueden estar sesgados por múltiples sustituciones y variaciones en la velocidad evolutiva entre los caracteres individuales. También ciertos problemas se originan con el análisis de datos de las huellas dactilares de ADN con este método, incluyendo dominancia, modelos evolutivos sobresimplificados, e interdependencia.

La tercera estrategia se basa en el método de máxima probabilidad (ML), que utiliza métodos estadísticos estándar para un modelo de evolución probabilístico (Huelsenbeck y Crandall, 1997). Este procedimiento intenta hallar el árbol con mayor probabilidad que refleje el grupo de datos reales sobre el fondo de un modelo evolutivo apropiado. El ML solamente es adecuado para datos en los que tales modelos se pueden describir. Este es el caso para los datos de secuencias de ADN, pero solo raramente es adecuado para huellas dactilares de ADN. Este método es, además, muy demandante en cuanto a la capacidad computacional y el análisis de un gran grupo de datos resulta difícil. Últimamente el método de Inferencia Bayesiana de filogenia se ha vuelto muy popular (Hall, 2001; Huelsenbeck et al., 2001; Archibald et al., 2003). Este método intenta hallar un árbol con un máximo de probabilidad a *posteriori* (más que una probabilidad a *priori* como en el ML), es mucho más rápido que el ML, y manipula número de datos mayor. Este método se ha aplicado para el análisis de huellas dactilares de *múlti-locus* derivado de análisis de AFLP (Brouat et al., 2004). El árbol resultante

discriminó exitosamente las cuatro subespecies de *Leonardoxa africana*, una especie nativa de África Central (Brouat et al., 2004).

El soporte estadístico para las ramas individuales de los árboles filogenéticos se puede estimar por varios métodos, tales como re-muestreo con reemplazo (*bootstrapping*) (Felsenstein, 1985), re-muestreo sin reemplazo (*jackknifing* y *jackknifing parsimonico*) (Farris et al., 1996) ó el índice de decaimiento (Breme, 1988; Hale et al., 2002). *Bootstrap* y *jackknife* pueden ser también ser aplicados en árboles ML y fenogramas.

I.5.1-Exploración de datos y frecuencia de alelos

Los análisis genéticos de poblaciones pueden realizarse por dos estrategias diferentes: aquellas basadas en las frecuencias alélicas y aquellos basados en distancias. Para los primeros el cálculo de la frecuencia de alelos es la base de la mayoría de los cálculos posteriores. En el caso de datos de tipo codominantes, los análisis basados en frecuencia incluyen las estadísticas-F, distancia genética de Nei (1978), cálculos de probabilidades genotípicas, probabilidades de identidad y probabilidades de exclusión, entre otros. Un sub-grupo de estos análisis es también aplicado a datos haploides y binarios (Peakall y Smouse, 2006). En contraste, los análisis basados en distancias son relativamente nuevos. En estos análisis el punto de entrada es la conversión de datos genéticos en una matriz de distancia entre los individuos (Peakall y Smouse, 2006). Las matrices de distancias pueden ser calculadas para toda clase de datos genéticos incluyendo datos de marcadores genéticos dominantes, codominantes, haploides y binarios (Peakall y Smouse, 2006). Una vez que la matriz de distancia genética es calculada, es posible realizar análisis genéticos más extensivos que incluyen: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA); Análisis de Coordenadas Principales (PCA); UPGMA y construcción de dendrogramas; análisis de correlación de Mantel, análisis de auto-correlación espacial y TwoGener (Peakall y Smouse, 2006).

I.5.2- Parámetros de diversidad genética utilizados en esta tesis

I.5.2.1- Índice de diversidad de Shannon en genética de poblaciones

El índice de diversidad de Shannon (Shannon, 1948) ha sido ampliamente empleado en ecología para medir biodiversidad pero menos utilizado en genética de poblaciones. En una serie de estudios recientes, Sherwin et al. (2006) y Rossetto et al. (2008) han demostrado tanto por simulación en computadora como con datos reales que el índice de Shannon ofrece propiedades estadísticas ideales para medir la información biológica a través de escalas múltiples. En particular, la capacidad de aplicar el índice a escalas múltiples es única entre las estadísticas poblacionales comúnmente empleadas (Peakall y Smouse, 2006).

I.5.2.2- PhiPT

Es una medida de diferenciación genética de poblaciones para cuando se trabaja con datos binarios, que es análogo al F_{ST} . Esta es una distancia métrica euclideana necesaria para el AMOVA cuyo valor varía entre -1 y 1. PhiPT es calculada como la proporción de varianza entre poblaciones, relativa a la varianza total. PhiPT representa la correlación entre individuos dentro de una población, relativa al total (Peakall y Smouse, 2006).

I.5.2.3-Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Un importante procedimiento estadístico que permite una división jerárquica de la variación genética entre poblaciones es el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). El mismo es un análisis basado en distancia aplicable a toda forma de datos genéticos (Peakall y Smouse, 2006).

En general este examen estadístico parte de una hipótesis nula (H_0) y una alternativa (H_1). Típicamente la hipótesis nula tiene que ver con la condición de “No diferencia” (Peakall y Smouse, 2006). Así, por ejemplo pueden enunciarse:

- H_0 = No hay diferencias genéticas entre las poblaciones ($\Phi_{IT} = 0$, o $F = 0$ o $R = 0$).
- H_1 = Hay diferencias genéticas entre poblaciones ($\Phi_{IT} > 0$, o $F > 0$, o $R > 0$).

De esta manera, en el planteo realizado para el análisis de AMOVA, nuestra hipótesis nula (H_0) supone que las sub-poblaciones a comparar pueden ser parte de una única gran población. Si esto es real, habrá poca diferencia entre las sub-poblaciones. Si se mezclan las muestras en grupos de datos y se calcula el AMOVA para cada nueva mezcla, se deberían obtener valores cercanos al esperado al azar. Debido a los efectos del muestreo, los resultados variarán de una mezcla a otra. Por otro lado, si se realizan múltiples mezclas (100 a 1000 veces) se puede obtener una buena estimación del valor que se esperaría si la hipótesis nula es real (Peakall y Smouse, 2006). Esta es la razón para realizar exámenes estadísticos con permutaciones al azar que es utilizado en un análisis de AMOVA. Para determinar si el valor observado es significativamente mayor que aquel esperado por azar, se compara el valor observado contra los resultados de las permutaciones. Si el valor observado es mayor que los valores permutados 95 % o más veces, se declara que los resultados tienen una significancia de 5 %. A los fines de obtener validez estadística, el número de permutaciones realizadas en un análisis debe ser superior a 999 (Peakall y Smouse, 2006).

1.5.2.4 - Análisis de Coordenadas Principales

Matrices tales como las matrices de a pares de Φ_{IT} pueden ser difíciles de leer y de interpretar. Idealmente se necesita una forma de visualizar el patrón de relaciones genéticas contenidas en una matriz. El Análisis de Coordenadas Principales (PCA) provee esta herramienta (Peakall y Smouse, 2006). El PCA representa un procedimiento por el cual los patrones esenciales pueden revelarse, sin alterar los datos en sí mismos. Con respecto a esto el PCA es distinto a los métodos de construcción de árboles, tales como UPGMA donde los algoritmos siempre asumen una estructura genética jerárquica. Mientras esta es una asunción razonable a niveles taxonómicos superiores, no es necesariamente real a nivel de la población (Peakall y Smouse, 2006). Otra desventaja de los métodos de construcción de árbol para el análisis de poblaciones, es que a menudo el número de muestras analizadas es grande, haciendo su generación

inmanejable, y difícil la interpretación del mismo. Por otro lado, los métodos de construcción de árbol ofrecen algunos procedimientos para examen estadístico de los grupos, tales como los exámenes de “*bootstrap*”, que no están disponibles con el PCA. Brevemente el PCA es una técnica multivariada que permite encontrar y graficar los patrones principales dentro de un grupo de datos multivariado (por ejemplo, *loci* múltiples y muestras múltiples) (Peakall y Smouse, 2006).

I.5.3- Estudios filogenéticos en el género *Paspalum* con marcadores moleculares

Considerables esfuerzos taxonómicos se han dedicado al género *Paspalum*, especialmente en relación a la clasificación infragenérica (Chase, 1929, y manuscrito no publicado; Pilger, 1941). Sobre las bases de los caracteres exomorfológicos, el género fue subdividido en secciones y/o grupos informales por diferentes autores (Döll, 1877; Chase, 1929; Pilger, 1941). El agrupamiento informal propuesto originalmente por Chase (1929), que se basa en similitudes morfológicas, es ampliamente aceptado y originalmente comprende dos sub-géneros y 27 grupos informales. A pesar de la publicación de un número de revisiones taxonómicas de grupos particulares en los últimos 10 años (Oliveira y Valls, 2002; Oliveira, 2004; Zuloaga y Morrone, 2001, 2005; Zuloaga et al., 2004; Denham, 2005), las hipótesis filogenéticas están aún fragmentadas (Rúa y Aliscioni, 2002; Denham et al., 2002; Souza-Chies et al., 2006; Denham y Zuloaga, 2007; Rúa et al., 2007; Scataglini et al., 2007; Giussani et al., 2009). En consecuencia, la filogenia del género en su conjunto no se encuentra actualmente disponible y las relaciones infragenéricas siguen siendo inciertas y requieren más estudios (Rúa et al., 2010).

I.5.4- Estudios filogenéticos con marcadores moleculares EST-SSR

El alto nivel de conservación de muchos marcadores del tipo EST-SSR a través de especies distantemente relacionadas indica el potencial de estos marcadores para ser utilizados en diferentes especies de gramíneas. La conservación de los marcadores EST-SSR entre las distintas especies de gramíneas es predecible por dos razones. Primero, los genomas de gramíneas son conservados aún entre especies distantemente relacionadas (Ahn y Tanksley, 1993; Kurata et al., 1994; Gale y Devos, 1998).

Segundo, como ya se mencionó previamente, al derivar de regiones transcriptas del ADN, los marcadores EST-SSR son más conservados y tienen un mayor nivel de transferibilidad que los marcadores SSR genómicos (Kantety et al., 2002). Estudios realizados con EST-SSR de *Festuca alta* sobre 12 especies de gramíneas de la familia de Poáceas indicaron que estos marcadores tienen altos niveles de polimorfismo entre las gramíneas forrajeras (Mian et al., 2005). De esta manera se evidencia que los marcadores EST-SSR son bastante polimórficos a través de especies y pueden usarse para discriminar genotipos con amplias diferencias genéticas.

I.6-Hipótesis de trabajo

- Marcadores EST-SSR desarrollados en trigo y arroz pueden transferirse a especies de *Paspalum* e identificar secuencias ortólogas que puedan utilizarse para estudios de mapeo comparativo.
- Marcadores EST-SSR localizados en los cromosomas 2 y 12 de arroz se encuentran asociados al fragmento cromosómico que contiene al *locus* responsable de la aposporía en *P. notatum*.
- Marcadores generados a partir de secuencias conservadas de genes relacionados al desarrollo del megagametofito permitirán la localización de genes candidatos en el mapa genético de *P. notatum*.
- Los marcadores SSR genómicos específicos de *P. notatum* se localizan en regiones dispersas del genoma de la especie.
- Los marcadores EST-SSR y SSR genómicos son adecuados para la realización de estudios filogenéticos en el género *Paspalum*.

II OBJETIVOS

II- OBJETIVOS

II.1- Objetivo general

El objetivo general del proyecto de tesis fue la transferencia y desarrollo de marcadores moleculares de secuencia conocida (EST-SSR, SSR genómicos y COS) a *Paspalum notatum* y la caracterización del genoma de la especie por medio de estudios de mapeo comparativo. Asimismo, fue analizada la utilidad de estos marcadores en distintas especies del género y su capacidad para la realización de estudios de filogenia.

II.2- Objetivos específicos

II.2.1- *Transferencia y desarrollo de marcadores de secuencia conocida*

- a) Seleccionar a partir de bases públicas un conjunto de marcadores EST-SSR distribuidos uniformemente por el genoma de arroz.
- b) Ensayar los marcadores seleccionados en los genotipos parentales de la población de mapeo de *P. notatum* (Q4188 y Q4117) y determinar condiciones de amplificación reproducibles para la especie.
- c) Seleccionar un grupo de marcadores que muestren amplificaciones consistentes, ensayarlos en la población de mapeo y analizar el tipo de segregación obtenida para cada uno.

- d) Seleccionar los marcadores segregantes (1:1) a partir de Q4188 y Q4117 y localizarlos en los mapas de ligamiento genético de ambos genotipos ya disponibles.
- e) Localizar mediante un análisis *in silico* secuencias ortólogas de los marcadores localizados en *P. notatum* en los genomas de arroz y maíz.
- f) Realizar estudios de mapeo comparativo mediante la determinación de la distribución y orden de los marcadores en *P. notatum* y su localización en los mapas de arroz y maíz.
- g) Seleccionar genes relacionados con componentes de la apomixis en especies de gramíneas y apilar las secuencias disponibles.
- h) Diseñar cebadores específicos sobre las regiones conservadas de cada uno y ensayar su amplificación sobre el ADN de Q4188 y Q4117.
- i) A partir del punto anterior desarrollar marcadores COS (*conservative orthologous set*) que puedan localizarse en los mapas genéticos de ambos genotipos.

II.2.2- Ensayos de marcadores desarrollados en este trabajo sobre especies del género *Paspalum* y estudios de filogenia.

- a) Seleccionar un grupo de individuos pertenecientes a distintas especies y grupos taxonómicos del género.
- b) Ensayar los marcadores desarrollados en el punto anterior sobre los mismos y determinar condiciones reproducibles de amplificación.
- c) Analizar las características genéticas de cada marcador sobre los individuos utilizados y determinar índices de polimorfismo correspondientes.
- d) Realizar estudios de agrupamiento y determinar los parámetros de variabilidad poblacional.

III MATERIALES Y MÉTODOS

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1- Material vegetal

III.1.1- Material vegetal utilizado en los experimentos de amplificación de marcadores EST-SSR y mapeo genético en *Paspalum notatum*

Como material vegetal se utilizaron los genotipos tetraploides ($2n=4x=40$) Q4188, Q4117 y una población F_1 derivada de ambos, segregante por el modo de reproducción. Dicha población fue desarrollada en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) – Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina, por Stein et al. (2007). La misma fue utilizada en estudios previos en la especie sobre el tipo de herencia de las razas tetraploides, la identificación de marcadores moleculares completamente ligados al carácter aposporia y la construcción de un mapa de ligamiento genético basado en marcadores de AFLP y RFLP (Stein et al., 2004; Stein et al., 2007). El genotipo Q4188 es un tetraploide completamente sexual de origen experimental que se originó a partir de un cruzamiento entre las plantas Q3664 x Q3853 (Quarin et al., 2003). Q3664 es un tetraploide experimental generado en Tifton (Georgia, EEUU) por cruzamientos controlados entre un tetraploide sexual inducido por colchicina a partir de *P. notatum* var *saurae* ($2x$) y un tetraploide apomictico de estigmas blancos. Q3664 tiene estigmas blancos y es apomictico facultativo (produce 70 % de sacos embrionarios de tipo meiótico y 15% de sacos de tipo apospórico) (Quarin et al., 1984; Ortiz et al., 1997). La accesión Q3853 es un tetraploide apomictico natural

nativo del sur de Brasil. El modo de reproducción de Q4188 fue estudiado por métodos citoembriológicos y moleculares, determinándose que sólo produce sacos embrionarios de tipo meiótico y progenies de origen sexual (Quarin et al., 1984; Ortiz et al., 1997). Q4117 fue colectado de una población natural del estado de Río Grande do Sul, Brasil por C.L. Quarin (Ortiz et al., 1997). Esta planta fue clasificada como apomíctica obligada debido a que genera un 98 % de sacos embrionarios de tipo apospórico y progenies exclusivamente de tipo materno (Martínez et al., 2001; Ortiz et al., 1997).

La población segregante fue generada mediante cruzamientos controlados entre Q4188 (como progenitor femenino) y Q4117 (como dador de polen) durante el verano de 2003-2004 (Stein et al., 2007). Los individuos F₁ fueron clasificados de acuerdo a su modo de reproducción en apomícticos (generan sacos embrionarios de tipo apospórico) o sexuales (producen exclusivamente sacos embrionarios meióticos) utilizando los marcadores moleculares de RAPD UBC243-377 y UBC259-1157, previamente detectados como completamente ligados al carácter aposporía en una población derivada de los mismos genotipos parentales (Martínez et al., 2003) así como también por análisis citoembriológicos al momento de la anthesis (Stein et al., 2004). La población original contaba con 113 individuos, 15 apomícticos y 98 sexuales (Stein et al., 2004). Para los experimentos de mapeo de los marcadores EST-SSR y SSR genómicos realizados en esta tesis se utilizaron 65 individuos (nueve apomícticos y 56 sexuales) remanentes de la población original.

III.1.2- Material vegetal utilizado en el análisis de transferibilidad de los marcadores EST-SSR

Para analizar la transferibilidad de los marcadores EST-SSR ensayados en *P. notatum* a otras especies del género, se utilizaron 33 introducciones correspondientes a seis grupos taxonómicos informales que comprenden 11 especies diferentes (Tabla I). Las mismas cuentan con distintos niveles de ploidía y modo de reproducción (Tabla I). Todas las introducciones utilizadas pertenecen al banco de germoplasma vivo del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) – Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina. Las plantas experimentales fueron seleccionadas y cedidas por el Prof. Ing. Camilo L. Quarin y el Dr. Francisco Espinosa del IBONE. Como control externo del agrupamiento se utilizó ADN de trigo *Triticum aestivus* cv. Federal 2n= 6x = 42.

Tabla I: Material vegetal utilizado en el análisis de transferibilidad de marcadores EST-SSR a especies de *Paspalum*

Grupo ¹	Especie	Accesión	Origen y/o lugar de colección	2 n ²	Modo rep
Plicatula	<i>P. lenticulare</i>	V-11724 (2)	BR, GO, 39Km SW de Gaçu	4x	Apo
	<i>P. limbatum</i>	N188 (3)	Par, 50Km NE de Concepción	2x	Sex
	<i>P. guenoarum</i>	Chané FCA (4)	BO, Santa Cruz, Concepción	4x	Apo
		Baio (5)	-	4x	Apo
		Azulado (6)	-	4x	Apo
		cv. Rojas (7)	Paraguay	4x	Apo
	<i>P. atratum</i>	CambáFCA (8)	BR, MS, Terenos	4x	Apo
	<i>P. nicorae</i>	MS5 (9)	A, Corrientes. P. arqueológico	4x	Apo fac.
Livida	<i>P. alcalinum</i>	MS1 (10)	A, Chaco	5x	Apo
		Q4303 (11)	Paraguay	6x	Apo
Dilatata	<i>P. urvillei</i>	Q4226 (12)	Brasil	4x	Sex
	<i>P. dilatatum</i>	Q3952 (13)	UR, Montevideo	4x	Sex
		H163 (14)	A, Misiones, Posadas	5x	Apo
		69-12 chirú (15)	UR, (Obtenido por Millot)	6x	Sex
		Q4081 chirú(16)	UR, Paysandú, Molles	6x	Apo
		Q2960 (V) (17)	A, Corrientes, Virasoro	4x	Sex
		LS3 (18)	A, Zavalla, Parque Villarino	5x	Apo
Decumbentes	<i>P. unispicatum</i>	U15 (19)	A, Chaco, 3 km Campo Largo	2x	Sex
		MS14 (20)	A, Formosa, Pozo del Tigre	3x	Apo
Notata	<i>P. notatum</i>	Tif9 (21)	USA, Georgia	2x	Sex
		Q4295 (22)	A, Córdoba, Santa Rosa de Calamuchita	3x	Apo
		Q4084 (23)	A, Santa Fe, Cayastá	2x	Apo
		Q4188 (24)	HíbridoF1, Q3664x Q3853	4x	Sex
		Q4117 (25)	BR, Río Grande do Sul	4x	Apo
		Q3775 (26)	México, Tamaulipas	4x	Apo
		Q4181 (27)	Cuba	4x	Apo
		Q4010 (28)	BR, MS, Tres Lagos	4x	Apo
		SV2893 (29)	Perú, Prov. Cajabamba	4x	Apo
		ST2369 (30)	BO, Santa Cruz de la Sierra	4x	Apo
		N160 (31)	Paraguay, Amambay	4x	Apo
		Q4276 (32)	A, Corrientes	4x	Apo
Anachyris	<i>P. simplex</i>	U36 (33)	A, Chaco	3x	Sex
		Q4121 (34)	A, Santa Fe, Alejandra	4x	Apo

A: Argentina, BR: Brasil, UR: Uruguay, Par.: Paraguay, BO: Bolivia.² Nivel de ploidía, Modo rep: Modo de reproducción; Apo: Apomítico, Sex: Sexual, fac.: facultativa.¹ De acuerdo a Zuloaga y Morrone (2005). Las accesiones fueron representadas en los estudios de filogenia por los números entre paréntesis a la derecha de su nombre.

III.2- Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de las plantas experimentales se realizó según la técnica descrita por Saghai-Marooft et al. (1984) con las siguientes modificaciones: aproximadamente 6 g de tejido fresco de hoja se congelaron en N₂ líquido y se disgregaron mecánicamente con pilón y mortero hasta obtener un polvo fino. Cada muestra fue transferida a un tubo de polipropileno de 50 ml conteniendo 20 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 700 mM; EDTA 50 mM pH 8,0; CTAB 2% p/v y 2-β mercapto etanol 140 mM) e incubada a 65 °C durante una hora con agitación. Se agregaron 10 ml de cloroformo, se mezcló durante 10 min, se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min y se recuperó la fase acuosa. Luego de una segunda purificación con cloroformo, se agregó un volumen de isopropanol frío a la fase acuosa obtenida (para precipitar el ADN) y se incubó a -20 °C por 16 h. El ovillo de ADN precipitado en solución fue recogido con una varilla de vidrio (o centrifugado a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C), lavado 20 min en una solución de etanol 76 %, acetato de sodio 0,2 M, secado al aire, resuspendido en 700 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; pH 8,0) y transferido a tubos eppendorff de 1,5 ml. Cada muestra fue incubada con 5 µl ARNasa (10 mg/ml) a 37 °C durante 1 hora y posteriormente re-precipitada con 5% v/v de NaCl 5M y un volumen de isopropanol. Finalmente, la preparación de ADN genómico se centrifugó a 10.000 rpm por 20 min, se lavó el precipitado con etanol 70%, se secó y disolvió en 500 µl de agua destilada estéril. Las muestras de ADN se cuantificaron por espectrofotometría a 260 nm y se estimó la pureza de la extracción empleando el índice de la relación de absorbancias a 260 nm/280 nm (Sambrook et al., 1989). La integridad de las muestras se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (Sambrook et al., 1989).

III.3- Generación de marcadores moleculares en *Paspalum*

III.3.1- Amplificación de marcadores EST-SSR

Las condiciones de reacción y amplificación por PCR de los marcadores EST-SSR fueron realizadas inicialmente según lo descrito por Yu et al. (2004b) y luego determinadas empíricamente para cada caso en que no fue posible obtener amplicones

con la metodología anterior. Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando 0,25 μ M de cebadores, 50 ng de ADN genómico, 1X de solución reguladora, 1,5 mM de $MgCl_2$ 200 μ M de cada dNTP (Promega) y 1,5 U de *Taq* polimerasa (Promega). Las condiciones de amplificación consistieron de una etapa inicial de desnaturalización de 3 min a 94 °C seguido de ciclos de amplificación en el cual la temperatura de anillado disminuyó hasta un mínimo (tipo “*touchdown*”) (Don et al., 1991). Las mismas comprendieron 10 ciclos con un paso de desnaturalización de 1 min a 94 °C y un paso de extensión de 1 min a 72 °C. El paso de anillado inicial fue de 1 min a la temperatura inicial (65 ó 55 °C) por un ciclo y subsecuentemente fue reducido en 0,5 °C por cada ciclo hasta alcanzar la temperatura final (60 ó 50 °C, respectivamente). Esta temperatura de anillado final fue empleada para los últimos 35 ciclos de amplificación, seguida de un ciclo de elongación a 72 °C de 10 min. Las temperaturas de anillado iniciales fueron determinadas empíricamente para cada marcador utilizando un rango de temperaturas de 55 a 65 °C. Para cada par de cebadores se ensayaron cuatro temperaturas diferentes sobre los genotipos parentales Q4188 y Q4117 de la población de mapeo por medio de una PCR en gradiente térmico. Para la determinación de las mismas se consideró la T_m calculada a partir de la fórmula: $T_m: 4\text{ }^\circ\text{C} \times (N^\circ \text{ de } (G's+C's)) + 2\text{ }^\circ\text{C} \times (N^\circ \text{ de } (A's + T's))$ y también la presencia de posibles fallas en los apareamientos de bases del cebador (*miss match*). A partir de la T_m calculada se tomó un rango de temperatura de anillado que comprendió 4 °C por arriba y 2 °C por debajo de la misma. Las reacciones de optimización de la temperatura de anillado se realizaron utilizando un termociclador con gradiente marca BIOER, Gene Pro-Thermal Cyclor y el Modelo TC-E-96G.

III.3.2- Amplificación de marcadores SSR genómicos

Para la obtención de marcadores SSR genómicos se utilizó un grupo de cebadores desarrollados previamente por Cidade et al. (2009). Los mismos fueron generados específicamente en *Paspalum notatum* a partir de la selección de clones con secuencias repetitivas de la especie. El grupo de marcadores consiste de 11 pares de oligonucleótidos (Anexo: Tabla II) que generaron fragmentos polimórficos en 25 accesiones de *P. notatum* de la colección de germoplasma de la Facultad de Agronomía de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS) y la estación Pecuaria Sudeste del EMBRAPA, São Carlos, Brasil y mostraron amplificación cruzada cuando

se los ensayó en otras tres especies de *Paspalum* (Cidade et al., 2009). Las condiciones de amplificación por PCR fueron las descritas por Cidade et al. (2009). Los fragmentos de PCR fueron amplificados utilizando un termociclador MJ Research. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l, consistiendo de 0.8 μ M de cada cebador, 20 ng de ADN genómico, 1X de solución reguladora, 1,5 mM de $MgCl_2$ 0,15 mM de cada dNTP (Promega), 1 U Taq ADN polimerasa (Promega). Las condiciones de amplificación consistieron de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C de 1 min, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C y un paso de 5 min de extensión final a 72 °C.

III.3.3- Generación de Marcadores COS

Para obtener posibles marcadores COS en *P. notatum* se seleccionaron manualmente a partir de bases de datos públicas (NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov) secuencias de genes relacionados a componentes de la apomixis en gramíneas: *serk* (*somatic embryogenesis like kinase*) (Schmidt et al., 1997; Albertini et al., 2005), *apostart* (Albertini et al., 2005), *pkd* (protein kinase domain) (Calderini et al., 2006) y *baby boom* (Conner et al., 2008) de arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), poa (*Poa Pratensis*) y Pennisetum (*Pennisetum ciliare*). En base a los alineamientos de secuencias de las distintas especies, se identificaron las regiones conservadas de cada uno de los genes en estudio y se diseñaron cebadores para su amplificación por PCR a partir del ADN genómico de *P. notatum* (Anexo: Tabla IV). La secuencia de los cebadores fue determinada utilizando el programa informático Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>). En cada caso se seleccionaron un cebador sobre el extremo 5' de la hebra codificante (*forward*) y dos sobre el extremo 3' (*reverse*) de la hebra templado. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 50 μ l utilizando 20 pmoles de cebadores, 100 ng de ADN genómico, 1X de solución reguladora, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP (Promega) y 1,5 U de Taq polimerasa (Promega). Los ciclos de amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 90 °C de 5 min seguido de 30 ciclos que consistieron de 30 s a 90 °C, 1 min a 50-57 °C y 2 min a 72 °C con un paso final de 5 min de extensión a 72 °C. La capacidad de los amplicones para revelar polimorfismos entre Q4188 y Q7117 se analizó directamente en geles de agarosa al 2,5 %. En los casos en que se detectaron

polimorfismos entre los genotipos parentales, las reacciones de amplificación se repitieron en la población de mapeo. La localización de los marcadores COS obtenidos en el mapa genético de *P. notatum* se realizó de acuerdo a lo descrito por Stein et al. (2007) (ver más abajo).

III.4-Electroforesis de marcadores microsatélites en geles de acrilamida desnaturalizantes

Los productos de amplificación de los marcadores EST-SSR y SSR genómicos fueron suplementados con 5 µl de buffer de siembra (5 ml de formamida 95% p/v, 100 µl de EDTA 0,5M a pH 8 y 5 ng de azul de bromofenol), desnaturalizados a 95 °C por 5 min y sembrados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5 % (acriamida:bisacrilamida (19:1) 5 %, TBE 0,5 X, urea 7,5 M). La electroforesis se realizó empleando los equipos de secuenciación Gibco-BRL modelo S2, USA y Scie-Plas, USA a 60 W por 2:15 h (1 h sin muestras y 1:15 h con muestras) usando como soluciones reguladoras TBE 0,5 X y 1 X (pH 8,0) en los reservorios superior e inferior, respectivamente. Los amplicones se revelaron por tinción con nitrato de plata (AgNO₃) siguiendo el protocolo descrito por el "DNA Silver Staining System" (Promega). Brevemente, el gel se incubó 20 min en solución fijadora (ácido acético glacial 10 % v/v), seguido de dos lavados en H₂O_d de 5 min cada uno e incubación en solución de tinción (AgNO₃ 1 g/l, formaldehído 0,1 % v/v) por 30 min. Luego se lavó por 10 s en H₂O_d y se reveló con solución desarrolladora (carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 0,1 % v/v, tiosulfato de sodio 2 mg/l) preenfriada a 4 °C. Al visualizar las bandas de amplificación la reacción de tinción se detuvo con el agregado de la solución fijadora. Los geles se lavaron exhaustivamente con agua destilada y secaron en estufa a 37 °C por al menos 2 h. Los marcadores de EST-SSR fueron observados directamente sobre el vidrio. Las bandas obtenidas fueron nombradas con las siglas "*Ksummx/Cnlmx*" o "*Ksumpx/Cnlpx*" correspondientes a la series originales de cada marcador (Univresidad Estatal de Kansas, USA y la Universidad de Cornell, Ithaca Nueva York, USA, respectivamente), seguidas por la letra m o p según se trate de una banda obtenida a partir de Q4188 o Q4117, respectivamente y por una letra (x) indicativa de su migración relativa en el gel sobre las muestras de *Paspalum* (correspondiendo una "a" a la banda más pesada).

III.5- Clasificación de los marcadores moleculares en la población de mapeo

Debido a que la población de mapeo utilizada en este trabajo fue generada a partir del cruzamiento de dos genotipos parentales altamente heterocigotas (Stein et al., 2007), los marcadores moleculares derivados de la meiosis materna y paterna fueron analizados por separado (Ritter et al., 1990). Se confeccionaron dos archivos de datos conteniendo los resultados de segregación de los marcadores en la población de mapeo, uno conteniendo exclusivamente los datos de segregación del progenitor femenino Q4188 (clasificados como maternos) y otro con los datos del progenitor masculino Q4117 (clasificados como paterno). Aquellos marcadores segregantes presentes en ambos progenitores (marcadores biparentales) se consideraron como puentes alélicos (Ritter et al., 1990) y fueron incluidos en un archivo independiente.

Los valores de segregación observados para cada marcador que mostró polimorfismo entre los progenitores fue contrastado mediante una prueba de χ^2 [$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \left(\frac{O-E}{E} \right)^2$] a un $p > 0,01$, con los valores esperados para las distintas combinaciones alélicas posibles en un organismo tetraploide en caso de herencia disómica o polisómica (Tabla II). Entre ellos se identificaron: *i*) alelos en dosis simple (ADS, Aaaa) y *ii*) alelos en dosis dobles (ADD, AAaa). Los ADS corresponden a marcadores presentes en uno de los genotipos parentales y ausentes en el otro, que muestran una relación de segregación por presencia/ausencia en la población de 1:1. Esta relación es independiente del nivel de ploidía y el tipo de herencia del organismo (Wu et al., 1992). Los ADD corresponden a los marcadores presentes en más de una dosis en uno de los genotipos parentales que segregan en la población. Las relaciones de presencia/ausencia esperadas en caso de segregación cromosómica será 5:1 en caso de autotetraploidía y 3:1 o 1:0 en caso de alotetraploidía (Lacadena, 1988). Los marcadores correspondientes a las otras dos configuraciones multiplexas posibles (AAAa y AAAA) estarán presentes en todos los individuos F_1 y por lo tanto serán no segregantes (Lacadena, 1988). Se determinó también la presencia de marcadores segregantes desde ambos genotipos. Las relaciones de segregación esperadas para estos marcadores se muestran en la Tabla II. Se determinaron como marcadores de tipo puente alélico a aquellos que se encuentran en dosis simple en los dos genotipos parentales y cuya segregación esperada es 3:1 para ambos tipos de herencia (Ritter et al., 1990).

Finalmente, se evaluó la presencia de marcadores con segregación distorsionada, cuyos valores de presencia/ausencia no se ajustaron a ninguna de las hipótesis esperadas ($\chi^2 > 7$; $p < 0,01$).

Tabla II: Segregaciones esperadas de marcadores maternos, paternos (ADS y ADD) y biparentales en la población de mapeo, tanto para auto como para alotetraploidía (herencia tetrasómica y disómica, respectivamente).

Tipo de marcador		Configuración parental	Tipo de herencia	Relación de segregación (presencia/ausencia)
Materno (1/0) ^a Paterno (0/1) ^b	ADS ^d	Aaaa x aaaa	Tetrasómica	1:1
			Disómica	1:1
Materno/Paterno (1/1) ^c	ADD ^e	AAaa x aaaa	Tetrasómica	5:1
			Disómica	3:1 o 1:0 ^h
	ADT ^f /ADC ^g	AAAa x aaaa	Tetrasómica	1:0
		AAAA x aaaa	Disómica	1:0
	Puente alélico	Aaaa x Aaaa	Tetrasómica	3:1
			Disómica	3:1
		AAaa x Aaaa	Tetrasómica	11:1
			Disómica	7:1 o 1:0 ^h
	AAaa x AAaa	Tetrasómica	35:1	
		Disómica	15:1 o 1:0 ^h	

a: marcadores presentes en el genotipo materno y ausentes en el paterno

b: marcadores presentes en el genotipo paterno y ausentes en el materno

c: marcadores presentes en ambos genotipos

d: alelos en dosis simple

e: alelos en dosis doble

f: alelos en dosis triple

g: alelos en dosis cuádruple

h: relaciones de segregación esperadas según que los alelos estén en cromosomas homeólogos u homólogos.

III.6- Mapeo y localización de marcadores SSR y COS en el genoma de *P. notatum*

Los datos de segregación de los marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS de cada genotipo parental se analizaron en forma independiente sobre la base de datos

de los mapas de ligamiento marcos de cada uno de los progenitores (Q4188 y Q4117) desarrollado previamente (Stein et al., 2007). Los mismos fueron construidos utilizando marcadores de AFLP y RFLP sobre la misma población de mapeo utilizada en este trabajo de tesis (Stein et al., 2007). La ubicación de los marcadores SSR en los mapas materno y paterno se estableció considerando las siguientes configuraciones alélicas: Aaaa x aaaa (presencia de banda en Q4188 y ausencia en Q4117) y aaaa x Aaaa (presencia de banda en Q4117 y ausencia en Q4188), respectivamente. En ambos casos también se consideraron los marcadores distorsionados (ya que el carácter aposporia y un grupo importante de marcadores fuertemente ligados a éste presentaron ese tipo de segregación) y marcadores biparentales cuya configuración ajustó al modelo Aaaa x Aaaa (Stein et al., 2007).

Un primer análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa de mapeo Mapmaker 3.0/Exp. (Lander et al., 1987) codificando los datos genéticos únicamente de los marcadores en dosis simples (ADS) (1:1) como en una población de tipo “retrocruza” (opción de Mapmaker: F_2 backcross), donde la presencia o ausencia de un determinado marcador indica heterocigosis u homocigosis, respectivamente, para el locus analizado. Las unidades de mapeo en cM derivaron de la función Kosambi (1944). Para la asignación de marcadores a los grupos de ligamiento existentes se utilizó el comando de Mapmaker 3.0/Exp. “assign” por medio del cual los nuevos marcadores incorporados a la base de datos se asignan a los grupos de ligamiento existentes con un valor umbral de LOD score > 2.0 (Lander et al., 1987). Luego de identificados los grupos de ligamiento que incluían marcadores de SSR, el mejor orden de estos marcadores dentro de cada grupo se determinó usando las funciones del programa “compare” (para grupos de hasta cinco marcadores) u “order” (para grupos con más de cinco marcadores). La opción “ripple” se utilizó para verificar el orden establecido. El comando “error detection on” fue empleado para detectar los posibles errores debidos a dobles entrecruzamientos entre marcadores cercanos (< 15 cM a un $p < 0.01$). Una vez establecido el ordenamiento más probable se fijó un marco para cada grupo (comando “framework”). Los grupos resultantes fueron graficados utilizando el comando “draw map” (Lander et al., 1987).

A fin de detectar nuevos grupos de ligamiento, los marcadores que no fueron asignados a ninguno de los grupos definidos por Stein et al. (2007), junto a marcadores de AFLP y marcadores funcionales libres ya existentes, fueron seleccionados y agrupados a un LOD score > 3.0. Los nuevos grupos formados fueron analizados siguiendo la

metodología descrita más arriba y nombrados consecutivamente siguiendo los criterios definidos previamente (Stein et al., 2007).

Un segundo análisis de mapeo de los marcadores SSR fue realizado con el programa JoinMap3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001). Este programa fue diseñado para estimar datos de ligamiento genético en varios tipos de poblaciones como F_2 (derivada del cruzamiento entre 2 F_1 s), BC_1 (obtenida por retrocruza de una F_1 por uno de los individuos parentales), RILs (líneas endocriadas recombinantes, derivadas de la autofecundación por semilla simple de un determinado número de F_2 s por varias generaciones), DHs (dobles haploides, desarrolladas a partir de las gametas de una F_1) y CP (derivada del cruzamiento entre dos progenitores altamente heterocigotas, donde no es posible obtener líneas puras y donde la fase de ligamiento es generalmente desconocida) (Van Ooijen y Voorrips, 2001). El módulo para el análisis de ligamiento en poblaciones del tipo CP es especialmente adecuado para el tipo de población disponible de *P. notatum*, debido a que ambos progenitores resultan heterogéneos en cuanto al contenido de *loci* en homo u heterocigosis y donde es posible detectar *loci* con distintos tipos de segregación en la misma población de mapeo (ej: 1:1, 3:1 o 5:1) (Stein et al., 2007). Otra de sus principales ventajas es que permite “combinar” mapas derivados de distintas poblaciones (o datos bibliográficos) si se dispone de marcadores en común (Van Ooijen y Voorrips, 2001). Para el análisis de ligamiento con JoinMap3.0 se construyeron como en el caso anterior dos archivos de datos: uno para el progenitor Q4188 y otro para Q4117 en los que incluyeron los marcadores 1:1 segregantes de cada progenitor, respectivamente, y los marcadores 3:1 segregantes desde ambos genotipos (1:1 + 3:1). Cada archivo de datos por separado fue usado como archivo de entrada del programa. Los grupos de ligamiento se definieron a LOD 8 para Q4188 y LOD 5 para Q4117 con un r máximo de 0.45 y un LOD umbral para el ordenamiento de los marcadores entre 0,5 y 1,0. La incorporación de cada nuevo marcador a los grupos existentes fue verificada mediante el valor de ajuste del Chi^2 total (*goodness of fit*) a un valor de $\text{Chi}^2 < 6.0$. Como resultado de este análisis los grupos de ligamiento obtenidos incluyeron los marcadores SSR y COS correspondientes a alelos simples (1:1) y los marcadores biparentales (3:1).

III.7- Preparación de células de *E. coli* competentes, transformación de bacterias y clonado de fragmentos de amplificación

III.7.1- Obtención de células competentes de *E. coli* DH5 α

Se sembró una placa de Petri con la cepa de *Escherichia coli* DH5 α conteniendo aproximadamente 20 ml de medio Luria-Bertani (LB) y se las incubó durante la noche (ON) en estufa a 37 °C. A partir de colonias aisladas se realizaron cuatro cultivos en 2 ml de medio LB líquido y se los incubó ON en estufa a 37 °C. Se diluyó un cultivo con medio LB líquido estéril 1:100 (2 ml del cultivo en 200 ml de LB) y se incubó con agitación a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.3 - 0.4. Luego se colocó el cultivo 10 min en hielo y se centrifugó 10 min a 3.000 rpm a 4 °C descartándose el sobrenadante. Se agregaron 4 ml de MgCl₂ 10 mM y se resuspendieron las células (suavemente). Se agregaron 36 ml de MgCl₂ 10 mM (para llevar a un volumen final de 40 ml) y se centrifugó 10 min a 3.000 rpm descartándose el sobrenadante. Se agregaron lentamente 1,5 ml de CaCl₂ 20 % + Glicerol 50 mM y se resuspendieron las células. Posteriormente se agregaron 1,5 ml de CaCl₂ 20 % Glicerol 50 mM (V_f = 3ml) y se incubó en hielo durante 1 hora. La preparación fue fraccionada en alícuotas de 50 μ l en tubos de 1,5 ml, transferida rápidamente a nitrógeno líquido y posteriormente almacenada a -80 °C (Sambrook et al., 1989).

III.7.2- Transformación de *E. coli* DH5 α con cloruro de calcio

La transformación de células competentes de *E. Coli* DH5 α se llevó a cabo utilizando 50 μ l de células competentes y 5 μ l del inserto de DNA. Las mismas se incubaron 30 min en hielo y la transformación se realizó colocándolas 45 s en un baño de agua a 42 °C para luego incubarlas 10 min en hielo. Se agregó 500 μ l de medio LB líquido y se incubó 2 h a 37 °C con agitación. Se centrifugó 5 min a 3.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet resuspendido se distribuyó en placas de Petri conteniendo un medio LB suplementado con 100 mg/L de ampicilina y 15 μ l de X-gal (Promega) (Sambrook et al., 1989) y se incubó en estufa ON a 37 °C. Las colonias derivadas de células transformadas se identificaron por su coloración blanca (Sambrook

et al., 1989).

III.7.3- Obtención de células electrocompetentes y transformación por electroporación

La preparación de las células electrocompetentes se realizó siguiendo el protocolo descrito en la guía de aplicaciones del equipo (BioRad Micropulse, BioRad, USA). Brevemente, se preparó una placa de Petri con *Escherichia coli* DH5 α y se las incubó ON en estufa a 37 °C. A partir de una colonia aislada se realizó un cultivo en 50 ml de medio LB líquido y se incubó ON en estufa a 37 °C con agitación. Se inoculó 1 litro de medio LB líquido con el cultivo de 50 ml a 37 °C con agitación hasta llegar a una OD₅₅₀ de 0,5 - 0,6. Luego se transfirió el cultivo a tubos de 50 ml y se incubó en hielo 30 min. La preparación se centrifugó a 2.000 g 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se colocaron las células en hielo y se resuspendieron en 40 ml de agua estéril a 4 °C en cada tubo. Se centrifugó a 2.000 g por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado de bacterias se resuspendió en 20 ml de agua estéril a 4 °C. Se centrifugó a 2.000 g por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 20 ml de glicerol estéril 10 %. Se centrifugaron las células a 4.000 g por 15 min a 4° C. Se descartó el sobrenadante y finalmente se resuspendieron las células en 1 ml de glicerol al 10 % a 4 °C. La preparación fue fraccionada en alícuotas de 40 μ l en tubos de 1,5 ml, se colocaron rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80 °C.

Se mezclaron 40 μ l de las células competentes con 5 μ l de ADN (producto de la ligación del inserto y el vector) y se dejó incubando en hielo por 1 min. Se colocaron las células en la cubeta de 0,1 cm del electroporador BioRad Micropulse (BIORAD, USA) y se transformaron utilizando el protocolo estándar para cubetas de ese espesor (E= 18 kV/cm y 4-5 ms). Luego del pulso eléctrico se agregó 1 ml de medio SOC [medio SOB (2% Triptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,05% de NaCl, 2,5% mM de KCl , 10mM de MgCl₂) y glucosa 20mM]. El producto de la electroporación fue transferido a tubos de 1,5 ml y se incubó a 37 °C con agitación por 1 h. Las células transformadas se distribuyeron en placas de Petri conteniendo el medio LB + ampicilina 100 mg/l + X-gal (Promega) y se incubó ON a 37 °C. Las colonias transformantes fueron identificadas por su coloración blanca (Sambrook et al., 1989).

III.7.4- Clonado de fragmentos de amplificación y validación de las secuencias de EST-SSR

Con el objetivo de determinar la identidad de los marcadores EST-SSR obtenidos en *P. notatum* y su potencial utilización en estudios de mapeo comparativo, varios amplicones con un rango de ± 100 pb del tamaño esperado y que resultaron segregantes en la población F₁ fueron cortados del gel, eluidos en una solución de acetato de amonio 500 mM y EDTA 1 mM a pH 8,0 y re-amplificados usando la combinación de sus respectivos cebadores específicos. Los productos de amplificación fueron ligados y clonados con el sistema pGEM-Teasy (Promega, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los plásmidos recombinantes fueron utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α almacenadas a -80 °C o células electrocompetentes. La determinación de la presencia del vector conteniendo la secuencia clonada se realizó analizando al menos cinco colonias de cada transformación por medio de una reacción de PCR (*colony* PCR), en la cual se utilizaron los cebadores específicos de cada inserto. A partir del cultivo de las colonias que mostraban una reacción de amplificación positiva se realizaron las preparaciones de plásmido utilizando el sistema *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, USA). La concentración de los plásmidos recuperados fue determinada espectrofotométricamente midiendo los valores de absorbancia a 260 nm y por electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Muestras de cada plásmido de aproximadamente 100 ng/ μ l fueron utilizadas como molde para las reacciones de secuenciación (contratadas en Macrogen Inc., Korea). El análisis de las secuencias de los amplicones se realizó por medio de las herramientas de bioinformática disponibles en el sitio BLASTN <http://www.gramene.org/multi/blastview> y Clustal W (1.8) <http://www.justbio.com/aligner/index.php>.

III.8- Parámetros utilizados para el análisis de secuencias de los amplicones obtenidos en *Paspalum notatum*

Las secuencias obtenidas a partir de los marcadores de EST-SSR de *P. notatum* fueron analizadas con el programa Sequencher 4.1.4 Demo Version (Gene Codes

Corporation) para verificar la presencia de las secuencias correspondientes a los cebadores directo (*forward*) e inverso (*reverse*) y descartar posibles contaminaciones. Luego se verificó la existencia del motivo SSR presente en el clon de EST original y se alinearon con el mismo utilizando el programa MegAlign del paquete DNASTAR (MegAlign 4.03 DNASTAR Inc. USA). Los métodos de alineamiento utilizados fueron tanto de a pares como de alineamientos múltiples. Para el primero se utilizó el método de Martinez-NW (Martinez 1983, Needleman y Wunsch, 1970), recomendado para encontrar alineamientos perfectos entre secuencias cortas y largas con presencia de ADN repetitivo. Para los alineamientos múltiples se utilizó el método de Jotun-Hein (Hein, 1990) que es adecuado para alineamientos múltiples cuando se usan secuencias relacionadas por descendencia.

III.9- Parámetros utilizados para el mapeo *in silico* y la identificación de genes ortólogos en arroz y maíz

La secuencia de cada clon de EST del cual derivó cada marcador EST-SSR se obtuvo a partir de la base de datos de EST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para ubicar la secuencia del oligonucleótido en el clon de EST original se utilizó el programa Sequencher 4.1.4. Los parámetros utilizados para el alineamiento fueron: un porcentaje mínimo de identidad (% ID) del 85 % y un mínimo de solapamiento de 20 pb. El fragmento de amplificación (incluidos los cebadores) fue seleccionado para realizar las comparaciones de secuencias que se indican más abajo.

Para el mapeo *in silico* de los marcadores EST-SSR, se realizó un análisis de alineamiento (BLASTn) con la secuencia de cada clon de EST en las bases de datos GRAMENE (<http://www.gramene.org>) para arroz y maizesequence (<http://www.maizesequence.org/index.html>) para maíz. Debido a que el objetivo fue identificar genes ortólogos entre trigo, arroz, maíz y *Paspalum*, el criterio utilizado para realizar la ubicación *in silico* en los cromosomas de arroz y maíz fue basado en lo descrito por Salse et al. (2003). Se consideraron como potenciales genes ortólogos aquellas secuencias que luego de realizarse el análisis de BLASTn mostraron una homología de al menos 60 % sobre un mínimo de 60 % del largo de la secuencia blanco y un valor umbral (E-value) igual o menor a 0,01.

III.10- Análisis de agrupamiento y estimación de parámetros de variabilidad de especies del género *Paspalum* mediante el empleo de marcadores EST-SSR

Para el análisis de agrupamiento del material vegetal del género *Paspalum* indicado en la Tabla I, se utilizó el programa NTSYS 4.0 (Rohlf, 1998) según lo descrito por Espinoza et al. (2006). Treinta y tres unidades taxonómicas (OTUs) (ver Tabla I) fueron analizadas en paralelo utilizando marcadores EST-SSR y SSR genómicos. Los patrones de amplificación de cada OTU fueron transformados en una matriz binaria de datos utilizando el programa Excel (Microsoft). La matriz obtenida fue codificada de acuerdo a las OTUs (columnas) y los marcadores (filas) utilizados en el análisis. Se incluyeron además los códigos correspondientes a una matriz de tipo binaria (1), número de marcadores (166) y cantidad de entradas (34) de acuerdo al manual de uso del programa NTSYS 4.0 (Rohlf, 1998). En la misma la presencia o la ausencia de cada marcador fue codificada mediante 1 y 0 respectivamente y a los datos perdidos se les asignó arbitrariamente el código 5. La matriz de datos binarios fue usada para realizar un análisis de similitud mediante el comando "Similarity", utilizando para el cálculo de las distancias, el coeficiente de similitud de Jaccard (1908). El índice de similitud de Jaccard (1908) para pares de individuos generado por el programa NTSYS (Rohlf, 1998) se calcula mediante la formula: $J = a/[a+b+c]$, donde a es el número de marcadores en común entre dos individuos, b es el número de marcadores presentes en el primer individuo y ausentes en el segundo y c es el número de marcadores presentes en el segundo y ausentes en el primero. Este índice toma valores entre 0 (los individuos no presentan ningún marcador en común) y 1 (los individuos coinciden en todos los marcadores) (Winzer et al., 2010). Para este trabajo se eligió el coeficiente de Jaccard (1908) por considerar al mismo como el más consistente y conservador, ya que no tiene en cuenta para el cálculo la ausencia de bandas como criterio de similitud entre dos individuos (Campbell et al., 1999). El análisis de agrupamiento se realizó mediante el comando "Clustering" por el método de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). El dendrograma correspondiente se obtuvo mediante la selección de la ventana "Graphics" del programa NTSYS (Rohlf, 1998).

Con el objetivo de visualizar los agrupamientos de las distintas OTUs en un gráfico de dos dimensiones y analizar los grupos taxonómicos por separado se determinó la relación genética entre los individuos a partir de un análisis de

coordenadas principales (en inglés Principal Coordinates Analysis, PCA) utilizando el programa GenAlex 6.3 (Peakall y Smouse, 2006). Se obtuvieron también el porcentaje de marcadores polimórficos (aquellos que muestran presencias y ausencias dentro de la población o grupos taxonómicos) y los siguientes parámetros genéticos: **i) Frecuencias alélicas por población y por locus (AFP y AFL)**. Las mismas se obtuvieron a partir de los datos de la frecuencia de bandas p (presencia), q (ausencia) y H_e (heterocigosis esperada) para cada locus por población; **ii) Patrones alélicos (APT)**. Estos resumen el número de bandas de los *loci*, el número de bandas con frecuencia $> 5 \%$, número de bandas únicas, número de bandas menos comunes ($\leq 25 \%$), número de bandas menos comunes ($\leq 50\%$) y el promedio y el desvío estándar de la heterocigosis. Los datos obtenidos fueron empleados para la construcción de un gráfico de barras utilizando el comando “*Graph Pattern*” (APT). Los datos experimentales y las fórmulas algebraicas utilizadas para el cálculo de los estadísticos descriptos anteriormente fueron:

N = tamaño de muestra

N_a = N° de alelos diferentes

N_e = N° de alelos efectivos, $N_e = \frac{1}{p^2+q^2}$

Índice de Shanon, $I = -1 \cdot (p \cdot \ln(p) + q \cdot \ln(q))$

Heterocigosis esperada, $H_e = 2 \cdot p \cdot q$

Heterocigosis esperada no distorsionada, $UHe = \left(\frac{2N}{(2N-1)} \right) \cdot H_e$

Donde las frecuencias de p y q para datos binarios derivados de individuos diploides y asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg, derivan de la fórmula $q = (1 - \text{frecuencia de una determinada banda})^{0.5}$ y $p = 1 - q$

La diferenciación entre poblaciones fue realizada mediante un análisis de la varianza molecular (AMOVA) con un mínimo de 999 permutaciones. Este análisis genera una estadística llamada *PhiPT* que representa una medida de diferenciación genética para datos binarios (análoga a F_{ST}) apropiada para el AMOVA. Para este análisis se postularon las siguientes hipótesis:

H_0 = no hay diferencias genéticas entre las poblaciones ($\text{PhiPT} = 0$)

H_1 = hay diferencia genética entre las poblaciones ($\text{PhiPT} > 0$)

En este análisis la suma de cuadrados (SS) y la suma media de cuadrados (MS) son

calculados a partir de la matriz de distancia genética cuadrada como:

$$SS_{TOT} = \frac{\sum dij^2}{2N}, \quad SS_{WP1} = \frac{\sum dij^2}{2n1}$$

$$SS_{WP} = SS_{WP1} + SS_{WP2} \dots SS_{WPn}; \quad SS_{AP} = SS_{TOT} - SS_{WP}$$

$$MS_{WP} = \frac{SS_{WP}}{df_{WP}}; \quad MS_{AP} = \frac{SS_{AP}}{df_{AP}}$$

Donde: dij^2 = la distancia genética cuadrada entre las muestras i^{th} y j^{th}

La estimación de las varianzas son calculadas como:

$$AP_V = \frac{MS_{AP} - MS_{WP}}{NO}, \quad WP_V = MS_{WP}, \quad NO = \frac{1}{(Np - 1)} \cdot \left[\sum_{k=1}^{Np} N_{Pk} - \frac{\left[\sum_{k=1}^{Np} npk^2 \right]}{\left[\sum_{k=1}^{Np} npk \right]} \right]$$

donde, MS_{AP} y MS_{WP} = Suma media de cuadrados entre poblaciones y dentro de poblaciones respectivamente

Finalmente, $PhiPT$ es calculado por medio de la fórmula:

$$PhiPT = \frac{AP_V}{(WP_V + AP_V)} = \frac{AP_V}{V_{TOT}}$$

Donde: AP_V = Varianza estimada entre poblaciones, WP_V = Varianza estimada dentro de poblaciones, V_{TOT} = varianza total, N =número de muestras, N_p = número de poblaciones con k_{th} poblaciones, nk =número de muestras en la kt_h población. Grados de libertad entre poblaciones = $df_{AP} = N_p - 1$, Grados de libertad dentro de poblaciones = $df_{WP} = N - N_p$

Para determinar si el valor de $PhiPT$ observado es significativamente mayor al que se espera por azar, se compara el valor observado contra el resultado de las permutaciones (según manual de uso de GenAlex 6.3, Peakall Smouse, 2006).

IV RESULTADOS

IV- RESULTADOS

IV.1- Desarrollo y mapeo de marcadores EST-SSR de trigo y arroz en *Paspalum notatum*

IV.1.1- Selección de un conjunto de marcadores de EST-SSR distribuidos uniformemente por el genoma de arroz a partir de bases públicas

Con el objetivo de contar con un grupo de marcadores de EST-SSR para caracterizar los grupos de ligamiento de *Paspalum notatum* se utilizó la información disponible en la base de datos de marcadores de EST-SSR de trigo de la Universidad de Cornell, USA (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/Cornell>). En cada caso se obtuvo el nombre del clon de ADNc conteniendo el SSR y las secuencias de los cebadores con los que se generó el marcador correspondiente (Anexo: Tabla I A y B). Como puntos de referencia para cada uno de ellos se utilizó su localización en trigo y arroz según lo descrito por Yu et al. (2004a,b) (Anexo: Figura I). La secuencia completa de cada clon de EST se obtuvo a partir de la base de datos de EST del *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sobre éstas se realizó un ensayo *in silico* con los oligonucleótidos correspondientes, utilizando el programa Sequencher 4.1.4, de manera de identificar el fragmento a ser amplificado y el tamaño esperado del amplicón. Asimismo, se identificó la secuencia del microsatélite (SSR) incluida en cada EST

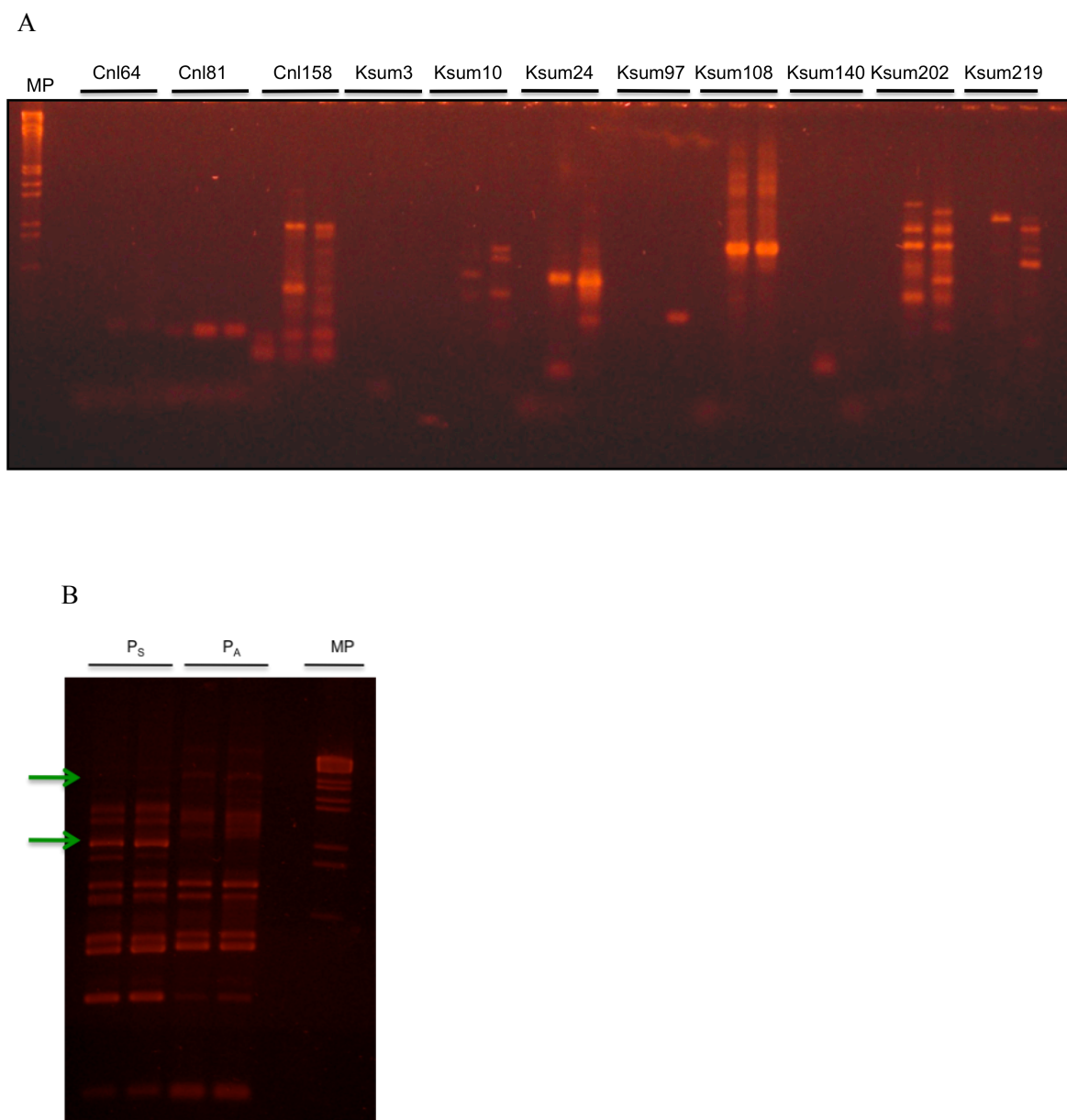
utilizando el programa SSRIT-Simple (*Simple Sequence Repeat Identification Tool*) disponible en <http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>. A partir de este procedimiento se seleccionaron 55 marcadores EST-SSR de trigo diferentes, distribuidos uniformemente en el mapa genético de arroz, que detectan un total 128 *loci* (en promedio 10,66 *loci* por cromosoma). Especialmente, se eligieron varios marcadores que se localizaron en los cromosomas 2 y 12 de arroz debido a que segmentos de estos cromosomas fueron descritos como asociados al *locus* responsable de la aposporia en *P. notatum* (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004; Pupilli et al., 2004). La distribución de los marcadores seleccionados se muestra en el Anexo; Figura I, Tabla I A y B.

IV.1.2- Detección de polimorfismo entre los genotipos parentales de la población de mapeo

En primer lugar la totalidad de los marcadores EST-SSR seleccionados fueron ensayados sobre los genotipos parentales de la población de mapeo (Q4188 y Q4117) con el fin de determinar sus patrones de amplificación e identificar fragmentos polimórficos. Para cada marcador se consideró especialmente las bandas del tamaño esperado de acuerdo a la secuencia original amplificada (entre 100-500 pb). En cada caso se realizó una amplificación por PCR en gradiente utilizando las condiciones de amplificación descritas en Materiales y Métodos (apartado III.3.1). De esta manera se determinó empíricamente la temperatura óptima de anillado para cada par de oligonucleótidos (ver Anexo: Tabla II). Los amplicones obtenidos fueron resueltos en una primera instancia en geles de agarosa al 2,5 % y posteriormente para aumentar la resolución en geles de poliacrilamida al 5 %. Si bien, en algunos casos fue posible detectar polimorfismos directamente en los geles de agarosa (Figura 3 A y B), la mayoría de los marcadores fueron analizados en geles de acrilamida debido a su mayor poder de resolución de bandas (Figura 4). Los oligonucleótidos que generaron amplificaciones positivas fueron utilizados en otra reacción de PCR, esta vez con cada muestra por duplicado, y en las condiciones óptimas de anillado detectadas previamente a fin de corroborar los perfiles de amplificación para cada caso. A partir de estos experimentos se seleccionaron los marcadores que presentaron amplificaciones reproducibles y consistentes en los duplicados para emplearlas en los experimentos de mapeo genético sobre la totalidad de la población segregante.

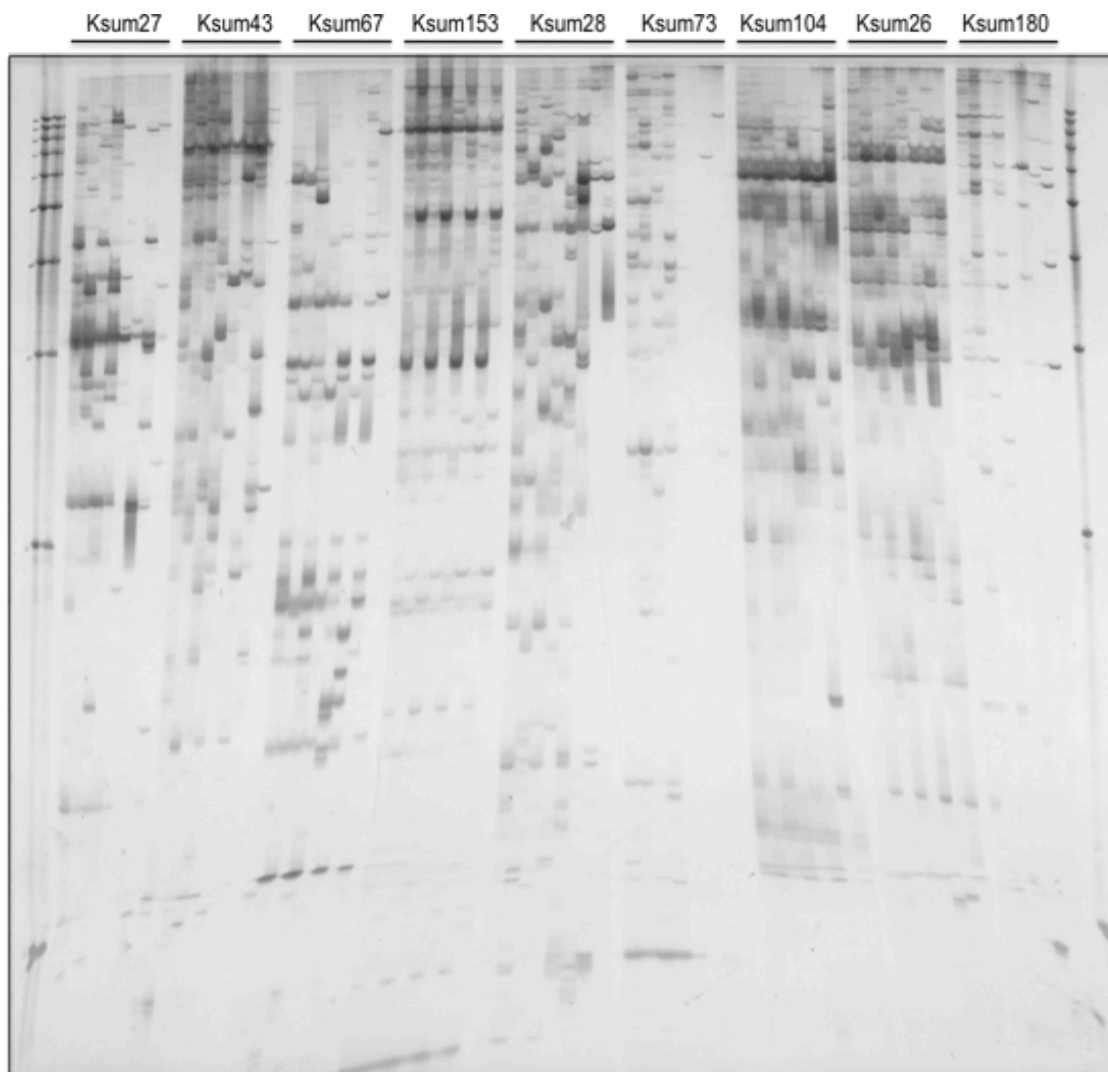
De los 55 pares de oligonucleótidos ensayados 15 (27,27 %) no amplificaron o mostraron un patrón inespecífico (bandas indefinidas). Esto pudo deberse a la existencia de intrones que impiden la amplificación por PCR o a una baja homología en sitios de alineamiento del cebador. Los 40 (72,72 %) marcadores restantes amplificaron bandas del tamaño esperado y mostraron polimorfismos entre los progenitores cuando fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 5 % (Figura 4). En promedio se obtuvieron 10 bandas de entre 100 - 500 pb por marcador. En este punto debe tenerse en cuenta que el material vegetal en estudio corresponde a una especie tetraploide altamente heterocigota en donde es probable contar con hasta 4 alelos por *locus*. Además de esto es posible la amplificación de secuencias derivadas de *loci* duplicados y/o pseudogenes. Las variaciones en tamaño observadas pudieron originarse en diferencias de secuencias entre trigo y *Paspalum*, así como por la presencia de inserciones-deleciones (*indels*) dentro de la secuencia amplificada. Yu et al. (2004a) reportó la existencia de fragmentos de amplificación de un tamaño mucho mayor al esperado que atribuyó a variantes alélicas debidas a inserciones dentro del amplicón más que a variantes en la longitud de la secuencia SSR.

Figura 3: Patrones de amplificación de marcadores EST-SSR de trigo en los genotipos parentales (Q4188 y Q4117) de la población de mapeo resueltos en geles de agarosa.



Geles de agarosa al 2,5 (A) y 3% (B), respectivamente teñidos con bromuro de etidio mostrando la amplificación de 12 combinaciones de oligonucleótidos (Cnl143, Cnl64, Cnl81, Cnl158 Ksum3, Ksum10, Ksum24, Ksum97, Ksum108, Ksum140, Ksum202 y Ksum219) sobre los genotipos parentales Q4188 (P_S) y Q4117 (P_A). MP: Marcador de Peso molecular (λ EcoRI/Hind III). Las flechas verdes indican las bandas polimórficas entre los dos genotipos analizados. P_S: Padre sexual, P_A: Padre apomictico

Figura 4: Patrones de amplificación de marcadores EST-SSR de trigo en los genotipos Q4188 y Q4117 resueltos en geles de poliacrilamida.



Gel de acrilamida al 5 % teñido con nitrato de plata mostrando la amplificación de 9 combinaciones de oligonucleótidos (Ksum27, Ksum23, Ksum67, Ksum153, Ksum28, Ksum73, Ksum104, Ksum26, Ksum180) sobre los genotipos Q4188 y Q4117 (ubicados de a pares) a cuatro temperaturas diferentes (una al lado de la otra) (Anexo: Tabla II).

IV.1.3- Análisis de segregación de marcadores EST-SSR

De los 40 pares de oligonucleótidos que amplificaron bandas del tamaño esperado (100-500 pb) (Anexo: Tabla I A y B) y resultaron polimórficos entre los progenitores, 33 fueron ensayados en los 65 individuos de la población de mapeo (Figura 5). De los mismos, 28 mostraron buenos patrones de amplificación y marcadores segregantes, mientras que cinco resultaron no informativos. Siete marcadores restan aún ser analizados. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de las amplificaciones obtenidas en la población de mapeo con tres marcadores de EST-SSR. Como puede observarse, dependiendo del par de cebadores utilizado, se obtuvieron distintos patrones de amplificación y números de bandas segregantes en la población (Figura 6 A-C). Como resultado de la utilización de una población F_1 derivada del cruzamiento entre dos genotipos tetraploides altamente heterocigotas, distintas configuraciones alélicas para diferentes *loci* pueden ser observadas (Ritter et al., 1990). En base a esto, para cada amplificación se determinó la presencia de: a) *marcadores maternos*, fragmentos segregantes provenientes exclusivamente del progenitor Q4188 (sexual), b) *marcadores paternos*, fragmentos segregantes provenientes exclusivamente del progenitor Q4117 (apomíctico) y c) *marcadores biparentales*: fragmentos segregantes presentes en ambos progenitores. Los datos de presencia/ausencia de cada marcador fueron utilizados para determinar el tipo de segregación, de acuerdo a la composición alélica esperada para un individuo tetraploide en caso de auto o alopoliploidía (Ritter et al., 1990).

Como resultado de las amplificaciones se obtuvieron en promedio ocho bandas segregantes por combinación de oligonucleótidos. El análisis de las mismas reveló en promedio 3 marcadores paternos, 3 maternos y 2 biparentales (Anexo: Tabla II). En total se obtuvieron 219 marcadores segregantes de las tres clases consideradas (Tabla III). En ambos genotipos la mayoría de los fragmentos polimórficos segregó como alelos en dosis simple (ADS). Otro grupo mostró razones de segregación de alelos en dosis doble (ADDs) que ajustaron a relaciones de presencia/ausencia de 3:1 o 5:1. Resultados similares fueron obtenidos en la especie por Stein et al. (2007). Asimismo, se observó un grupo de 71 marcadores que no ajustaron a ninguna de las clases de segregación esperadas por lo cual fueron clasificados como distorsionados. Dentro de este grupo, 26 marcadores mostraron relaciones de presencia/ausencia de 1:3 – 1:6. Este

grupo estaría representando *loci* en estado heterocigota que se transmiten a la descendencia en menor número que el esperado y por lo tanto podrían estar asociados a algún tipo de letalidad gamética o cigótica. Las mismas relaciones de segregación fueron obtenidas para el carácter aposporía en la especie (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004). Debido a esto, este grupo de marcadores segregantes desde Q4117 fue empleado en los análisis de ligamiento genético debido a que podrían estar relacionados con la aposporía (Tabla III).

Figura 5: Población de mapeo de *Paspalum notatum* mantenida en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.

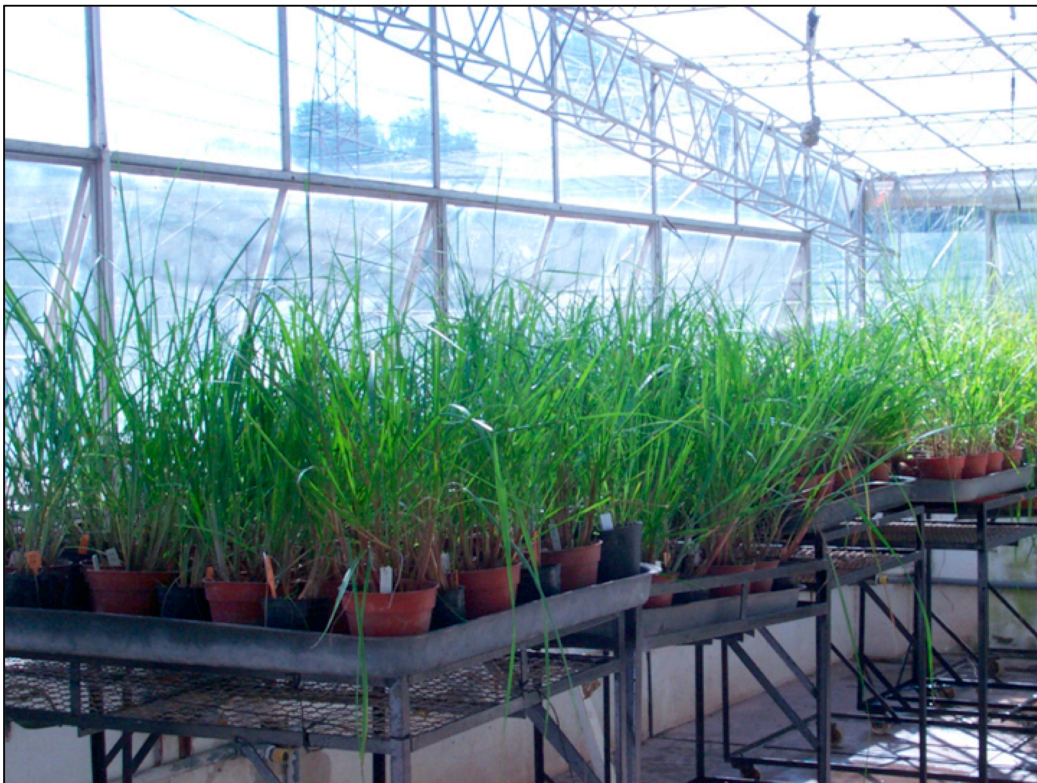
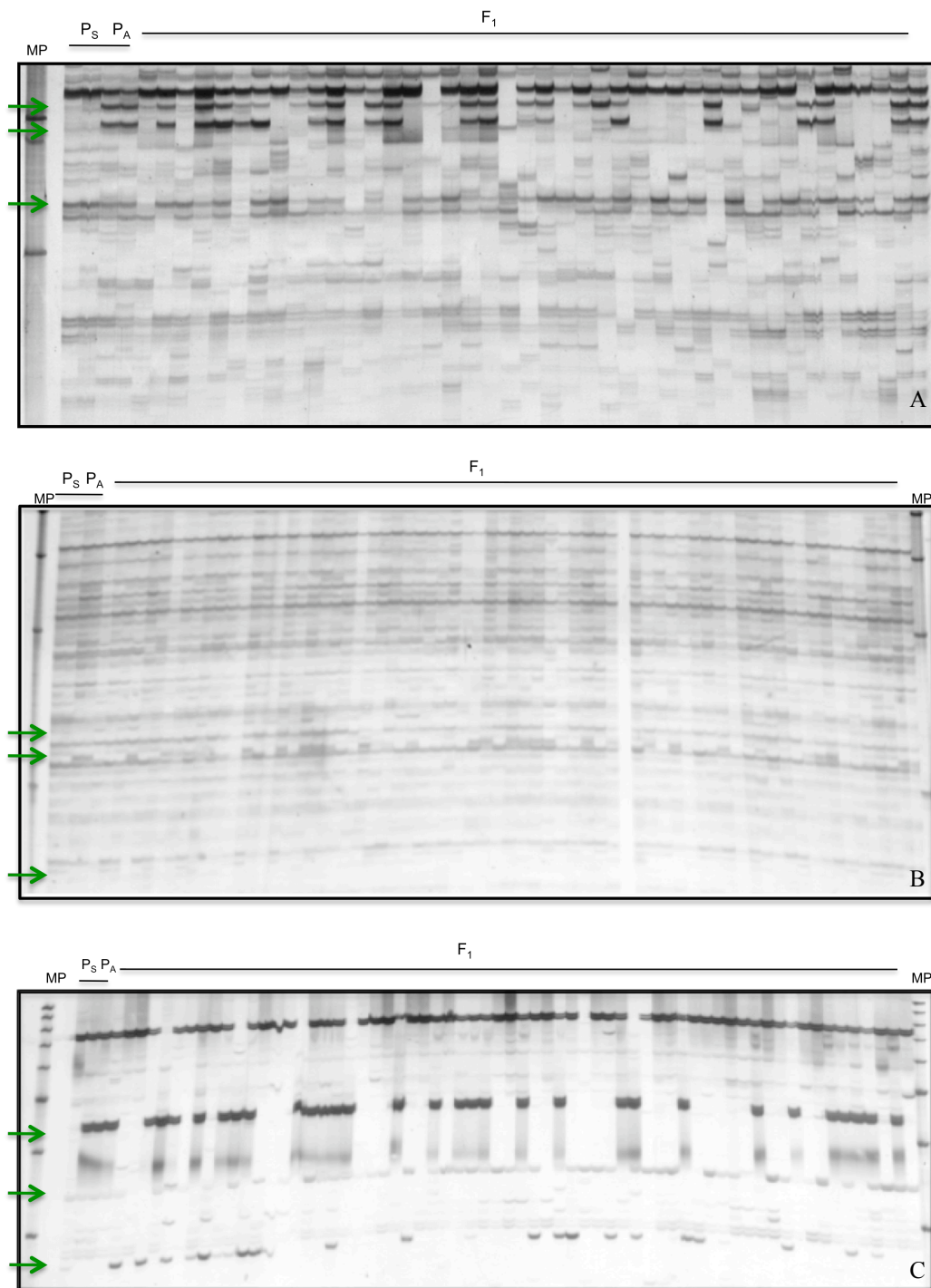


Figura 6: Amplificación de marcadores EST-SSR en la población de mapeo de *P. notatum*

Geles de acrilamida al 5% teñidos con nitrato de plata mostrando la amplificación de los marcadores Cnl142(A), Ksum205(B) y Ksum153(C) sobre los genotipos Q4188 (P_S), Q4188 (P_A) y la población F_1 . MP: marcador de peso molecular (100 bp, Promega). Las flechas indican los marcadores segregantes en una relación por presencia/ausencia de 1:1 o 3:1.

Tabla III: Análisis de segregación de marcadores EST-SSR en la población de mapeo de *P. notatum*.

Clase de Marcador	Configuración alélica y relación de segregación esperada					Total
	ADS	ADD		Dist.		
	1:1	3:1	5:1	1:3-1:6*	otros**	
Materno	54	7	2	15	8	86
Paterno	52	7	1	11	7	78
Biparental	-	25	-	-	30	55
Total	106	39	3	26	45	219

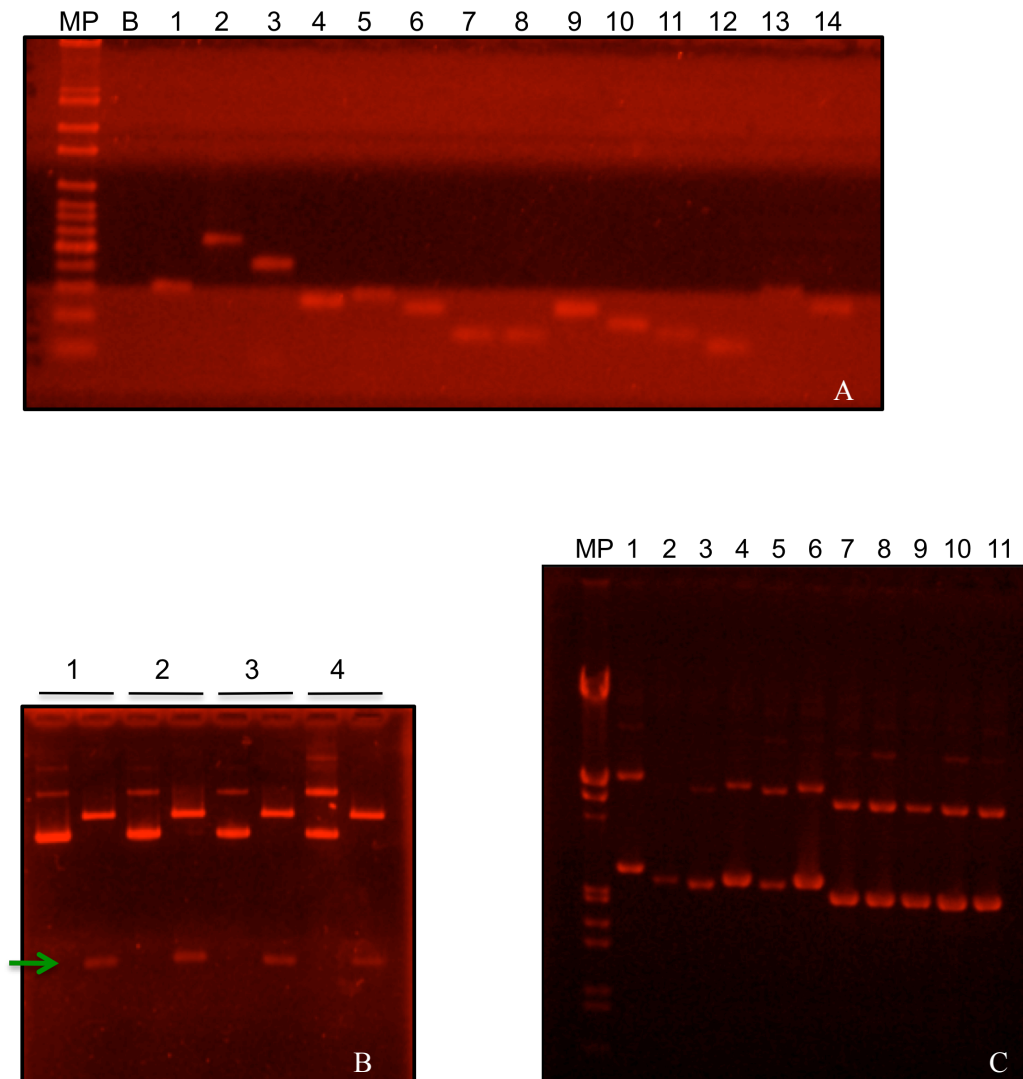
ADS: alelos en simple dosis, ADD: alelos en doble dosis, Dist.: distorsionados. *Marcadores distorsionados que ajustaron a una segregación 1:3 – 1:6. **Marcadores que mostraron valores de segregación que no se ajustaron a ninguno de los valores indicados en la Tabla III.

IV.1.4- Clonado y validación de las secuencias de EST-SSR

Con el objetivo de determinar la identidad de los marcadores obtenidos y su posible utilización en análisis comparativos, 34 bandas segregantes del tamaño esperado, provenientes de Q4188 y Q4117 que se generaron a partir de 13 EST-SSR, fueron eluidas de los geles y re-amplificadas con sus respectivos cebadores (Figura 7 A). Los productos de amplificación fueron aislados de los geles y enviados directamente a secuenciar siguiendo las especificaciones de MacroGen Inc., Corea. En algunos casos se clonaron con el sistema pGEM-Teasy (Promega, USA) y se utilizaron para transformar *Escherichia coli* DH5 α . Diez colonias de cada transformación fueron sometidas a una reacción de PCR (*colony* PCR) para verificar la presencia del inserto. Asimismo cada clon fue sometido a reacciones de restricción con la enzima de restricción *EcoRI* y analizados en geles de agarosa al 2 % para verificar el tamaño del inserto (Figura 7 B). A partir del cultivo de las colonias que mostraban una reacción de amplificación positiva se realizaron las preparaciones de plásmido utilizando el sistema *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, USA) las cuales sirvieron como molde para las reacciones de secuenciación (contratadas en MacroGen Inc., Corea) (Figura 7 C).

El análisis de las secuencias obtenidas mostró que todos los fragmentos analizados presentaron al menos uno de los cebadores utilizados en la amplificación, con lo cual fue posible validar la especificidad del mismo y descartar posibles contaminaciones en el clonado. El alineamiento de los amplicones de *P. notatum* con la secuencia interna del EST original de trigo por el método de Jotun-Hein (1990) (alineamiento específico para secuencias derivadas de un antecesor común) (Hein, 1990) arrojó valores de similitud del 40 al 70 %. En particular, ocho marcadores (BCn1126Bh, BCn1144b, Cn1144p_c, Ksum10c₂, Ksum140pa_{c5}, Ksum140pa_{c13}, Ksum202pd_{c1} y Ksum230B_c) mostraron valores mayores al 60 %, mientras que el resto estuvo comprendido en el rango de 41 a 59 % (Tabla IV). Teniendo en cuenta el origen de las secuencias analizadas, los valores promedio de las similitudes obtenidas confirmaron la detección de secuencias ortólogas entre *P. notatum* y trigo. Sin embargo, debido a que se observaron grandes variaciones en el grado de similitud entre los distintos marcadores, no es posible realizar una generalización y cada caso debe analizarse por separado. Por otro lado, el método de alineamientos por pares que considera específicamente repeticiones internas de secuencias (Martínez, 1983) arrojó valores inferiores. Este resultado posiblemente fue debido a las variaciones en las repeticiones internas detectadas en los amplicones de *P. notatum* y trigo.

Figura 7: Amplificación y clonado de fragmentos EST-SSR de *P. notatum*: A) Producto de amplificación de marcadores aislados obtenidos a partir de una reacción de PCR con los cebadores específicos de cada uno, B) Corroboración de los fragmentos clonados por medio de la digestión del vector (pGemTeasy) con la enzima *EcoRI*, C) Resultado de la extracción de plásmidos recombinantes (*minipreparaciones*) conteniendo fragmentos de los marcadores EST-SSR.



Geles de agarosa al 2,5 % teñidos con Bromuro de etidio. A) MP: marcador de peso molecular 100 bp Ladder (100bp-3000bp) Axygen (Biosciences). B) Blanco de reacción, 1-14: productos de amplificación de marcadores EST-SSR aislados. B) Comprobación del clonado del inserto derivado del marcador Ksum205; 1-4: clones del inserto Ksum205 sin cortar y cortados con *EcoRI*. La flecha verde indica el fragmento del tamaño esperado. C) MP: Marcador de Peso molecular (λ *EcoRI*/*Hind* III), 1-11: minipreparaciones obtenidas a partir de colonias de *E.coli* DH5 α conteniendo los vectores recombinantes con los insertos Ksum140 (1-6) y Ksum10 (7-11).

Tabla IV: Análisis de similitud de las bandas secuenciadas de *P. notatum* con los correspondientes clones de EST de trigo.

EST (pb)	SSR	Nombre del marcador (pb)	¹ Cebadores		Similitud	
			<i>F</i>	<i>R</i>	Jotun- Heim ²	Por pares ³
Cnl126 (150)	(gac) ₇	BCnl126me (200)	no	si	59,1	50,9
		BCnl126h (180)	no	si	61,5	47,4
		BCnl126i (160)	no	si	50,3	52,5
Cnl132 (281)	(gtt) ₄	BCnl132b (365)	no	si	50,0	39,1
		BCnl126md (320)	no	si	45,6	42,7
		BCnl126g (270)	no	si	46,8	43,3
Cnl143 (129)	(gcc) ₅	Cnl143mg _F (200)	no	si	51,6	43,8
		Cnl126mg _R (200)	si	no	51,5	42,3
Cnl144 (240)	(gcc) ₅ n1 8(cct) ₆	BCnl144b (310)	no	si	61,0	43,4
		Cnl144pc (310)	no	si	61,0	43,4
Ksum10 (163)	(ag) ₆ n5(aggg) ₅ n1 4(ag) ₆	Ksum10c2 (230)	si	si	67,7	47,8
		Ksum10me (450)	no	si	59,6	40,4
		Ksum10pj (320)	no	si	51,5	43,9
Ksum27 (237)	(tg) ₂₀	Ksum27mg (260)	no	si	40,8	46,5
		Ksum27mh (220)	no	si	52,3	48,5
Ksum67 (240)	(ga) ₆₂	Ksum67pd (265)	no	si	48,1	39,8
		BKsum67e _m (160)	no	si	51,0	-
		BKsum67e _p (160)	no	si	49,0	41,7
Ksum140 (234)	(ggc) ₇ (g aa) ₈	Ksum140pa _{c3} (260)	si	si	51,9	48,5
		Ksum140pa _{c5} (156)	si	si	61,8	44
		Ksum140pa _{c13} (156)	si	si	61,1	43,5
Ksum141 (258)	(ctt) ₆	Ksum141mc (370)	no	si	48,4	44,0
		Ksum141mf (280)	no	si	47,6	38,9
		Ksum141pj (190)	no	si	56,0	40,1
		Ksum141mm (170)	no	si	50,5	44,1
Ksum153 (261)	(cca) ₇	Ksum153pb (450)	no	si	48,7	45,3
		Ksum153me (280)	no	si	49,0	41,0
Ksum202 (243)	(gga) ₆	Ksum202pc (200)	no	si	52,6	41,3
		Ksum202pd _{c1} (150)	no	si	70,1	52,2
		Ksum202pd _{c2} (150)	no	si	58,2	50,0

pb: pares de bases, ¹Cebadores detectados en la secuencia para validar el fragmento amplificado, *F*: cebador directo (*forward*), *R*: cebador inverso (*reverse*).² Jotun Heim 1990, ³Martínez 1983.

IV1.5- Localización de marcadores EST-SSR en el mapa genético de *Paspalum notatum*

Los marcadores EST-SSR descritos anteriormente fueron localizados en el mapa genético marco de la especie desarrollado previamente por Stein et al. (2007). Para esto, el genotipo de cada individuo de la población correspondiente a cada marcador, fue registrado en una matriz de datos de acuerdo a la codificación requerida por los programas de mapeo Mapmaker 3.0/Exp. (Lander et al., 1987) y JoinMap3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001). Los datos obtenidos fueron incorporados a los archivos de segregación de marcadores de AFLP y RFLP de Q4188 y Q4117 generados por Stein et al. (2007).

Un primer análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa Mapmaker 3.0/Exp. (Lander et al., 1987). En el caso del genotipo Q4188 se incluyeron (a los archivos existentes) todos los marcadores segregantes desde este progenitor de tipo 1:1 (Tabla III). En Q4117 se incorporaron (a los archivos existentes) los marcadores segregantes de tipo 1:1 y los distorsionados de tipo 1:3-1:6 (Tabla III). Estos últimos fueron incluidos en el análisis con el objetivo de detectar marcadores posiblemente relacionados al carácter aposporía. En total, 54 marcadores EST-SSR segregantes de Q4188 y 63 segregantes de Q4117 fueron incorporados a los 289 y 229 marcadores existentes de los archivos maternos y paternos, respectivamente.

La información preexistente sobre el agrupamiento y orden de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento obtenida por Stein et al. (2007) fue proporcionada al programa en forma de archivos del tipo “.prep” (ver Tutorial Mapmaker 3.0/Exp). Estos archivos indican al programa la información necesaria para reconstruir los grupos de ligamientos preexistentes (y obtenidos con el mismo grupo de datos) a fin de evitar realizar nuevamente todos los análisis de ligamiento cada vez que se incorporan nuevos marcadores a los archivos de datos (Lander et al., 1987). Luego de la carga de los archivos correspondientes y la inicialización del programa, se seleccionaron todos los marcadores EST-SSR (y otros marcadores no ligados a ninguno de los grupos definidos previamente, remanentes de estudios anteriores) y mediante el comando “assign” se distribuyeron (asignaron) a los grupos existentes (a un valor de LOD mínimo de 2.0). La adjudicación de cada marcador a cada grupo se analizó individualmente considerando los valores de LOD, la fracción de recombinación (r) y el ligamiento con

al menos dos marcadores del grupo. En los casos que se detectaron conflictos de marcadores asignados a más de un grupo de ligamiento, se optó por incorporarlo, en forma manual, al grupo en el cual presentaba el mayor LOD score y menor r . Luego de identificar los grupos de ligamiento en los cuales se distribuyeron los marcadores, se procedió a determinar el orden de los marcadores incorporados a cada grupo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Una vez determinado el orden más probable se definió un nuevo “*framework*” (ordenamiento marco) para cada grupo y se graficaron los grupos formados mediante el comando “*draw*” (Lander et al., 1987). Este análisis permitió determinar que 24 marcadores EST-SSR derivados de Q4188 y 28 de Q4117 resultaron ligados en acoplamiento a marcadores previamente localizados en el mapa genético de la especie. Los marcadores incorporados se distribuyeron en 10 grupos de ligamiento de Q4188 y 16 de Q4117.

Un segundo análisis fue realizado con el objetivo de incorporar los marcadores segregantes desde ambos progenitores (marcadores biparentales del tipo Aaaa x Aaaa) que no pueden ser analizados con Mapmaker3.0/Exp. (Lander et al., 1987). Para esto un análisis similar al descrito anteriormente fue llevado a cabo utilizando JoinMap3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001). Este programa permite el mapeo de *loci* con distintas relaciones de segregación en la misma población (Ej. 1:1; 1:2:1; 3:1; 1:1:1:1) (Van Ooijen y Voorrips, 2001). En este caso el archivo de datos correspondiente al genotipo Q4188 estuvo integrado por los marcadores de tipo 1:1 (segregantes de Q4188) y 3:1 segregantes desde ambos genotipos parentales. El archivo de Q4117 incluyó marcadores de tipo 1:1 (segregantes de Q4117), marcadores 3:1 (segregantes desde ambos progenitores) y marcadores distorsionados de tipo 1:3-1:6 (Tabla III). Este análisis permitió la incorporación de 79 nuevos marcadores [54 maternos (1:1) + 25 biparentales (3:1)] al archivo de Q4188 y 88 nuevos marcadores [52 paternos (1:1) 11 (distorsionados) + 25 biparentales (3:1)] al archivo de Q4117, respectivamente.

Debido a que el análisis de ligamiento con JoinMap3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001) en la población de mapeo disponible fue realizado por primera vez con los datos obtenidos en esta tesis, se realizó un análisis de ligamiento completo que incluyó primero la identificación de los grupos de cosegregación (ligamiento) y posteriormente el ordenamiento de los marcadores dentro de los mismos. La identificación de los grupos de ligamiento formados fue realizada mediante la comparación de los marcadores de cada uno con los grupos definidos por Stein et al. (2007). De esta manera

fue posible comparar los resultados obtenidos con ambos programas de mapeo. Brevemente, los archivos de datos de Q4188 y Q4117 (por separado) fueron utilizados como archivos de entrada del programa. Los grupos de ligamiento se definieron a LOD 8.0 para Q4188 y LOD 5.0 para Q4117 con un r máximo de 0,45 y un LOD umbral para el ordenamiento de los marcadores dentro de cada grupo entre 0,5 y 1,0. La incorporación de cada marcador a los grupos de ligamiento fue verificada mediante el valor ajuste del Chi^2 total (“*goodness of fit*”) < 6.0 . Los resultados obtenidos en este análisis fueron comparados con lo realizado previamente y los marcadores que no fueron incorporados o mostraron conflictos (asignados a distintos grupos de ligamiento) fueron analizados manualmente. Al igual que en el caso anterior, las incongruencias en la asignación de marcadores fueron corregidas de acuerdo al criterio de mayor LOD score y menor r .

Como resultado de este análisis fue posible incorporar un total de 29 marcadores maternos (15 de la serie Cnl y 14 de la serie Ksum) y 48 marcadores paternos (24 de la serie Cnl y 24 de la serie Ksum) que se distribuyeron en 15 y 27 grupos de ligamientos correspondientes a Q4188 y Q4117, respectivamente. Es de destacar que el análisis con JoinMap 3.0 permitió incorporar un mayor número de marcadores a ambos mapas de ligamiento en relación a lo obtenido con Mapmaker 3.0/Exp. Este resultado puede derivar en parte a la incorporación de los marcadores 3:1 en el caso de JoinMap 3.0 y en parte a los distintos algoritmos utilizados por los programas para la conformación de los grupos de cosegregación. De todas formas, la mayoría de los ligamientos detectados fueron consistentes entre ambos programas (no mostrado).

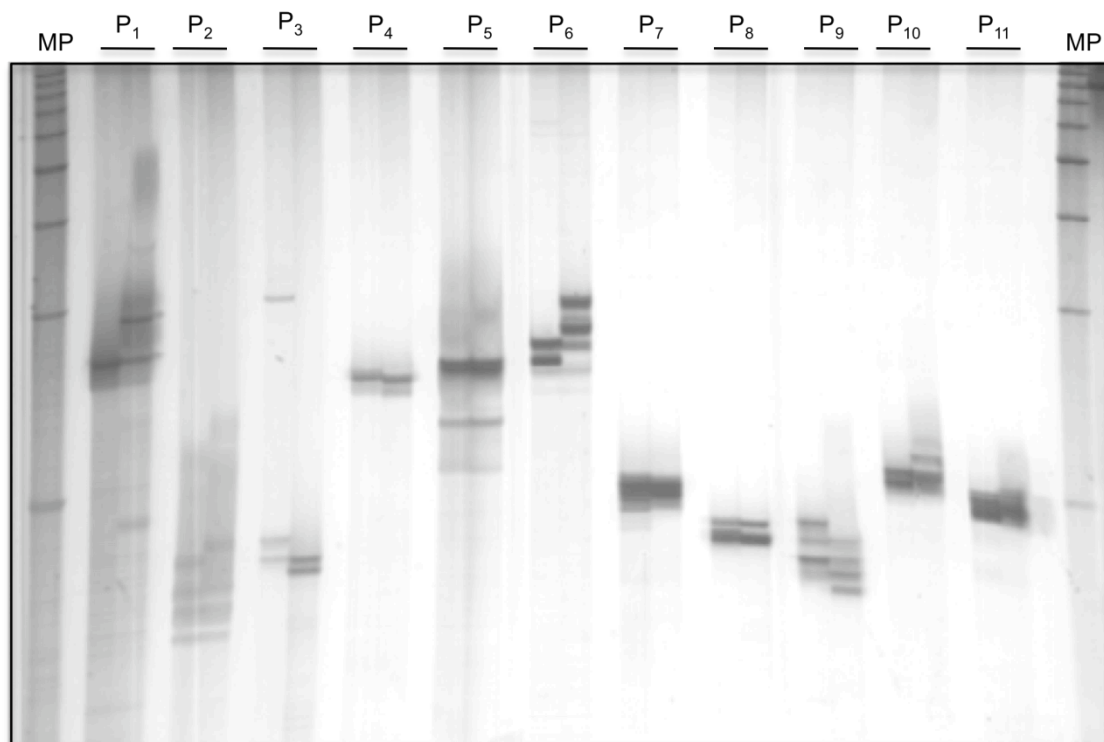
Los resultados de ambos análisis de mapeo fueron integrados en mapas consenso. La localización de los marcadores EST-SSR en los respectivos grupos de ligamiento se muestra en la Figura 12 A (pág. 104-107), Figura 12 B (pág. 108-113) y Tabla XII (pág. 123).

IV.2- Análisis y mapeo de microsatélites genómicos de *Paspalum notatum*

IV.2.1- Amplificación de marcadores microsatélites genómicos en los genotipos Q4188 y Q4117

A partir del desarrollo reciente de marcadores SSR genómicos de *P. notatum* (Cidade et al., 2009) se realizaron experimentos de mapeo genético para localizar estos marcadores en el mapa de ligamiento de la especie. Para esto se ensayaron las 11 combinaciones de oligonucleótidos reportadas por Cidade et al. (2009) (Anexo: Tabla III) sobre los genotipos Q4188 y Q4117. Empleando las mismas condiciones de amplificación que las utilizadas en el trabajo original (ver Materiales y Métodos) todos los marcadores mostraron patrones de bandas claras y consistentes en al menos dos reacciones de amplificación independientes. Los tamaños de bandas obtenidos estuvieron comprendidos en el rango de pares de bases reportados por Cidade et al. (2009). Como se puede observar en la Figura 8 todas los marcadores generaron bandas polimórficas entre los genotipos parentales haciendo de esta manera posible su utilización en experimentos de mapeo genético.

Figura 8: Amplificación de marcadores SSR genómicos de *P. notatum* en los genotipos Q4188 y Q4117.



Gel de acrilamida al 5 % teñido con nitrato de plata mostrando la amplificación de 11 combinaciones de oligonucleótidos de SSR sobre los genotipos Q4188 y Q4117 (cargados uno al lado del otro). MP: Marcador de Peso Molecular (100 bp Marker, Promega). P₁-P₁₁: Ssr1-Ssr11, Pares de oligonucleótidos de SSR utilizados en el análisis. Corresponden a los *loci* nombrados según Cidade et al. (2009): PN03-A5₁, PN03-A6₂, PN03-E9₃, PN03-F2₄, PN03-G8₅, PN03-H10₆, PN03-A12₇, PN03-B5B₈, PN03-F6A₉, PN03-G10₁₀, PN03-H7₁₁.

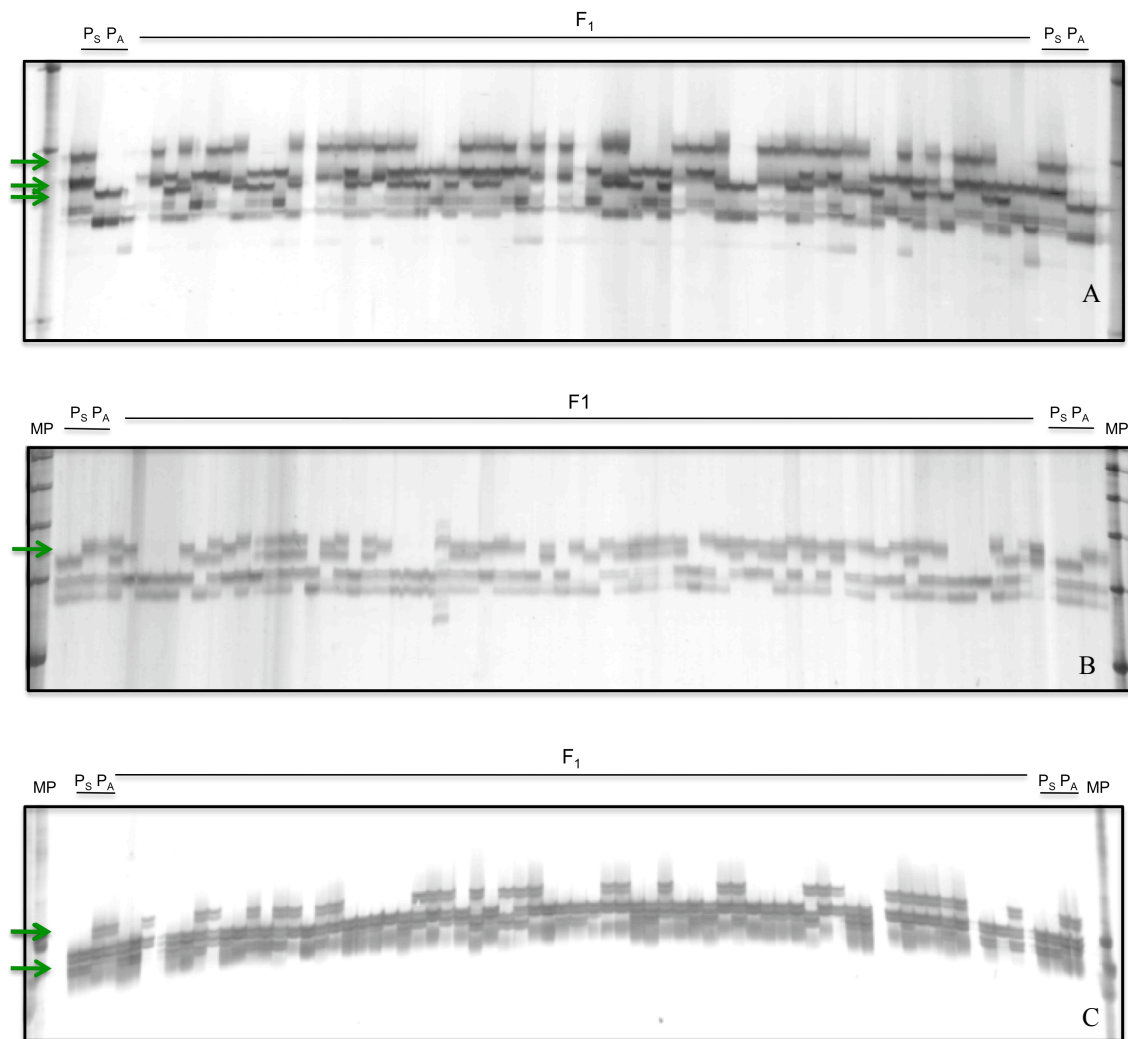
IV.2.2- Localización de marcadores SSR genómicos en *P. notatum*

El juego completo de SSR genómicos fue ensayado sobre la población de mapeo, a fin de determinar fragmentos segregantes que puedan ser localizados en el mapa genético de la especie desarrollado por Stein et al. (2007). Los experimentos de amplificación mostraron patrones similares al que se observa en la Figura 9, donde en la mayoría de los casos fue posible identificar bandas segregantes desde ambos progenitores (Tabla V, Figura 9). En total se obtuvieron 36 marcadores, con un promedio de 3,2 bandas segregantes por marcador. Los mismos correspondieron a 17 marcadores segregantes desde Q4188, 17 desde Q4117 y dos a partir de ambos genotipos (Tabla V). De la misma manera que para el caso de los EST-SSR, la

localización de los marcadores SSR genómicos se basó en la detección de alelos en dosis simples (Stein et al., 2007) (Tabla V). El análisis de ligamiento realizado con el programa Mapmaker 3.0/Exp (Lander et al., 1987), de acuerdo a lo descrito anteriormente, determinó que 12 marcadores SSR genómicos (del tipo 1:1) de Q4188 y 13 de Q4117, resultaron ligados a marcadores previamente localizados los mapas genéticos correspondientes. En la Tabla XII y la Figura 12 se muestra la localización de cada uno de los marcadores SSR en los mapas tetraploides de *P. notatum*. Los mismos fueron asignados a cinco y 11 grupos de ligamiento de Q4188 y Q4117, respectivamente.

En este caso también se realizó el análisis de ligamiento utilizando JoinMap3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001). En el mismo se incluyeron los datos de los marcadores de tipo 1:1 y 3:1 (biparentales). Este análisis determinó que los mismos 12 marcadores SSR genómicos del tipo 1:1 asignados por Mapmaker 3.0/Exp., más un marcador biparental fueron localizados en el mapa de Q4188. En el caso del genotipo Q4117, el análisis permitió asignar 17 marcadores SSR genómicos de los cuales 15 fueron del tipo 1:1 y dos del tipo biparental (3:1). Como se puede observar en la Tabla XII y la Figura 12 (A-B) los marcadores SSR se distribuyeron de manera dispersa en ambos mapas genéticos, sobre 5 y 15 grupos de ligamiento de Q4188 y Q4117 respectivamente (Figura 12).

Figura 9: Amplificación de marcadores SSR genómicos en la población de mapeo de *P. notatum*



Geles de acrilamida al 5 % teñidos con nitrato de plata mostrando la amplificación del marcador SSR- P_6 (Ssr6) (A), SSR- P_2 (Ssr2) (B) y SSR- P_{10} (Ssr10) (C) sobre los genotipos parentales Q4188 (P_S) y Q4188 (P_A) y los individuos de la población de mapeo. MP: Marcador de Peso Molecular (100 bp Marker, Promega). Las flechas indican los marcadores segregantes en una relación 1:1

Tabla V: Análisis de segregación de marcadores SSR genómicos en la población segregante de *P. notatum*

Clase de Marcador (SSR)	Configuración alélica y relación de segregación esperada					Total
	ADS	ADD		Dist.		
	1:1	3:1	5:1	1:3-1:6*	otros**	
Materno	13	2	2	0	1	17
Paterno	14	0	2	1	0	17
Biparental	-	2	-	0	0	2
Total	27	4	4	1	1	36

ADS: alelos en simple dosis, ADD: alelos en doble dosis, Dist.: distorsionados. *Marcadores distorsionados que ajustaron a una segregación 1:3 – 1:6. **Marcadores que mostraron valores de segregación que no se ajustaron a ninguno de los valores indicados en la Tabla V.

IV.3- Desarrollo de marcadores COS a partir de genes relacionados a componentes de la apomixis en especies de gramíneas

Como parte inicial de estudios tendientes a localizar genes asociados a componentes de la apomixis en especies de gramíneas sobre el mapa genético de *P. notatum*, se realizaron una serie de experimentos tendientes a desarrollar marcadores de tipo COS (*conservative orthologous set*) en la especie. Como punto de partida se seleccionaron los genes: *serk* (*somatic embryogenesis like-kinase*) y *apostar* que fueron relacionados al desarrollo de los sacos embrionarios de tipo apospóricos en *Poa pratensis* (Albertini et al., 2005), el gen *baby boom*, descrito como promotor de la expresión ectópica de embriones somáticos en *Pennisetum* (Conner et al., 2008) y los genes *pkd* (*protein kinase domain*) y *exs* (un receptor del tipo quinasa rico en leucinas), recientemente identificados en un clon de BAC de *P. simplex* que contiene marcadores moleculares completamente ligados a la aposporia en la especie (Calderini et al., 2006). Con el objetivo de aislar secuencias homólogas a estos genes desde *P. notatum*, se apilaron las secuencias correspondientes de *Poa pratensis*, *Zea mays* y *Oryza sativa* y se diseñaron cebadores sobre las regiones conservadas para su amplificación por PCR (Anexo: Tabla IV). Las reacciones de amplificación se realizaron sobre el ADN de los genotipos Q4188, Q4117 y un grupo de progenies F₁. En base a esta estrategia, se obtuvieron amplicones derivados de los genes *serk*, *apostart*, *baby boom* y *pkd*.

En el caso del gen *serk*, se obtuvo un amplicón de 200 pb a partir de ambos genotipos parentales (Figura 10). El mismo resultó monomórfico y no segregante en la muestra de la población analizada. Los fragmentos amplificados a partir de Q4188 y Q4117 fueron clonados y secuenciados. Los análisis de secuencias determinaron que los fragmentos obtenidos resultaron altamente similares (E-value $5e^{-67}$, 91-90% de identidad y 90 % de cobertura) a las accesiones AJ841697,1/AJ841698,1 de *Poa pratensis*, correspondientes a los genes *serk2/serk1* de la especie (Tabla VI A). Este resultado confirmó la identidad de la secuencia buscada y permitió el aislamiento de un fragmento del gen *serk* de *P. notatum* (*Pnserk1*). Sin embargo, a pesar de realizar varios intentos en donde se variaron las condiciones experimentales de amplificación, no fue posible detectar polimorfismos para esta secuencia entre los genotipos Q4188 y Q4117. Este resultado no permitió el desarrollo de marcadores COS para este gen.

En el caso del gen *apostar* la amplificación de los fragmentos conservados generó seis fragmentos, tres de los cuales resultaron polimórficos entre los progenitores

y segregantes en la población de mapeo en una relación por presencia/ausencia 1:1. Dos fragmentos específicos del progenitor Q4117 fueron ensayados en la totalidad de la población segregante y localizados en el mapa correspondiente. Uno de los fragmentos (*CosAstpa*) fue asignado al grupo de ligamiento P2a (Figura 12 B, Tabla XII), mientras que el restante resultó no ligado (no fue asignado a ningún grupo de ligamiento). De la misma manera, el fragmento segregante del progenitor Q4188 no pudo ser asignado a ninguno de los grupos maternos previamente identificados. Todos los intentos realizados tendientes a clonar estos fragmentos y analizar las respectivas secuencias fallaron, por lo cual no fue posible asignarles identidad.

Los experimentos realizados con los cebadores correspondientes al gen *baby boom* mostraron la amplificación de varios fragmentos en ambos progenitores, de los cuales dos (*Cosbbma* y *Cosbbmb*), derivados del genotipo Q4188, resultaron polimórficos y segregantes en la población (Figura 11 A). El análisis de ligamiento de ambos fragmentos mostró que los mismos se localizaron separados en los grupos M2 (*Cosbbma*) y M20 (*Cosbbmb*) (Figura 12 A, Tabla XII). A partir de estos resultados se decidió clonar ambos fragmentos y determinar la identidad de los mismos (Figura 11 A). Los experimentos realizados permitieron aislar solo el marcador *Cosbbmb*. El análisis de la secuencia mostró similitud con proteínas hipotéticas de maíz y arroz y un precursor de peroxidasa de arroz (Tabla VI B). Este resultado indicó que el marcador segregante no correspondió a una secuencia ortóloga del gen *baby boom*. Debido a esto no fue posible determinar la localización de la secuencia homóloga a este gen en *P. notatum* y los marcadores obtenidos fueron considerados como marcadores anónimos.

En el caso del gen *pkd*, las amplificaciones realizadas con los cebadores específicos generaron tres fragmentos en el genotipo Q4188 y 2 en Q4117 (Figura 11 B). Uno de los fragmentos derivados de Q4188 (*Cospkmb*) resultó polimórfico y segregante (en una relación 1:1) en la población F₁. El análisis de ligamiento de este fragmento determinó que el mismo se localizó en el grupo de ligamiento M3a (Figura 12 A). Dicho fragmento fue clonado y secuenciado. En la Tabla VI C se muestran los resultados de los alineamientos obtenidos con este marcador en la base de datos del NCBI. Uno de los alineamientos mostró similitud con el *locus* Os12g0210400 de arroz que codifica para una proteína receptora rica en repeticiones de leucina (*leucine-rich repeat receptor-like protein kinase*) que mapea en el cromosoma 12 (Tabla VI C). En este caso tampoco pudo asignarse similitud con el gen *pkd* de *P. simplex* por lo cual fue considerado como marcador anónimo.

Tabla VI: Análisis de similitud de secuencias de fragmentos derivados de regiones conservadas de los genes A) *serk*, B) *baby boom* y C) *pkd*

A) Análisis de BLAST del fragmento obtenido a partir de la secuencia del gen *serk*

Accesión	Descripción	S	C	E value	I
AJ841697.1	<i>Poa pratensis serk2</i> gene for somatic embriogénesis receptor-like kinase	259	90%	$5e^{-67}$	91%
AJ841698.1	<i>Poa pratensis serk1</i> gene for somatic embriogénesis receptor-like kinase	248	90%	$9e^{-64}$	90%
NM_00105298.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) Os02q0236100	224	88%	$1e^{-56}$	88%
AP008208.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 2	224	88%	$1e^{-56}$	88%
AP003991.3	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 2, BAC clon	224	88%	$1e^{-56}$	88%
AK120541.1	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone:J013129G20, full insert sequence	224	88%	$1e^{-56}$	88%

B) Análisis de BLAST del fragmento clonado a partir de la secuencia del gen *baby boom*

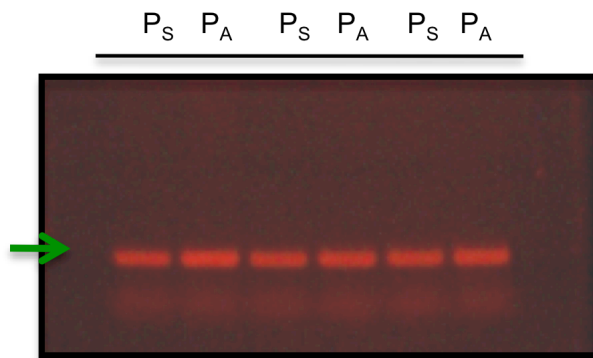
Accesión	Descripción	S	C	E value	I
XM_002440499.1	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA	241	18%	$8e^{-61}$	92%
EU956436.1	<i>Zea mays</i> clone 1563337 mRNA sequence	228	23%	$5e^{-57}$	85%
NM_001139072.1	<i>Zea mays</i> hypothetical proteína LOC100194008, mRNA >gbBT036423.1 <i>Zea mays</i> full-lengthcDNA ZM_BFb0112P12mRNA, complete cds	228	23%	$5e^{-57}$	85%
BN000598.1	TPA: TPA_inf: <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) prx69 gene for class III peroxidase 69 precursor, exons 1-2	170	17%	$1e^{-39}$	84%

C) Análisis de BLAST del fragmento clonado a partir de la secuencia del gen *pkd*

Accesión	Descripción	S	C	E value	I
AP008218.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 12	230	50%	$2e^{-10}$	100%
NM_001072932.1	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) Os12g0210400 (Os12g0210400) mRNA, complete cds, leucine-rich repeat receptor-like protein kinase.	130	49%	$7e^{-09}$	90%
CT829333.1	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J01359D03, full insert sequence	130	49%	$7e^{-09}$	90%
AK252424.1	<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group) cDNA clone: OSIGRA117M01, full insert sequence	123	48%	$8e^{-08}$	88%

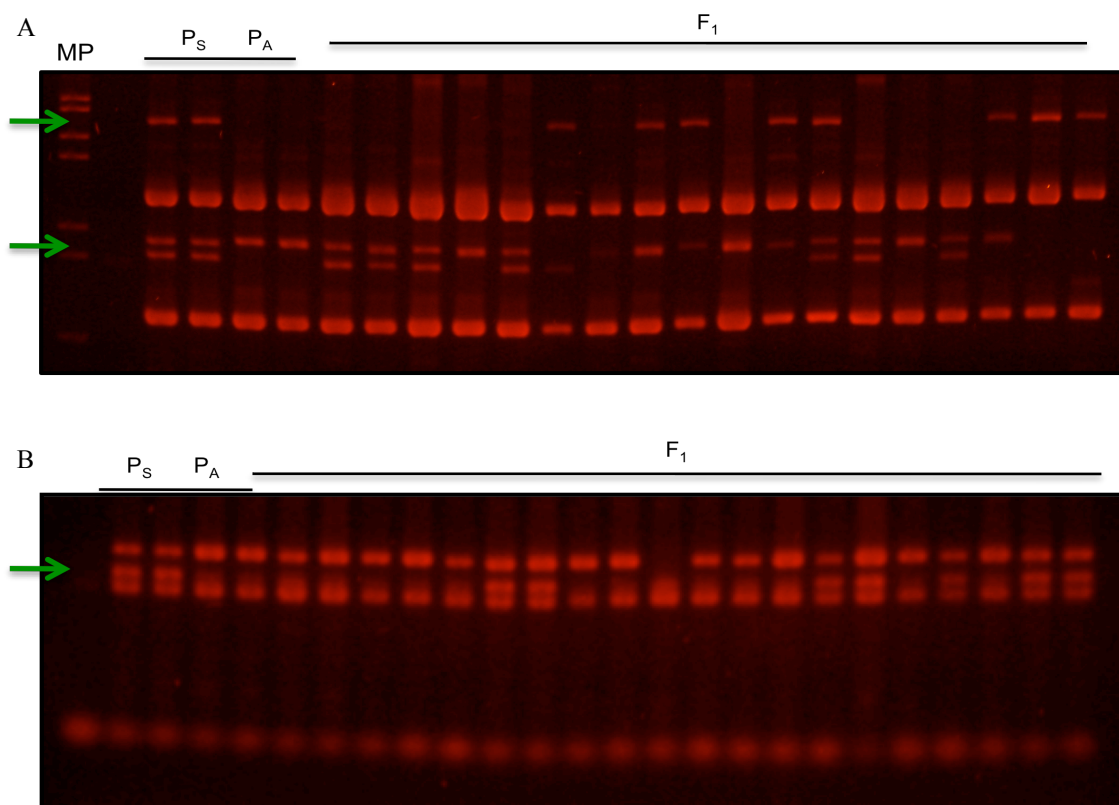
S: Score, C: Cobertura, I: Identidad.

Figura 10: Aislamiento de un fragmento conservado del gen *serk* de *P. notatum*



Gel de agarosa al 2,5 % teñido con bromuro de etidio del producto de amplificación de los cebadores F1 y R1 *serk* sobre el ADN de los genotipos parentales. P_S: Q4188, P_A: Q4117 La flecha indica la banda clonada. Anexo; Tabla IV

Figura 11: Mapeo de marcadores tipo COS desarrollados a partir de los genes *baby boom* (A) y *pkd* (B) en *P. notatum*



Geles de agarosa al 2,5 % teñido con bromuro de etidio mostrando el producto de amplificación de los marcadores COS derivados de los genes (A) *baby boom* y (B) *pkd*, sobre los genotipos parentales. P_S: Q4188, P_A: Q4117 y una muestra de la población de mapeo (F₁). MP: marcador de peso molecular lambda ADN *EcoRI/HindIII*. La flecha indica las bandas segregantes que fueron seleccionadas para los estudios de ligamiento. Anexo; Tabla IV.

IV.4- Expansión del mapa genético de *Paspalum notatum* a partir de la incorporación de marcadores SSR y COS

El análisis de mapeo realizado en este trabajo de tesis, considerando los tres tipos de marcadores utilizados (EST-SSR, SSR genómicos y COS), permitió la incorporación de 44 y 66 nuevos marcadores en los mapas de los genotipos Q4188 y Q4117, respectivamente (Tabla VII). Los marcadores generados se distribuyeron en 19 y 33 grupos de ligamiento maternos (Q4188) y paternos (Q4117), respectivamente. Estos marcadores junto con los ya existentes generaron un total de 34 (Q4188) y 45 (Q4117) grupos de ligamientos en los genotipos analizados y posibilitaron definir ocho y seis grupos de ligamientos desconocidos en los mapas de Q4188 y Q4117, respectivamente. Este resultado contribuyó a extender la cobertura del mapa de ligamiento existente. De los 44 marcadores incluidos en Q4188, 28 pertenecen al grupo EST-SSR genómicos, 15 de los cuales corresponden a la serie Cnl (uno biparental y 14 maternos) y 14 a la serie Ksum (uno biparental). Los SSR genómicos representaron 12 marcadores del total, de los cuales solo uno fue biparental. Además, en este mapa se incorporaron tres marcadores de tipo COS derivados de las secuencias de *apostart* (*CosAstpa*), *baby boom* (*Cosbbmb*) y *pkd* (*Cospkmb*) (Tabla VII).

De los 66 marcadores incorporados en el mapa de Q4117, 48 correspondieron a marcadores genómicos (24 de la serie Cnl y 24 de la serie Ksum). De los marcadores de la serie Cnl, solo uno fue biparental. Por otro lado, en este caso se localizaron 17 marcadores SSR genómicos de los cuales dos fueron biparentales y por último solo fue posible la localización de un marcador de tipo COS (*cosAst1*) (Tabla VII). La localización de la totalidad de los marcadores nuevos incorporados a los mapas genéticos de Q4188 y Q4117 se muestra en la Figura 12 (A-B).

En este punto cabe destacar que los tres marcadores que fueron asignados al grupo de ligamiento P17a (*ksum206pbd*, *ksum219pbd* y *Ssr4pad*) junto con un marcador (*Ksum108pjd*) asignado a P17b presentaron segregación distorsionada (Figura 15, ver pág. 134). Esto está de acuerdo con lo establecido en trabajos previos acerca del tipo de segregación observada en marcadores que se localizan en la región genómica asociada al carácter aposporia en *P. notatum* (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007).

Tabla VII: Número de marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS incorporados en los mapas de ligamiento genético de Q4188 y Q4117.

Mapa	Clase de Marcador	Tipo de Marcador				Total
		EST-SSR		SSR	COS	
		Cnl	Ksum			
Q4188	Materno	14	13	11	3	41
	Biparental	1	1	1	-	3
	Total	15	14	12	3	44
Q4117	Paterno	23	23	15	1	62
	Biparental	1	1	2	-	4
	Total	24	24	17	1	66

Figura 12 A: Mapa genético consenso del genotipo Q4188 mostrando la localización de los marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS.

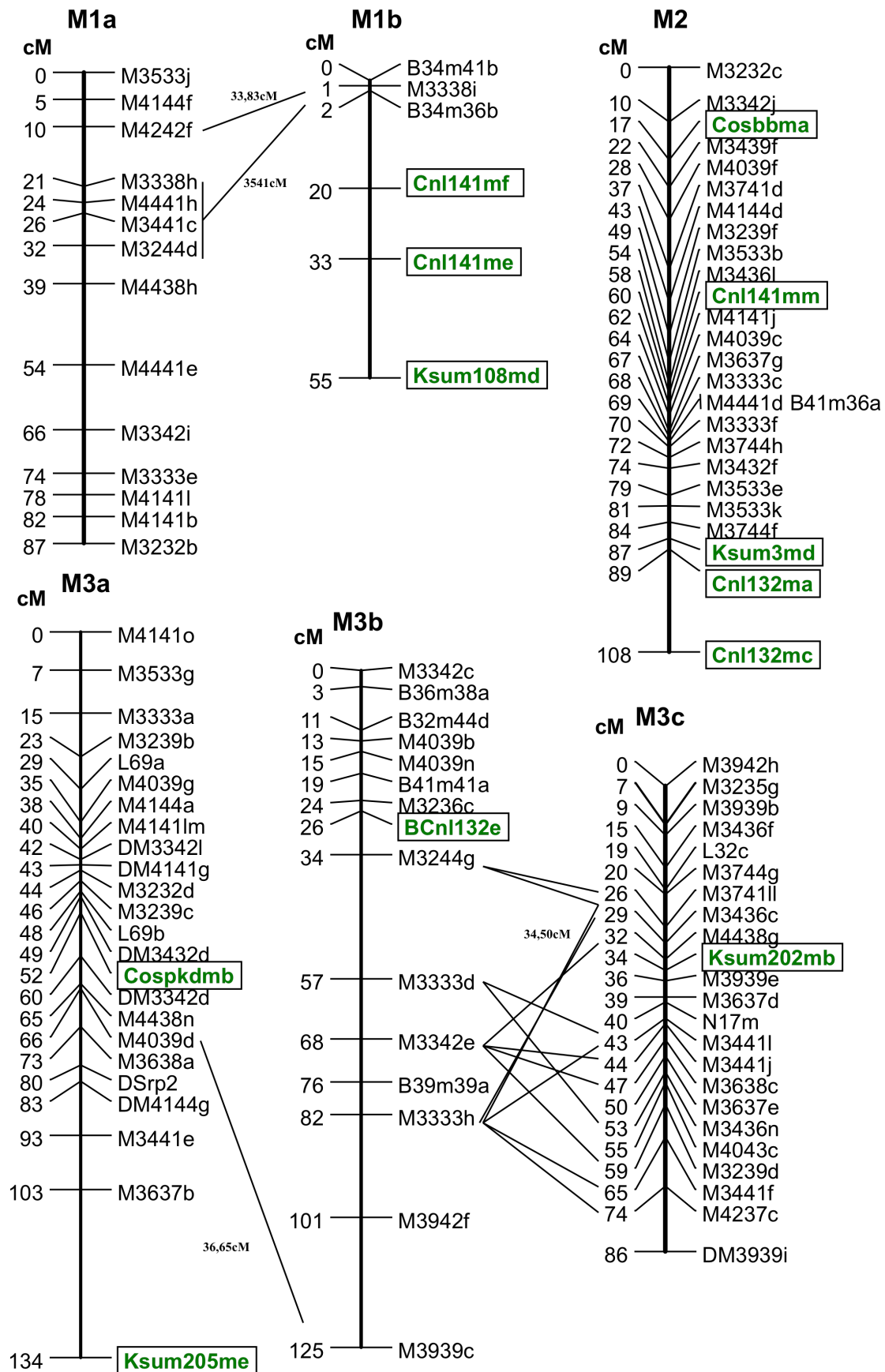


Figura 12 A (continúa)

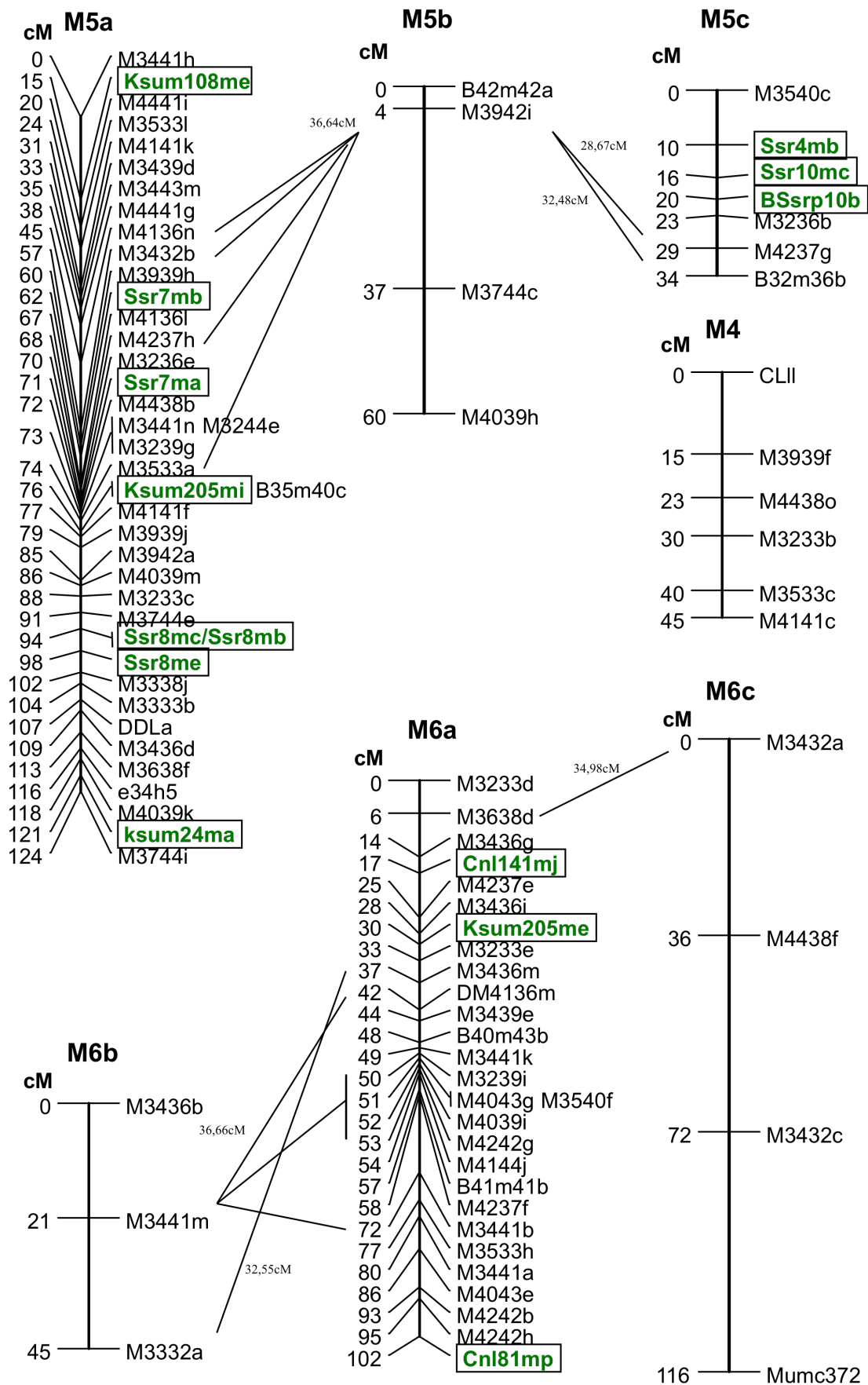


Figura 12 A (continúa)

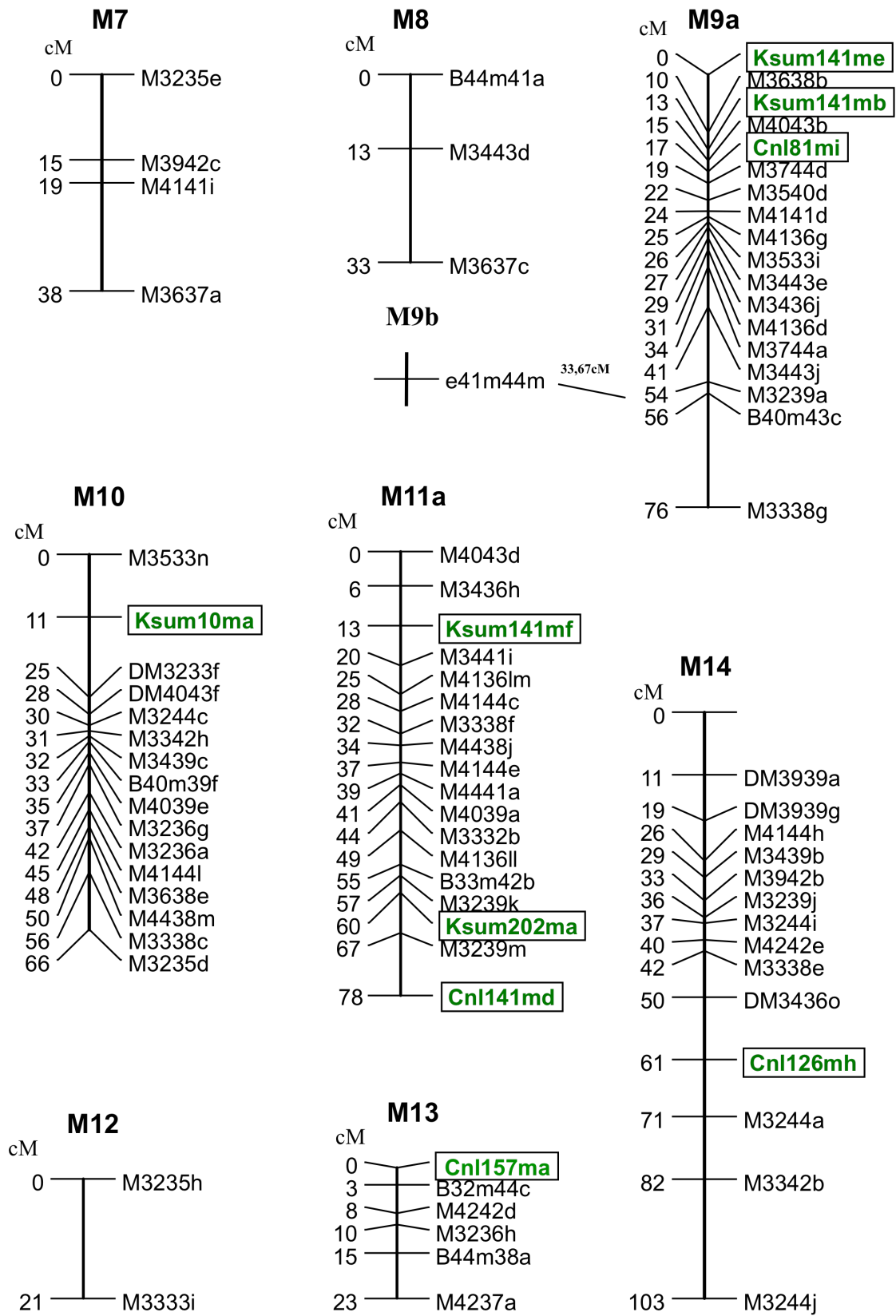


Figura 12 A (continua)

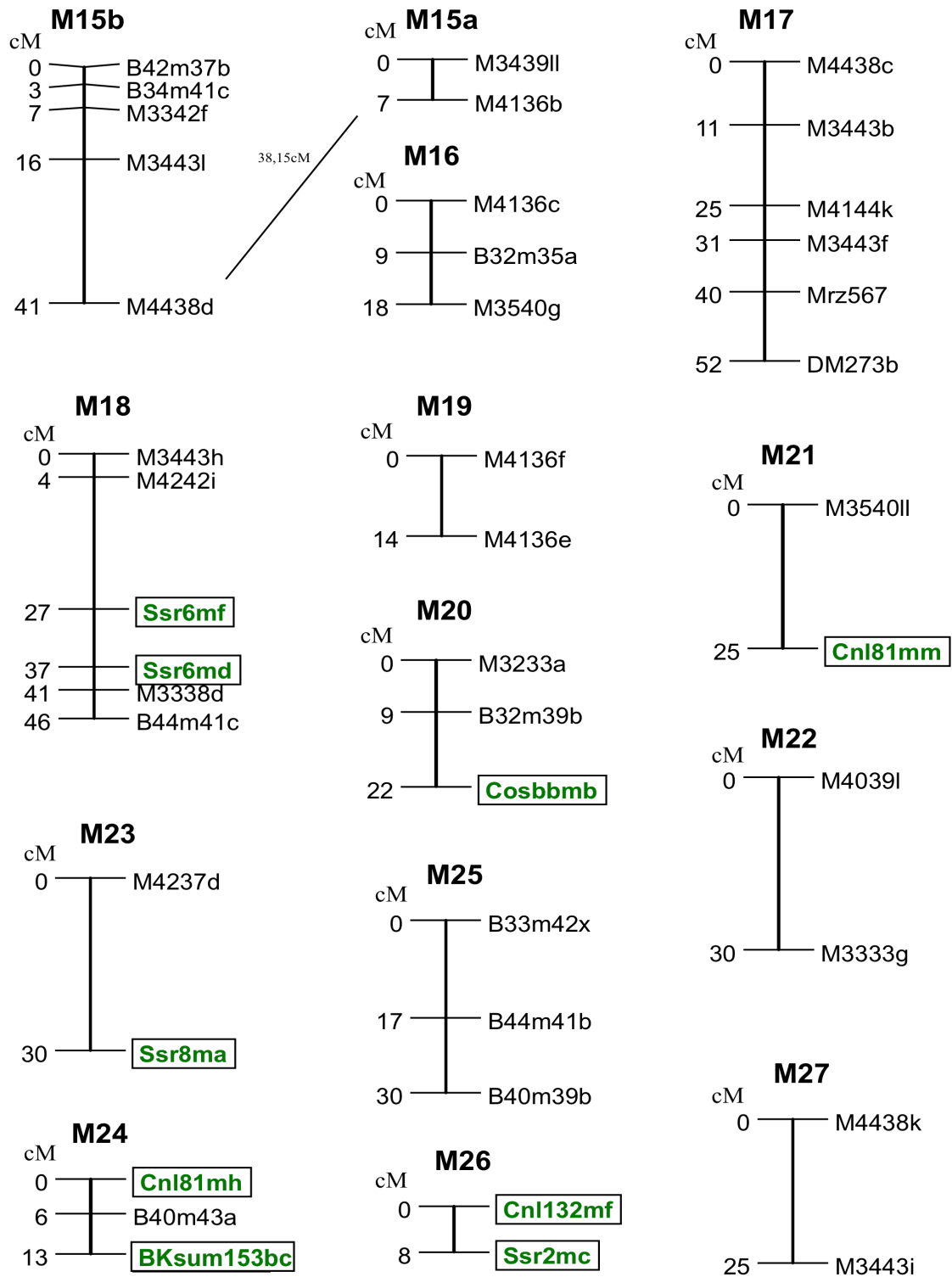


Figura 12 A

Los marcadores EST-SSR (Ksum y Cnl), SSRs y COS están enmarcados y resaltados en verde. Los mismos se asignaron a los grupos de ligamientos de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, con un LOD score mínimo de 2.0. El nombre de los marcadores y la distancia en cM se indican a la derecha y a la izquierda de cada grupo, respectivamente. Las líneas transversales indican marcadores ligados en fase de repulsión según Stein et al. (2007). El mapa consenso fue definido a partir del análisis de ligamiento realizado con los programas de mapeo Mapmaker 3.0/Exp (Lander et al., 1987) y JoinMap3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001).

Figura 12 B: Mapa genético consenso del genotipo Q4117 mostrando la localización de los marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS.

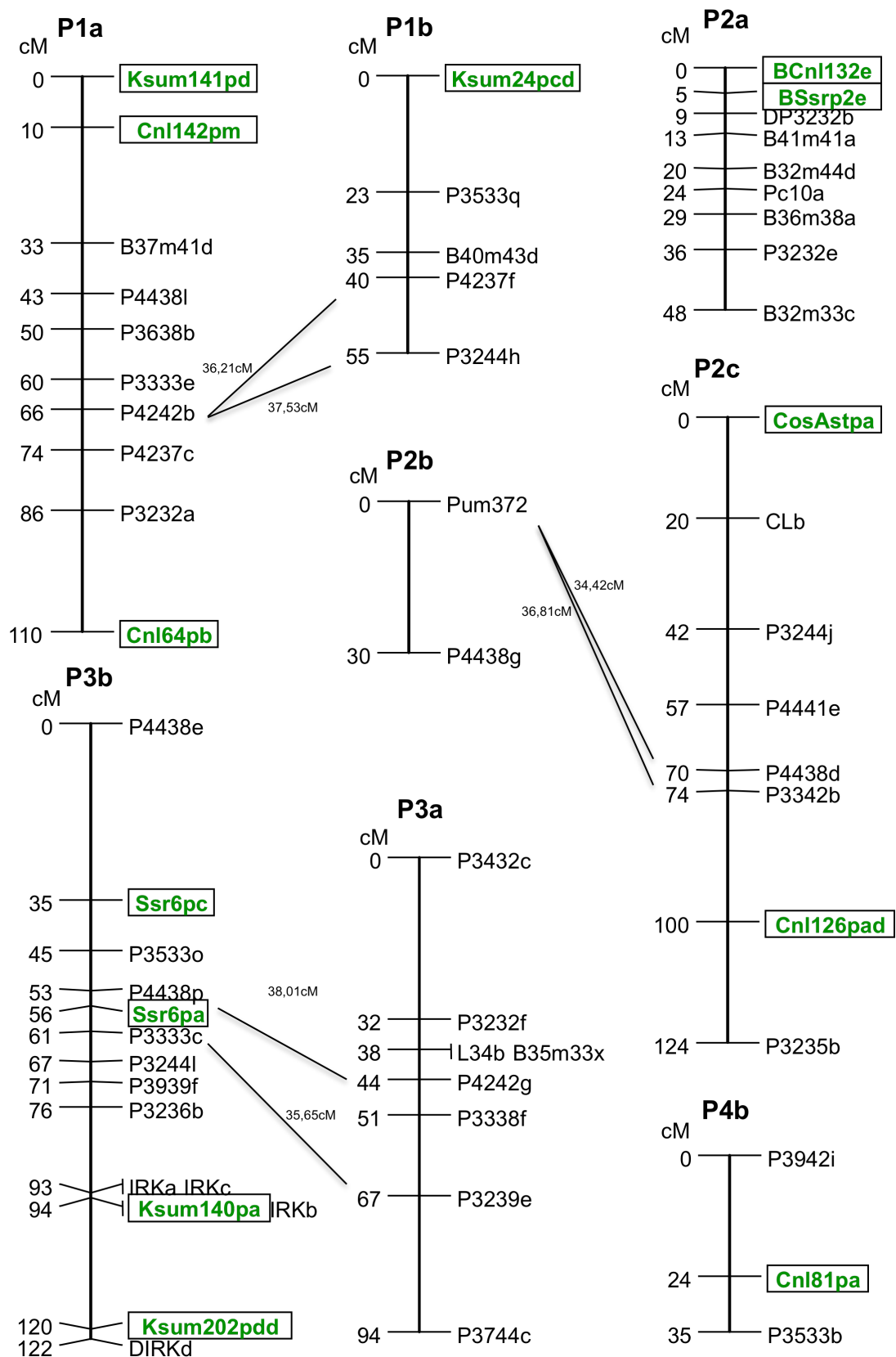


Figura 12 B (continúa)

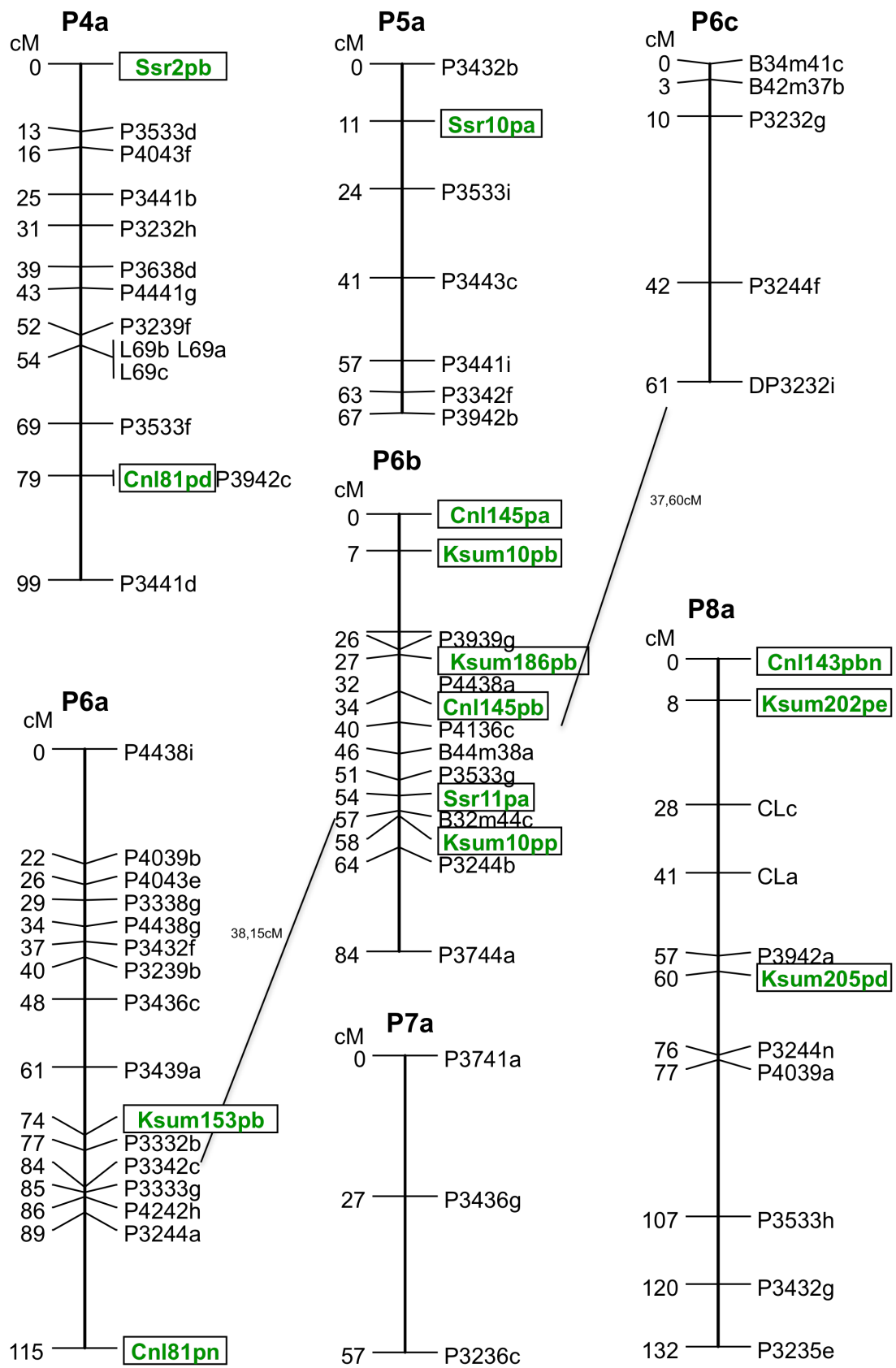


Figura 12 B (continúa)

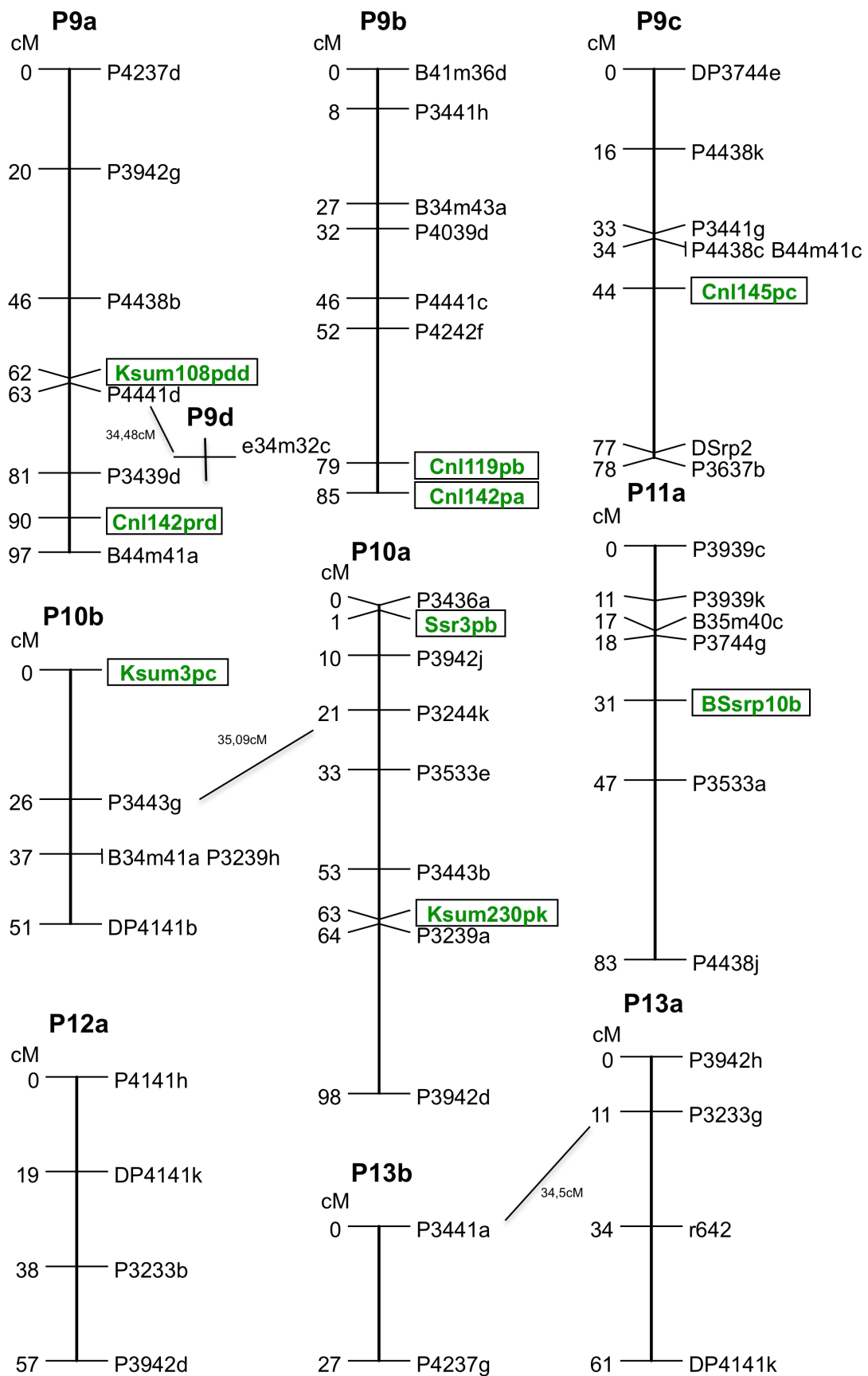


Figura 12 B (continua)

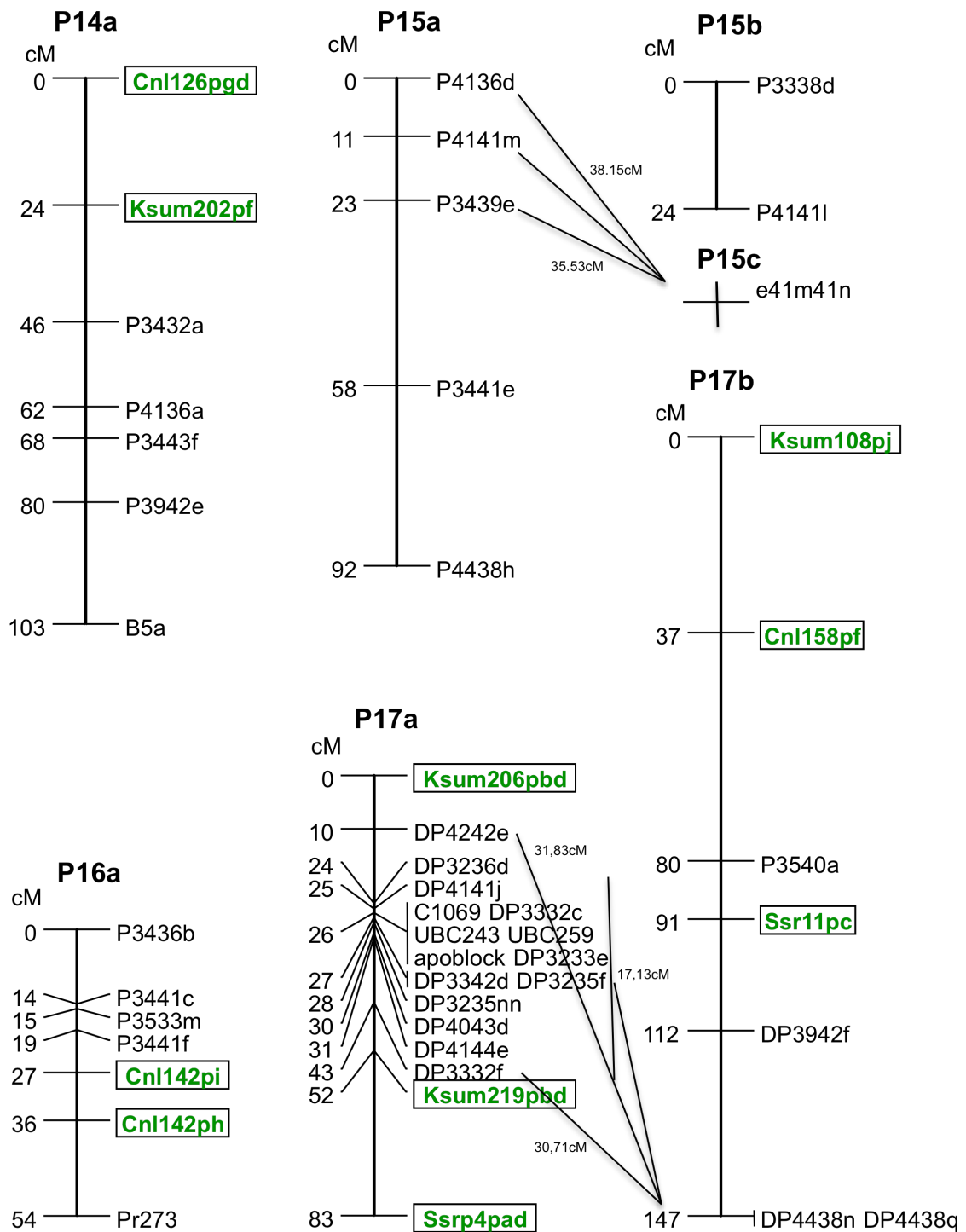


Figura 12 B (continúa)

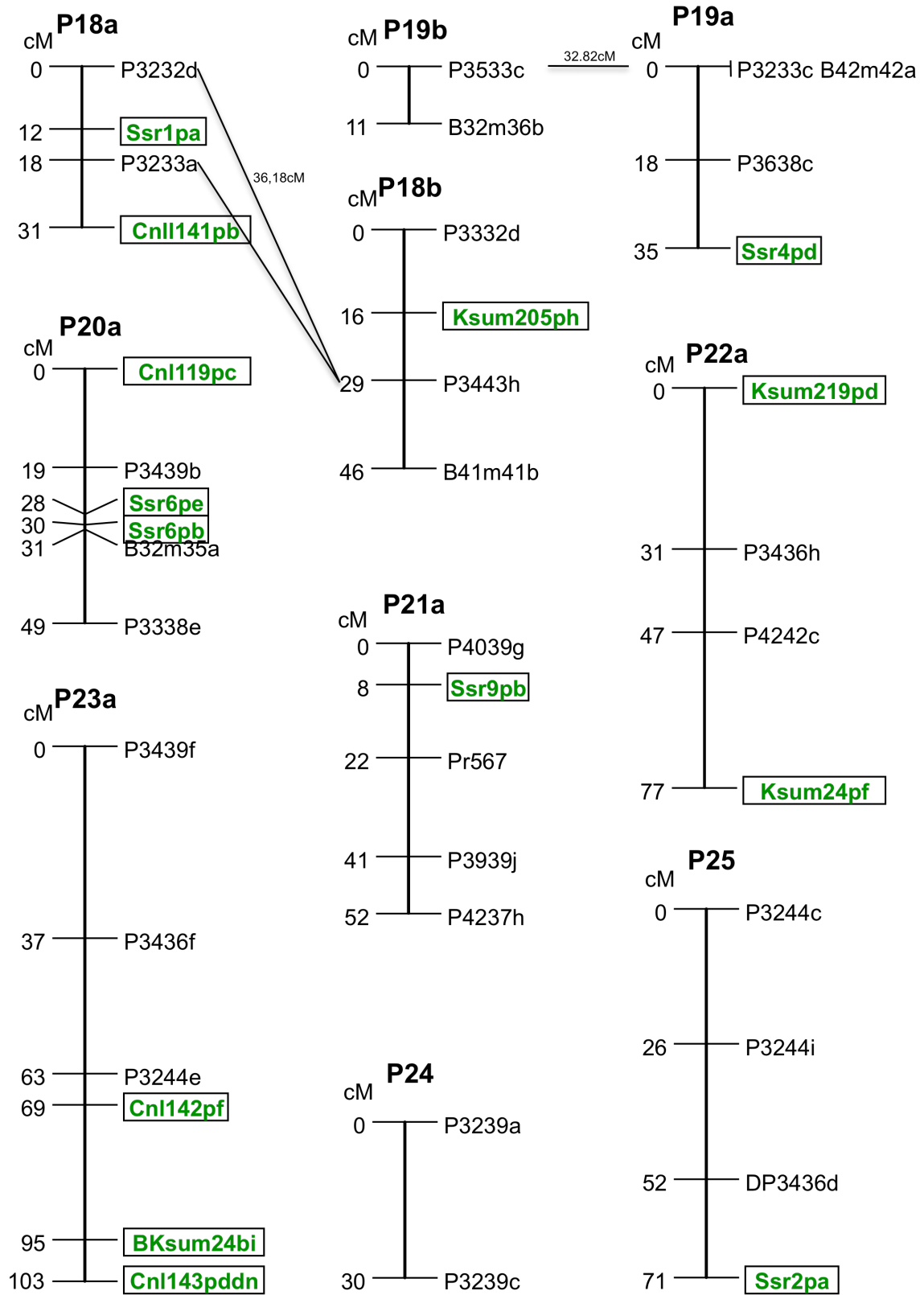


Figura 12 B (continúa)

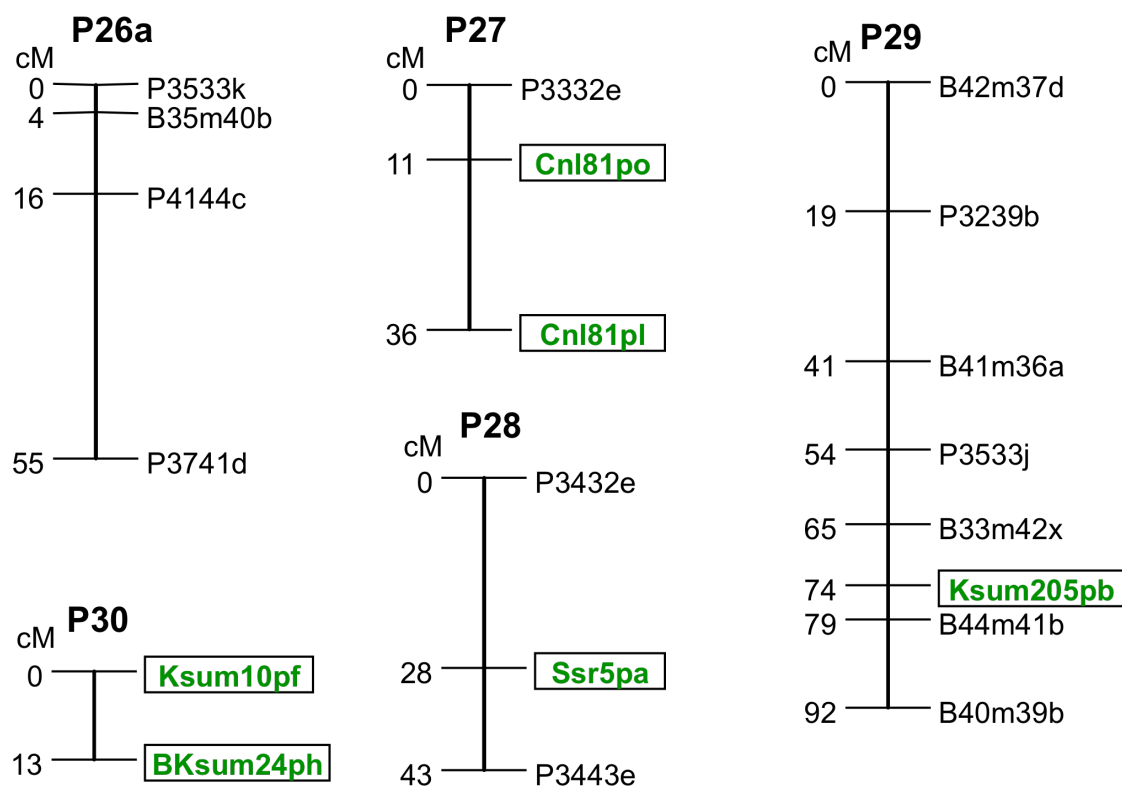


Figura 12 B

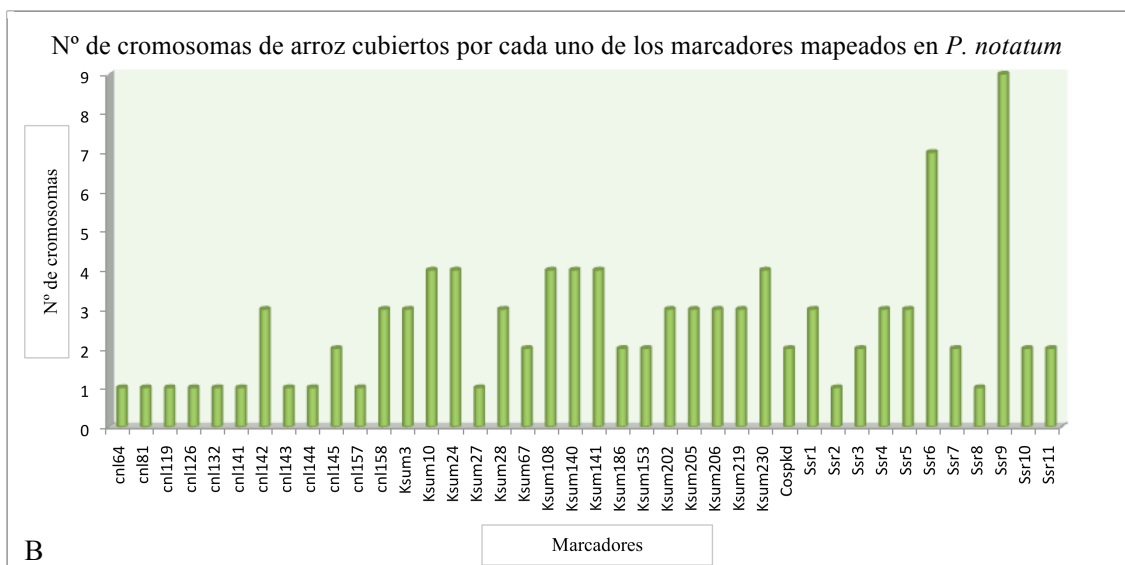
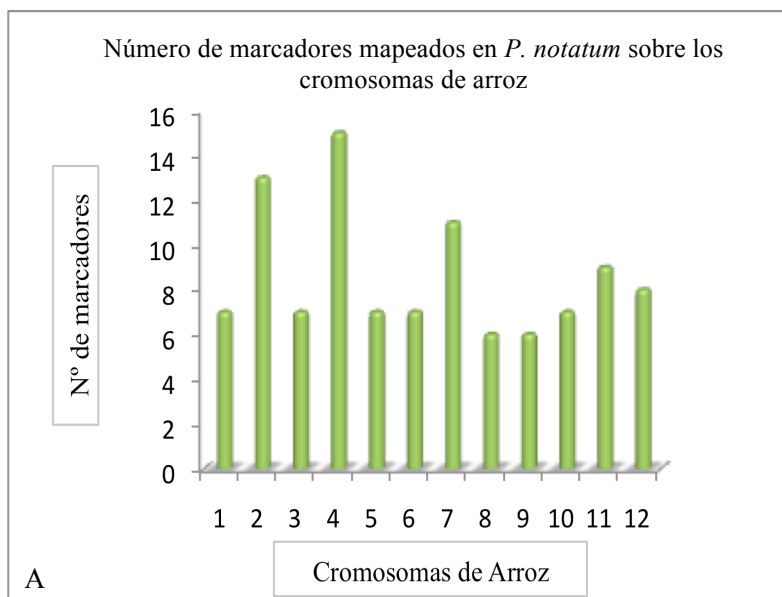
Los marcadores EST-SSR (Ksum y Cnl), SSRs y COS están enmarcados y resaltados en verde. Los mismos se asignaron a los grupos de ligamientos de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, con un LOD score mínimo de 2.0. El nombre de los marcadores y la distancia en cM se indican a la derecha y a la izquierda de cada grupo, respectivamente. Las líneas transversales indican marcadores ligados en fase de repulsión según Stein et al. (2007). El mapa consenso fue definido a partir del análisis de ligamiento realizado con los programas de mapeo Mapmaker 3.0/Exp (Lander et al., 1987) y JoinMap3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001).

IV.5- Estudios de mapeo comparativo

IV.5.1- Cobertura del genoma de arroz alcanzada con los marcadores mapeados en *P. notatum*

En la Figura 13 A se muestra la cobertura del genoma de arroz alcanzada con los marcadores localizados en el genoma de *P. notatum*. En el caso de los marcadores EST-SSR la información fue tomada de Yu et al. (2004b), mientras que para los marcadores SSR genómicos y COS fue determinada experimentalmente a partir del mapeo *in silico* sobre la base GRAMENE (www.gramene.org) (ver más adelante). En promedio se obtuvieron ocho marcadores por cromosoma, con un mínimo de seis y un máximo de 15. En la Figura 13 B se muestra el número de cromosomas de arroz cubierto por cada marcador. Como es posible observar, la mayoría de los marcadores EST-SSR derivados de la serie Cnl cubren solo un cromosoma, (aunque el marcador Cnl145 se localiza en tres y los marcadores Cnl142 y Cnl158 en cuatro cromosomas). En el caso de la serie Ksum, la mayoría ocupa más de un cromosoma (entre dos y cuatro) (Figura 13 B). Con respecto los SSR génicos se puede observar que de los 11 clones reportados por Cidade et al. (2009), nueve mapearon entre uno y tres cromosomas y dos (FJ672065 (Ssr6) y Fj572068 (Ssr9)) mapearon en siete y nueve cromosomas. Estos resultados muestran que los marcadores localizados en los mapas genéticos de *P. notatum* presentan una amplia distribución en arroz y un cobertura aceptable del genoma de esta especie.

Figura 13: Cobertura del genoma de arroz (A) y número de cromosomas (B) donde se localizan los marcadores EST-SSR utilizados en este trabajo.



IV.5.2- Localización de marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS en arroz y maíz mediante mapeo *in silico*

Con el objetivo de determinar la distribución de los marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS utilizados en esta tesis sobre los genomas de arroz y maíz, y de esta manera comparar la disposición de los mismos entre las tres especies, se realizó un análisis de mapeo *in silico* utilizando la base de datos GRAMENE (www.gramene.org) y maizesequence (www.maizesequence.org). Para el caso especial de la localización de los marcadores de EST-SSR sobre el genoma de arroz esta información fue tomada directamente de la página correspondiente a la base de datos de la Universidad de Cornell (USA). Para los demás casos (SSR genómicos y COS) se realizaron experimentos de mapeo *in silico* a fin de identificar secuencias ortólogas en los genomas de arroz y maíz. En todos los casos se tomó como criterio para asignar ortología los siguientes parámetros: *i*) valor de S (“score”) mayor a 100, *ii*) valor umbral de alineamiento al azar sobre la base (*E-value*) menor a 0,01 y *iii*) un porcentaje de identidad igual o mayor al 60 % sobre una longitud de por lo menos del 60 % de la secuencia en estudio (“query”) (Salse et al., 2003). Además, se seleccionaron aquellos alineamientos en donde la secuencia en estudio (“query”) presentó el microsatélite contenido en el clon original.

La Tabla VIII muestra un resumen de las posibles secuencias ortólogas detectadas en maíz cuando se analizaron los 28 clones de EST-SSR de trigo mapeados en *P. notatum*. En la misma, además, están presentes los parámetros obtenidos para cada uno de los alineamientos. Como se puede observar, la mayoría de los marcadores mostró similitudes con más de una secuencia molde (*subject*) (en promedio cuatro) con valores umbrales (*E-value*) menores a $1 e^{-3}$ y una similitud mayor al 60 %. Estos alineamientos permitieron detectar secuencias ortólogas en ambas especies y fijar puntos de referencias para realizar el mapeo comparativo.

Tabla VIII: Localización de secuencias ortólogas a marcadores EST-SSR de trigo en el genoma de maíz por medio de experimentos de mapeo *in silico*. Los marcadores indicados fueron previamente localizados en el mapa genético de *P. notatum*.

Marcador	Clon de EST	Motivo SSR	tamaño trigo	Maíz ¹	score ²	E-value ²	ID ²	long ²
cnl64	BE423103	(cct) ₆	254	5	422	5,0e ⁻¹³	67,92%	265
				4	326	1,2e ⁻⁸	65,55%	238
				2	288	6,9e ⁻⁷	65,59%	186
cnl81	AU032107	(gca) ₅	267	4	502	1,6e ⁻⁶⁴	67,08%	319
				3	273	3,3e ⁻⁶	63,72%	215
				1	265	4,5e ⁻⁶	59,33%	268
cnl119	AF03953	(ct) ₁₀	474	6	447	1,8e ⁻⁴⁰	69,57%	447
				2	40	2,8e ⁻³	62,61%	230
				5	38	1,4e ⁻²	58,60%	500
cnl126	AU069138	(gac) ₇	150	3	551	1,4e ⁻³	81,03%	174
				6	248	3,1e ⁻⁵	64,09%	181
				7	226	5,5e ⁻³	62,33%	215
				1	223	9,1e ⁻³	59,40%	298
cnl132	BE606854	(gtt) ₄	281	7	345	1,2e ⁻⁹	64,21%	285
				1	334	5,5e ⁻⁹	62,07%	290
				3	275	2,3e ⁻⁶	59,93%	292
				2	266	7,0e ⁻⁶	59,73%	298
cnl141	BE060826	(ctt) ₇	341	2	813	7,4e ⁻³²	64,32%	611
				10	700	1,1e ⁻²⁶	64,93%	700
				4	382	4,0e ⁻⁹	59,79%	485
				6	364	1,1e ⁻⁸	58,05%	503
				8	347	1,3e ⁻⁷	58,00%	568
cnl142	BE414104	(ccg) ₆	218	4	653	1,1e ⁻²⁴	80,49	205
				1	255	1,5e ⁻⁵	62,61	222
				3	229	2,1e ⁻⁴	61,50%	200
				2	221	5,5e ⁻⁴	62,02%	208
				5	210	1,2e ⁻³	61,19%	219
				10	201	4,4e ⁻³	59,62%	213
cnl143	BE517078	(gcc) ₅	129	10	309	5,1e ⁻⁸	74,81%	135
				3	262	6,9e ⁻⁶	73,77%	122
				2	180	3,2e ⁻²	68,27%	181
				7	169	1,1e ⁻¹	64,71%	119
cnl145	BE482249	(cgct) ₄	209	2	165	0,21	64,83%	145
cnl157	D40973	(cca) ₇	181	1	264	4,1e ⁻⁶	67,52%	157
				9	218	6,4e ⁻⁴	62,77%	218
				6	217	7,5e ⁻⁴	62,78%	180
				4	216	8,4e ⁻⁴	66,14%	127
				5	213	1,2e ⁻³	71,00%	100
				10	212	8,4e ⁻⁴	64,74%	173
				7	212	9,4e ⁻⁴	67,80%	118
				3	236	5,1e ⁻⁵	65,22%	184
cnl158	BE401962	(ggc) ₅	191	4	230	6,0e ⁻⁶	65,12%	172
				5	221	4,4e ⁻⁴	65,66%	166
				8	210	1,2e ⁻³	63,10%	168
				7	211	1,1e ⁻³	64,07%	167
Ksum3	BE516090	(t) ₂₁	282	3	165	1,5e ⁻¹	62,64%	165
				1	167	1,5e ⁻¹	75,34%	73

Ksum10	BE591917	(ag) ₆ n5(agg) ₅ n14(ag) ₆	163	5	234	1,3e ⁻⁴	72,73%	110
				2	215	9,2e ⁻⁴	67,32%	153
				8	211	9,4e ⁻⁴	73,63%	109
				6	195	6,9e ⁻³	63,01%	173
Ksum24	BE213330	(ag) ₁₄	178	2	211	1,5e ⁻³	66,42%	134
				7	204	2,8e ⁻⁴	63,16%	171
				5	198	5,7e ⁻³	62,75%	153
				6	191	1,1e ⁻²	64,14%	145
				9	184	1,7e ⁻²	62,86%	140
				4	187	1,7e ⁻²	62,58%	155
Ksum108	BE499852	(gtt) ₁₇	316	2	354	2,6e ⁻⁹	61,70%	329
				10	296	3,9e ⁻⁶	68,67%	166
				1	297	2,2e ⁻⁵	59,35%	369
Ksum140	BE488749	(ggc) ₇ (gaa) ₈	234	7	190	1,3e ⁻²	61,24%	209
				10	164	2,1e ⁻¹	60,67%	178
				9	176	5,1e ⁻²	61,45%	166
Ksum141	BE516331	(ctt) ₆	258	1	202	3,4e ⁻⁴	64,38%	145
				9	207	2,2e ⁻⁴	67,38%	141
				8	160	3,3e ⁻¹	64,18%	134
Ksum153	BE415738	(cca) ₅	261	4	1074	3,3e ⁻⁶¹	79,31%	348
Ksum186	BE400190	(agc) ₇	184	5	237	9,1e ⁻⁵	63,79%	174
				4	204	2,7e ⁻³	61,99%	171
				3	196	5,5e ⁻³	62,50%	176
				8	192	1,1e ⁻¹	61,90%	168
Ksum202	BE402420	(gga) ₆	243	2	191	1,2 e ⁻²	61,33%	181
				4	527	3,4e ⁻¹⁸	78,42%	190
				1	298	1,2e ⁻⁷	62,36%	263
				2	278	6,3e ⁻⁷	63,97%	247
				6	253	1,5e ⁻⁵	61,40%	272
				8	237	8,0e ⁻⁵	65,99%	147
				3	236	1,1e ⁻⁴	60,07%	283
Ksum205	BE420098	(cct) ₇	267	7	233	8,5e ⁻⁵	60,69%	262
				2	294	2,2e ⁻⁷	64,20%	294
				8	262	5,1e ⁻⁶	64,97%	197
				10	252	2,0e ⁻⁵	62,75%	204
				5	250	1,9e ⁻⁵	64,29%	224
				9	248	2,7e ⁻⁵	63,27%	196
Ksum206	BE425201	(agg) ₅	275	1	920	1,2e ⁻³⁶	84,10%	283
				8	641	4,1e ⁻²⁴	75,09%	265
				3	554	4,4e ⁻²⁰	72,13%	244
				7	705	6,0e ⁻²⁷	83,82%	204
Ksum219	BE414115	(ccg) ₇	265	5	669	9,2e ⁻²⁵	74,53%	267
				8	254	1,8e ⁻⁵	66,28%	172
				3	228	2,2e ⁻⁴	62,50%	240
				1	233	1,6e ⁻⁴	60,37%	217
Ksum230	BE413996	(ggc) ₆	254	5	361	1,5e ⁻¹⁰	65,09%	232
				3	290	1,5e ⁻⁷	62,69%	201
				2	340	2,1e ⁻⁹	62,60%	262
				1	379	1,1e ⁻¹¹	66,81%	238
				10	341	1,1e ⁻⁹	63,86%	249
				8	294	2,3e ⁻⁷	63,81%	257

¹localización en el cromosoma de maíz, ID: porcentaje de identidad, long.: longitud del alineamiento. ²De acuerdo a la información disponible en (<http://www.maizesequence.org>).

Un análisis similar al descrito anteriormente se realizó con las secuencias de los marcadores SSR genómicos de *P. notatum* sobre los genomas de arroz (Tabla IX) y maíz (Tabla X). Este análisis permitió localizar secuencias relacionadas a estos marcadores en dos especies modelo. Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en las Tablas X y XI. Como puede observarse, en la mayoría de los casos se obtuvieron valores de similitud mayores al 60 % (con un E-value < 0,01). En promedio las secuencias de los SSR mostraron 3,1 y 2,6 alineamientos informativos en los genomas de arroz y maíz, respectivamente. En particular dos secuencias (Ssr6 (PN03-H10) y Ssr9 (PN02-F6A)) mostraron siete y nueve alineamientos en arroz (Tabla IX) y maíz (Tabla X), respectivamente, confirmando la identificación de secuencias ortólogas repetidas en ambas especies.

En el caso de los marcadores COS se obtuvieron alineamientos informativos con los genes *serk*, *baby boom* y *pkd* (Tabla XI). Para el caso del marcador derivado del gen *serk* se obtuvieron valores de homología altos tanto en arroz como en maíz (62 al 89 %) en al menos tres y cuatro secuencias ortólogas respectivamente. De acuerdo a lo esperado estos alineamientos demostraron el carácter conservado de las secuencias amplificadas y la capacidad de detectar ortología entre especies. De acuerdo a estos análisis, se detectaron secuencias ortólogas a un fragmento conservado del gen *serk* de *P. notatum* en los cromosomas 2, 4, 5 de arroz y 1, 5, 6 y 8 de maíz (Tabla XI).

Los alineamientos realizados con la secuencia derivada del marcador COS *baby boom* (similar a una peroxidada de arroz) mostró tres alineamientos solo en el genoma de maíz. Los mismos presentaron un valor de homología que va desde el 64,16 al 76,43% y se localizaron en los cromosomas 3, 5 y 8 de maíz (Tabla XI). No fue posible detectar con estas secuencias alineamientos significativos en el genoma de arroz.

Por último, la secuencia derivada del marcador *Cospkd* (similar a una proteína quinasa con repeticiones de leucina) se alineó con secuencias de los cromosomas 2 y 12 de arroz y 3 de maíz con homologías mayores al 60 % (Tabla XI). Estos datos coinciden con la localización descrita para los genes *pkd* de *P. simplex* reportadas por Calderini et al. (2006).

Tabla IX: Localización de secuencias ortólogas de marcadores SSR genómicos de *P. notatum* en el genoma de arroz por medio del mapeo *in silico* en la base de datos: <http://www.gramene.org>

<i>Ssr</i> ¹	<i>locus</i> ² / Accesión GB	Motivo SSR	Tamaño	Arroz ³	score ⁴	E- value ⁴	ID ⁴	long ⁴
Ssr1	PN03-A5 / FJ572060	(ca) ₃ c(ca) ₅ (ac) ₂ (ca) ₄	249-287	1	191	5,3e ⁻²	59,77%	256
				4	216	4,0e ⁻³	58,72%	270
				5	194	2,0e ⁻¹	63,69%	157
Ssr2	PN03-A6 / FJ572061	(ga) ₃ (gt) ₈	160-188	4	176	2,5e ⁻¹	67,92%	106
Ssr3	PN03-E9 / FJ572062	(ac) ₇		3	164	8,8e ⁻¹	62,86%	175
				10	171	4,3e ⁻¹	62,18%	156
Ssr4	PN03-F2 / FJ572063	(ac) ₇	241-249	2	176	4,4e ⁻¹	63,58%	151
				5	179	1,9e ⁻¹	61,05%	172
				6	184	6,1e ⁻¹	61,27%	173
Ssr5	PN03-G8 / FJ572064	(ca) ₇	254-258	2	184	1,1e ⁻¹	60,10%	203
				10	201	2,9e ⁻¹	62,35%	162
				12	194	3,0e ⁻¹	64,62%	130
Ssr6	PN03-H10 / FJ572065	(ga) ₁₁	222-272	2	198	2,6e ⁻²	62,22%	180
				3	223	1,9e ⁻³	61,86%	215
				4	202	1,7e ⁻²	62,77%	188
				5	248	1,4e ⁻⁴	61,80%	178
				6	203	1,5e ⁻²	62,36%	178
				9	196	3,2e ⁻²	61,47%	218
				12	270	1,4e ⁻⁵	67,80%	177
Ssr7	PN02-A12 / FJ572066	(ga) ₃ at(gaa) ₃	185-205	9	283	3,7e ⁻⁶	63,13%	179
				10	296	9,7e ⁻⁷	65,17%	178
Ssr8	PN02-B5B / FJ572067	(tca) ₄	156-188	10	165	7,9e ⁻¹	62,70%	126
Ssr9	PN02-F6A / FJ572068	(ct) ₁₁	140-218	1	199	2,3e ⁻²	65,07%	146
				2	227	1,3e ⁻³	70,43%	115
				3	222	2,1e ⁻³	68,25%	126
				4	211	6,7e ⁻⁴	63,76%	149
				5	227	1,3e ⁻³	70,00%	130
				6	223	1,9e ⁻³	67,91%	134
				8	237	4,5e ⁻⁴	67,39%	138
				9	201	1,9e ⁻²	65,91%	132
				11	215	4,4e ⁻³	64,24%	151
Ssr10	PN02-G10 / FJ572069	(ca) ₈	189-219	1	170	4,7e ⁻¹	71,05%	76
				4	201	1	63,46%	156
Ssr11	PN02-H7 / FJ572070	(ac) ₈	194-204	2	185	1,0e ⁻¹	61,24%	178
				7	199	2,3e ⁻²	62,50%	200

¹Nomenclatura de acuerdo a la utilizada en el mapa de Q4188 y Q4117. ²de acuerdo a Cidade et al. (2009). ³Localización en el cromosoma de arroz. ID: porcentaje de identidad, long.: longitud del alineamiento. ⁴De acuerdo a la información disponible en (<http://www.gramene.org>).

Tabla X: Localización de secuencias ortólogas de marcadores SSR genómicos de *P. notatum* en el genoma de maíz por medio del mapeo *in silico* sobre la base de datos: <http://www.maizesequence.org>.

<i>Ssr</i> ¹	<i>locus</i> ² / Accesión GB	Motivo SSR	Tamaño	maíz ³	score ⁴	E-value ⁴	ID ⁴	long ⁴
Ssr1	PN03-A5 / FJ572060	(ca) ₃ c(ca) ₅ (ac) ₂ (ca) ₄	249-287	1	212	4,1e ⁻³	76,32%	76
				3	229	5,2e ⁻¹	63,24%	185
Ssr2	PN03-A6 / FJ572061	(ga) ₃ (gt) ₈	160-188	3	178	1,1	69,31%	101
Ssr3	PN03-E9 / FJ572062	(ac) ₇	168-186	1	156	9,2	65,12%	129
				2	167	3,4	61,69	154
Ssr4	PN03-F2 / FJ572063	(ac) ₇	184-198	2	180	9,1e ⁻¹	61,03%	213
Ssr5	PN03-G8 / FJ572064	(ca) ₇	254-258	6	199	1,3e ⁻¹	58,85	260
Ssr6	PN03-H10 / FJ572065	(ga) ₇	222-272	2	205	6,9e ⁻²	63,13%	179
				3	219	1,6e ⁻²	61,43%	210
				4	212	3,3e ⁻²	65,03%	163
				5	217	2,0e ⁻²	62,23%	188
				6	237	2,5e ⁻⁴	64,88%	168
				7	202	9,4e ⁻²	60,94%	233
				8	204	7,6e ⁻²	62,37%	186
Ssr7	PN02-A12 / FJ572066	(ga) ₃ at(gaa) ₃	185-205	2	190	3,3e ⁻¹	62,03%	158
Ssr8	PN02-B5B / FJ572067	(tca) ₄	156-188	1	195	1,9e ⁻¹	61,31%	168
Ssr9	PN02-F6A / FJ572068	(ct) ₁₁	140-218	1	229	5,7e ⁻³	65,22%	161
				2	208	5,0e ⁻²	67,21%	122
				3	235	3,0e ⁻³	71,20%	125
				4	210	4,1e ⁻²	66,67%	141
				5	219	1,6e ⁻²	68,79%	141
				7	219	1,6e ⁻²	67,31%	156
				8	220	1,4e ⁻²	68,49%	146
				9	244	1,2e ⁻³	69,68%	155
				10	217	2,0e ⁻²	69,75%	119
				Ssr10	PN02-G10 / FJ572069	(ca) ₈	189-219	3
Ssr11	PN02-H7 / FJ572070	(ac) ₈		2	169	2,8	62,87%	167
				6	136	3,4	62,50%	136

¹Nomenclatura de acuerdo a la utilizada en el mapa de Q4188 y Q4117. ²de acuerdo a Cidade et al. (2009). ³Localización en el cromosoma de maíz. ID: porcentaje de identidad, long.: longitud del alineamiento. ⁴De acuerdo a la información disponible en (<http://www.maizesequence.org>).

Tabla XI: Localización de secuencias ortólogas a marcadores COS en el genoma de arroz y maíz por medio del mapeo *in silico* sobre las bases <http://www.gramene.org> y <http://www.maizesequence.org>, respectivamente.

Marcador	Arroz ¹	score ²	E-value ²	ID % ²	L. ²	Maíz ³	score ⁴	E-value ⁴	ID % ⁴	L. ⁴
Cossark	2	713	1,4e ⁻²⁵	85,64	195	1	758	7,2e ⁻²⁷	88,21	195
	4	365	7,4e ⁻¹⁰	68,28	286	5	776	1,1e ⁻²⁷	89,23	195
	5	253	8,5e ⁻⁰⁵	62,43	181	6	758	7,2e ⁻²⁷	88,21	195
	8	412	5,6e ⁻¹²	10,35	199	8	722	3,1e ⁻²⁵	86,15	195
Cosbboom	nd	-	-	-	-	8	765	2,1e ⁻²⁶	76,43	297
						3	552	6,2e ⁻¹⁵	67,24	348
						5	461	1,4e ⁻⁰⁹	64,16	385
Cospkd	2	164	8,8e ⁻¹	60,00	220	3	106	7,4e ⁻¹	61,45	179
	12	118	8,4e ⁻²	60,34	116	nd	-	-	-	-
Cosastar	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-

¹Localización en el cromosoma de arroz, ID: porcentaje de identidad, L: longitud del alineamiento. ²De acuerdo a la información disponible en (<http://www.gramene.org>). ³Localización en el cromosoma de arroz, ID: porcentaje de identidad, L: longitud del alineamiento. ⁴De acuerdo a la información disponible en (<http://www.maizesequence.org>)

IV.5.3- Comparación de la localización de los marcadores EST-SSR, SSR genómico y COS n *P. notatum*, arroz y maíz.

Con el objetivo de determinar posibles relaciones *sinténicas* entre los grupos de ligamiento de *P. notatum* y los cromosomas de arroz y maíz, se comparó la localización de los marcadores empleados en este trabajo en los distintos grupos de ligamiento de las tres especies de acuerdo a los resultados descritos en el punto anterior (Tabla XII). La localización de los marcadores de EST-SSR sobre el genoma de arroz fue tomada de Yu et al. (2004b). La posición en el genoma de maíz se determinó mediante los experimentos de mapeo *in silico* descritos más arriba (IV.5.2 y Tabla XII).

Tabla XII: Localización de los marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS en arroz, maíz y *P. notatum*.

Marcador	EST	Arroz ²	Maíz ³	<i>Paspalum notatum</i> ¹
Cnl64	BE423103	2	2-4-5	P1a
Cnl81	AU032107	12	1-3	M6a-M9a-M21-M24-P4a,b-P6a-P27 ²
Cnl119	AF03953	4	2-5-6	P9b-P20a
Cnl126	AU069138	4	1-3-6-7	M14-P2c-P14a
Cnl132	BE606854	9	1-2-3	M2 ² -M3b-M26-P2a _(b)
Cnl141	BE060826	5	2-4-6-8-10	Mb1 ² -M2-M6a-M11a-P1a-P18a
Cnl142	BE414104	3-4-11	1-2-3-4-5-10	P1a-P9a,b-P16a ² -P23a
Cnl143	BE517078	7	2-3-7-10	P8a-P23a
Cnl144	AU070020	8	4-5-10	nd
Cnl145	BE482249	9-11	2	P6b ² -P9c
Cnl157	D40973	7	1-4-5-6-7-9-10	M13
Cnl158	BE401962	2-7-8	3-4-5-7-8	P17b
Ksum3	BE516090	1-4-12	3	M2-P10b
Ksum10	BE591917	2-4-5-10	2-5-6-7-8	M10-P6b ² -P30
Ksum24	BE213330	2-4-6-7	2-4-5-6-7-9-10	M5a-P1b-P22a-P23a _(b) -P30 _(b)
Ksum27	U91981	3	1-2-7-9-10	nd
Ksum28	BE40560	4-7-10	1-2-3-5-8	nd
Ksum67	BE414553	2-4	1-4-5-9	nd
Ksum108	BE499852	4-8-11-12	1-2-10	M1b-M5a-P9a-P17b
Ksum140	BE488749	1-2-7-11	7-9-10	P3b
Ksum141	BE516331	5-7-10-11	1-8-9	M9a ² -M11a
Ksum153	BE415738	8-11	4	M24 _(b) -P6a
Ksum186	BE400190	6-7	2-3-4-5-8	P6b
Ksum202	BE402420	1-2-7	1-2-3-4-6-7-8	M3c-M11a-P3c-P8a-P14a
Ksum205	BE420098	3-6-8	2-5-8-9-10	M3a-M5a-M6a-M11a-P8a-P18b-P29
Ksum206	BE425201	1-7-12	1-3-7-8	P17a
Ksum219	BE414115	6-9-12	1-3-5-8	P17a
Ksum230	BE413996	3-4-11-12	1-2-3-5-10	P10b
<i>locus SSR</i>	Accesión	Arroz ²	Maíz ³	<i>Paspalum notatum</i> ¹
Ssr1-PN03-A5	FJ572060	1-4-5	1-3	P18a
Ssr2-PN03-A6	FJ572061	4	3	M26-P2a-P4a-P25
Ssr3-PN03-E9	FJ572062	3-10	1-2	P10a
Ssr4-PN03-F2	FJ572063	2-5-6	2	M5c-P17a-P19a
Ssr5-PN03-G8	FJ572064	2-10-12	6	P28
Ssr6-PN03-H10	FJ572065	2-3-4-5-6-9-12	2-3-4-5-6-7-8	M18 ² -P20 ² -P3b ²
Ssr7-PN02-A12	FJ572066	9-10	2	M5a ²
Ssr8-PN02-B5B	FJ572067	10	1	M5a ³ -M23a
Ssr9-PN02-F6A	FJ572068	1-2-3-4-5-6-8-9-11	1-2-3-4-5-7-8-9-10	P21a
Ssr10-PN02-G10	FJ572069	1-4	3	M5c-P5a-P11a _(b)
Ssr11-PN02-H7	FJ572070	2-7	2-6	P6b-P17b
COS		Arroz ²	Maíz ³	<i>Paspalum notatum</i> ¹
Pnsrk	-	2-4-5-8	1-4-5-6-8	nd
Cosbboom	-	nd	3-5-8	M2-M20
Cospkd	-	2-12	3	M3a
Cosapostar	-	nd	nd	P2a

¹ La denominación de los grupos de ligamiento corresponden al mapa genético de la especie desarrollado por Stein et al. (2007). P: grupo de ligamiento paterno. M: grupo de ligamiento materno. nd: no determinada. ²De acuerdo a la información en GRAMENE (www.gramene.org). ³De acuerdo a los datos de mapeo *in silico* de las secuencias SSR sobre la base maizesequence (www.maizesequence.org). Los superíndices indican el número de veces que se presentó un determinado marcador y el subíndice b: indica los marcadores biparentales.

IV.5.3.1- Detección de regiones *sinténicas* entre *P. notatum*, arroz y maíz

En base a la localización de los marcadores SSR y COS descrita anteriormente se realizó un estudio comparativo tendiente a determinar correspondencias en la presencia y orden de los marcadores (*sintenia*) entre *P. notatum*, arroz y maíz. Las distancias en cM entre los marcadores en las dos primeras especies fueron tomadas de los análisis de ligamiento realizados en este trabajo y de Yu et al. (2004a), respectivamente. En el caso de maíz las mismas fueron estimadas a partir de la localización física de cada una de las secuencias sobre el genoma de la especie (dada por la base de datos maizesequence, no mostrada) y transformada en valores de cM de acuerdo a Ahn y Tanksley (1993). Estos autores consideran que 1 cM del genoma de maíz equivale en promedio a aproximadamente a 1,33 Mpb. Si bien esta estimación puede ser muy general (debido a que la relación cM/Mpb de cada especie depende de varios factores como por ejemplo la región del genoma considerada y el tipo de marcadores utilizados), en este caso puede utilizarse como una aproximación para describir las posiciones relativas de los marcadores empleados en este trabajo sobre el genoma de maíz.

En este estudio resultaron interesantes algunos grupos de marcadores cuyas posiciones relativas se mantuvieron constantes en las tres especies. Las relaciones *sinténicas* detectadas en este análisis se describen a continuación:

IV.5.3.1.1- Estudios de mapeo comparativo en el mapa del genotipo Q4188

En el grupo de ligamiento M5a se localizaron los marcadores Ksum24 y Ksum205 (cuyos fragmentos segregantes mapeados en este grupo fueron nombrados como *Ksum24ma* y *Ksum205mi*). Ambos marcadores se ubican en el cromosoma 6 de arroz y en los cromosomas 2, 5, 9 y 10 de maíz (de acuerdo a los experimentos de mapeo *in silico* descritos más arriba). Esta primera observación determinó que un fragmento de aproximadamente 45 cM de Q4188, 26 cM en arroz y 23 cM en maíz aparece conservado en las tres especies analizadas (Figura 14 A). Por otro lado, este grupo de ligamiento (M5a) presentó marcadores generados por Ksum205 (*Ksum205pi*) y Ksum108 (*Ksum108pd*) que se encuentran juntos en el cromosoma 8 de arroz y 10 de maíz (no mostrado). Se localizaron también dos marcadores SSR genómicos Ssr7 y Ssr8

que coincidieron en el cromosoma 10 de arroz cuando fueron analizados por mapeo *in silico* (no mostrado).

En el grupo de ligamiento M11a (homólogo materno al grupo de ligamiento que contiene al *locus* responsable de la aposporia) (Stein et al., 2007) resultaron asignados tres marcadores EST-SSR: Ksum141, Ksum202 y Cnl141. Los marcadores Ksum141 y Cnl141 se localizaron en el cromosoma 5 de arroz a una distancia aproximada de 60 cM, que resultó similar a la detectada en *P. notatum*. Asimismo, ambos mapearon en el cromosoma 8 de maíz a una distancia de 19 cM (Tabla XII, Figura 14 B). Por otro lado otra coincidencia se observó entre los marcadores Ksum141 y Ksum202. Los mismos se localizan en el cromosoma 7 de arroz (no mostrado) y en el cromosoma 8 de maíz (Figura 14 B).

Un caso especial se observó en los grupos de ligamiento homólogos M3a y M3c. En cada uno de ellos se localiza un solo marcador COS (*Cospkdmb* en M3a) y un marcador EST-SSR (*Ksum202mb* en M3c) (Tabla XII). El mapeo *in silico* de estos marcadores mostró que ambos contienen secuencias homólogas en los cromosomas 2 de arroz y 3 de maíz (no mostrado).

En varios casos, marcadores asignados a un mismo grupo de ligamiento de *Paspalum* mantienen su coincidencia en maíz. Entre estos es posible mencionar a los marcadores asignados a los grupos de ligamiento M1b, M2, M6a, M9a M26 (Tabla XII). En el grupo M1b los marcadores *Cnl141me,d* y *Ksum108md* coinciden los cromosomas 2 y 10 de maíz. Para el grupo de ligamiento M2 se encuentra una coincidencia de los marcadores *Cnl132mc*, *Ksum3md* y *Cosbbma* (3 de maíz). Este último además mapea junto al marcador *Cnl141mm* en el cromosoma 8 de maíz. Además, el marcador *Cnl141mm* y *Cnl132mc* coinciden en el cromosoma 2 de maíz. En el caso del grupo M6a, los marcadores *Cnl141mj* y *Ksum205me* coinciden en los cromosomas 2, 8 y 10 de maíz. Otra coincidencia se da en el grupo M9, dado que los marcadores *Ksum141me,b* y *Cnl81mi* se encuentran en el cromosoma 1 de maíz. Por último en el grupo M26 sus dos marcadores *Cnl132mf* y *Ssr2mc*, que generan un grupo de ligamiento nuevo, mapean juntos en el cromosoma 3 de maíz (Tabla XII).

IV.5.3.1.2- Estudios de mapeo comparativo en el mapa del genotipo Q4117

En el caso del mapa del genotipo Q4117 se destacan las relaciones *sinténicas* en los grupos de ligamiento P3b, P6b, P8a, P9b, P18a, P22a, M23a, P30 y P17a (este último analizado en el apartado IV.5.3.1.3). Brevemente, el grupo P1a, contiene tres marcadores, dos de ellos (Ksum141 y Cnl142) definen fragmentos de aproximadamente 10 cM en *P. notatum*, 22 cM en el cromosoma 11 de arroz y 18 cM en el cromosoma 1 de maíz (Figura 14 C).

El grupo P3b presenta dos marcadores derivados de los EST-SSR, Ksum140 (*Ksum140pa*) y Ksum202 (*Ksum202ped*) que coinciden en los cromosomas 1, 2 y 7 de arroz y mapean junto a los marcadores genómicos *SSR6pa* y *SSR6pc* en el cromosoma 7 de maíz (y también en el 2 de arroz) (Tabla XII). Los marcadores EST-SSR cubren aproximadamente 26 cM en *P. notatum* y definen segmentos de 10 y 75 cM en arroz (Anexo: Figura I).

El grupo de ligamiento P6b, contiene seis marcadores SSR que definen un fragmento de aproximadamente 58 cM. Los mismos son generados por Cnl145 (*Cnl145pa,b*), Ksum10 (*Ksum10pb,ñ*), Ksum186 (*Ksum186pb*) y SSR11 (*Ssr11pa*). Los seis marcadores coinciden en el cromosoma 2 de maíz y además dos de ellos (Ksum10 y *Ssr11a*) se localizan en los cromosomas 2 de arroz y 6 de maíz (Tabla XII).

En el grupo P8a se localizaron los marcadores Cnl143 (*Cnl143pbn*), Ksum202 (*Ksum202pd*) y Ksum205 (*Ksum205pd*) sobre un segmento de aproximadamente 60 cM. Los tres marcadores se localizan en el cromosoma 2 de maíz y particularmente Cnl143 y Ksum202 mapean juntos en el cromosoma 7 de arroz (Figura 14 D). La distancia a la que se encuentran en arroz y maíz (13 cM) fue similar a la detectada en *P. notatum* (8 cM) (Figura 14 D).

En el caso de los grupos P9a y P9b se encuentran marcadores generados por Ksum108 (*Ksum108pdd*), Cnl142 (*Cnl142prd*), Cnl119pb (*Cnl119pb*) y Cnl142 (*Cnl142pa*). Los EST-SSR correspondientes al grupo P9a (*Ksum108pdd* y *Cnl142prd*) definen un bloque cromosómico de aproximadamente 30 cM que se repite en los cromosomas 4 de arroz y 1 y 10 de maíz (Figura 14 E). Asimismo, los marcadores localizados en el grupo P9b coinciden en el cromosoma 4 de arroz y en los cromosomas 2 y 5 de maíz (Tabla XII).

En el grupo P18a fueron detectados dos marcadores, *Cnl141pb* y *Ssr1pa*. Ambos fueron localizados en los cromosomas 1 de arroz y 5 maíz.

En el grupo P22a, dos marcadores de la serie Ksum (*Ksum24pf* y *Ksum219pd*) cubren un segmento de aproximadamente 70 cM, que se repite en los cromosomas 6 de arroz (55 cM) y 5 de maíz (70 cM) (Figura 14 F).

También encontramos coincidencias entre tres marcadores que mapean en el grupo P23a. Los marcadores *Cnl142pf* y *BKsum24pi* se localizan juntos en el cromosoma 4 de arroz y los cromosomas 2 y 10 de maíz (Figura 14 G). Estos marcadores definen segmentos de 11 y 16 cM en arroz y *P. notatum*, respectivamente. Asimismo, comprenden segmentos de 8 y 3 cM en los cromosomas 2 y 10 de maíz, respectivamente (Figura 14 G). El tercer marcador (*Cnl143pddn*) coincide con *BKsum24pi* en los cromosomas 7 de maíz (Figura 14 G) y 7 de arroz (no mostrado) y con ambos marcadores en el 10 de maíz (no mostrado).

En el grupo de ligamiento P30 se encuentran marcadores *Ksum10pf* y *BKsum24ph*. Los mismos pertenecen a los cromosomas 2 y 4 de arroz y coinciden en los cromosomas 2, 5 y 6 de maíz. Estos marcadores definen segmentos de aproximadamente 10 cM en *P. notatum* y arroz (Figura 14 H).

Por otro lado, algunos grupos contienen marcadores que se mantienen asociados solo en maíz, como por ejemplo los presentes en los grupos P2a, P4b, P6b y P14a (Tabla XII). También resultaron coincidencias importantes entre grupos homólogos. Como ejemplo pueden citarse los grupos de la región ASGR que serán considerados en el apartado IV.5.3.1.3. Otro ejemplo puede observarse en los grupos de ligamiento P2a y P2b. En estos, dos marcadores (uno de cada grupo) coinciden en el cromosoma 4 de arroz y 3 de maíz, como en el caso de los grupos P4a y P4b donde se localizaron dos marcadores generados por el mismo EST-SSR (*Cnl81*).

Figura 14: Representación esquemática de las relaciones *shinténicas* identificadas entre *P. notatum*, arroz y maíz

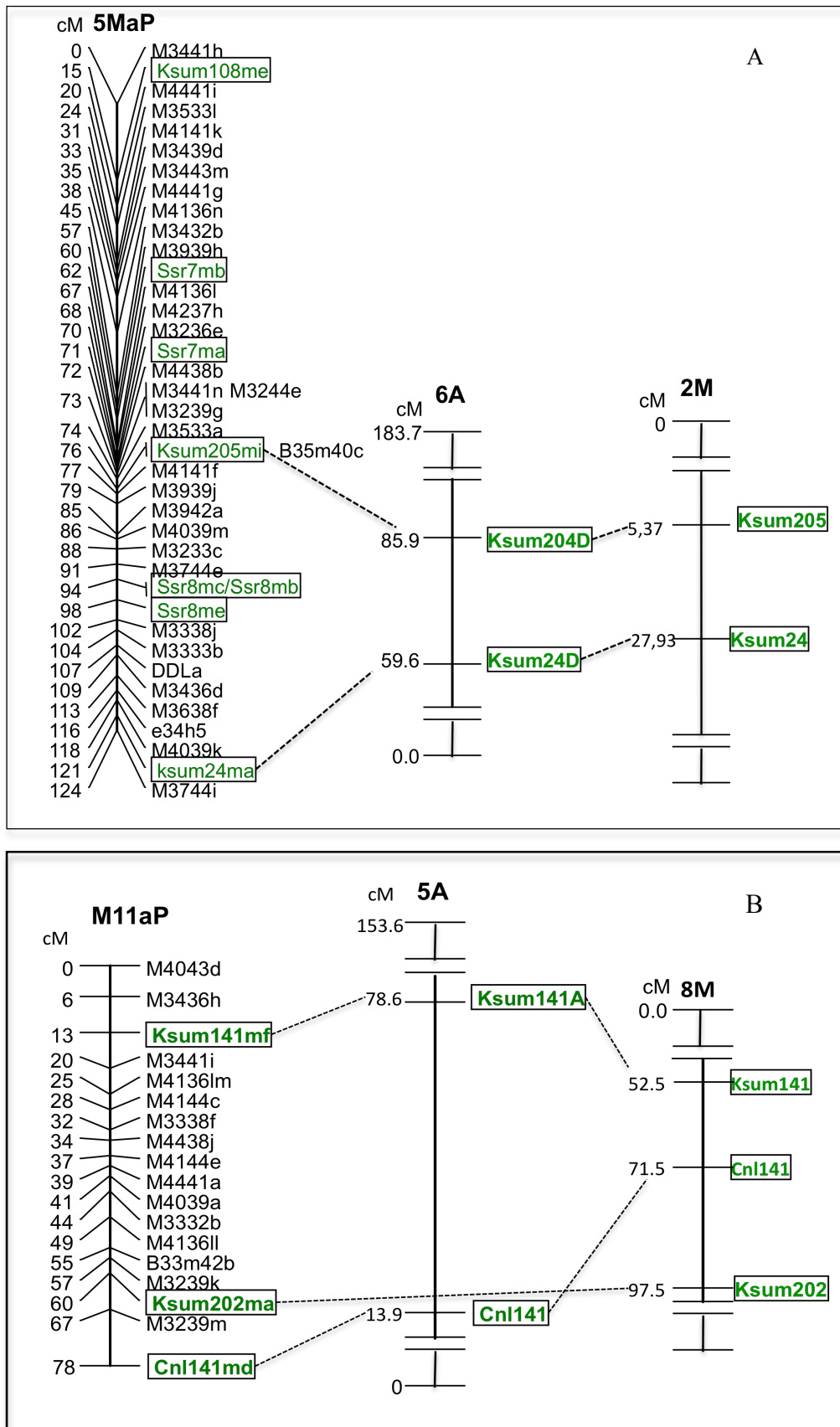


Figura 14 (continúa)

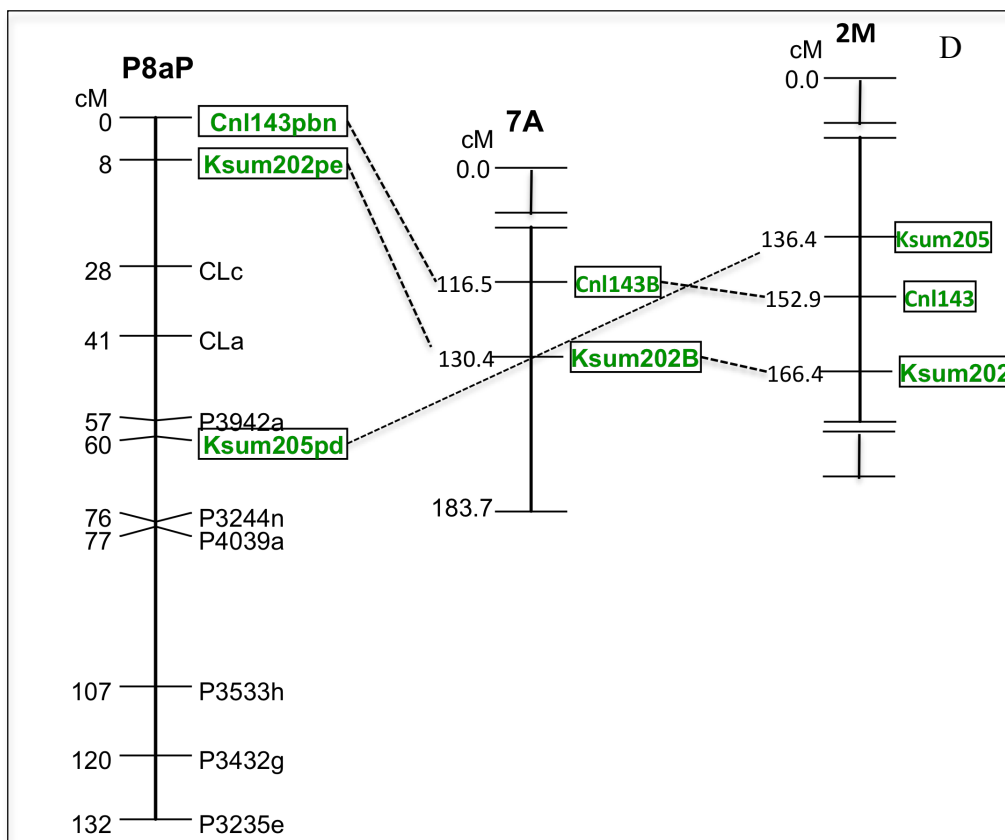
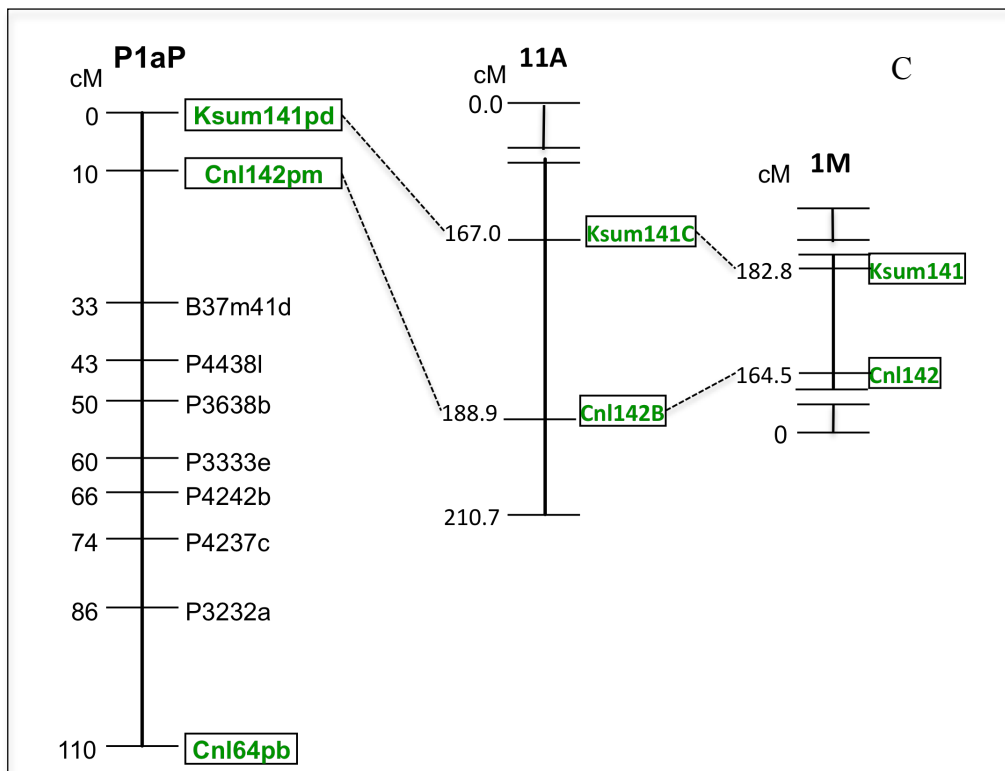


Figura 14 (continúa)

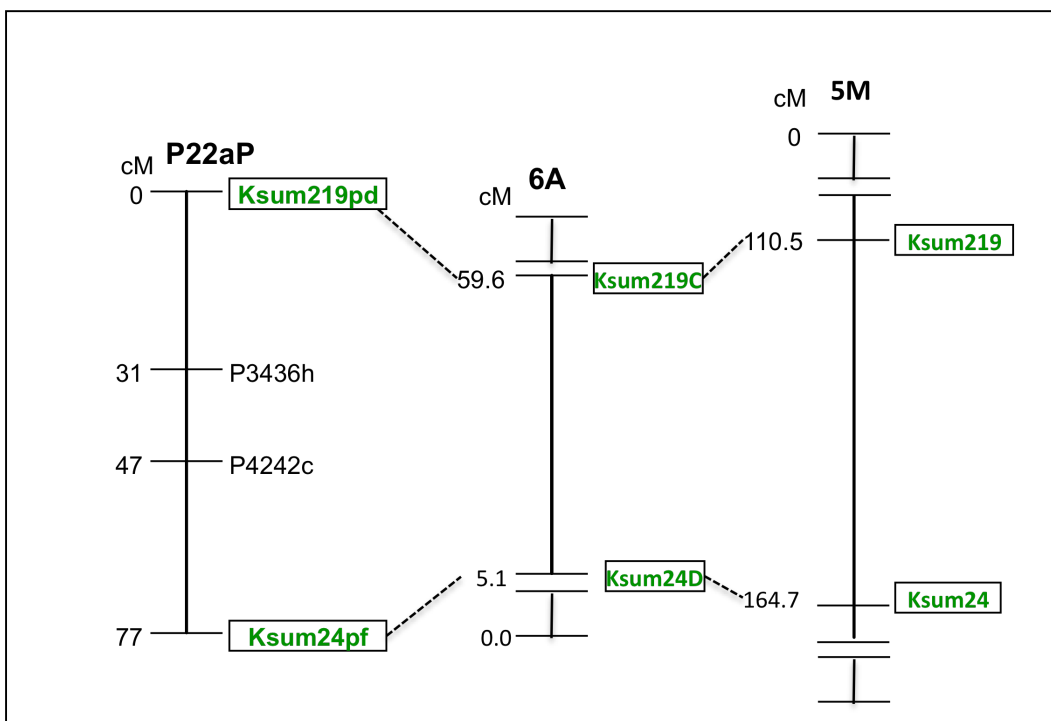
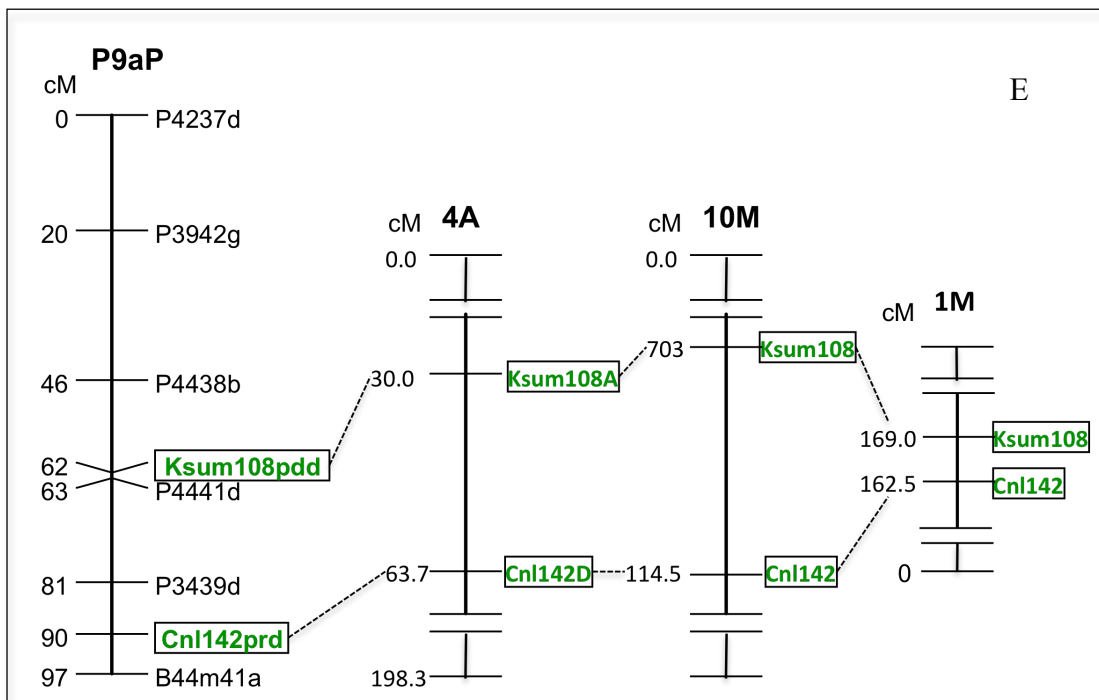


Figura 14 (continua)

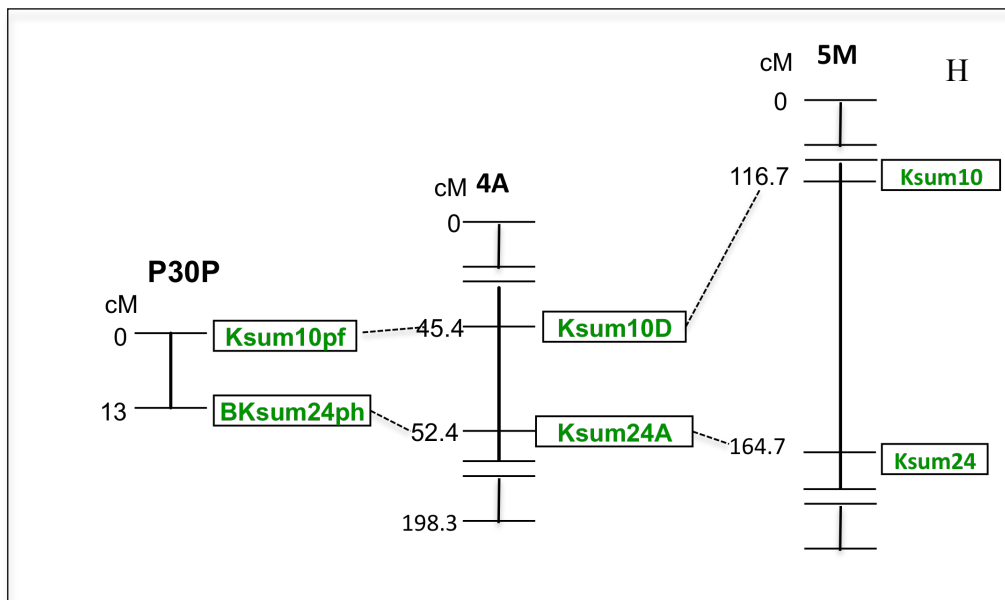
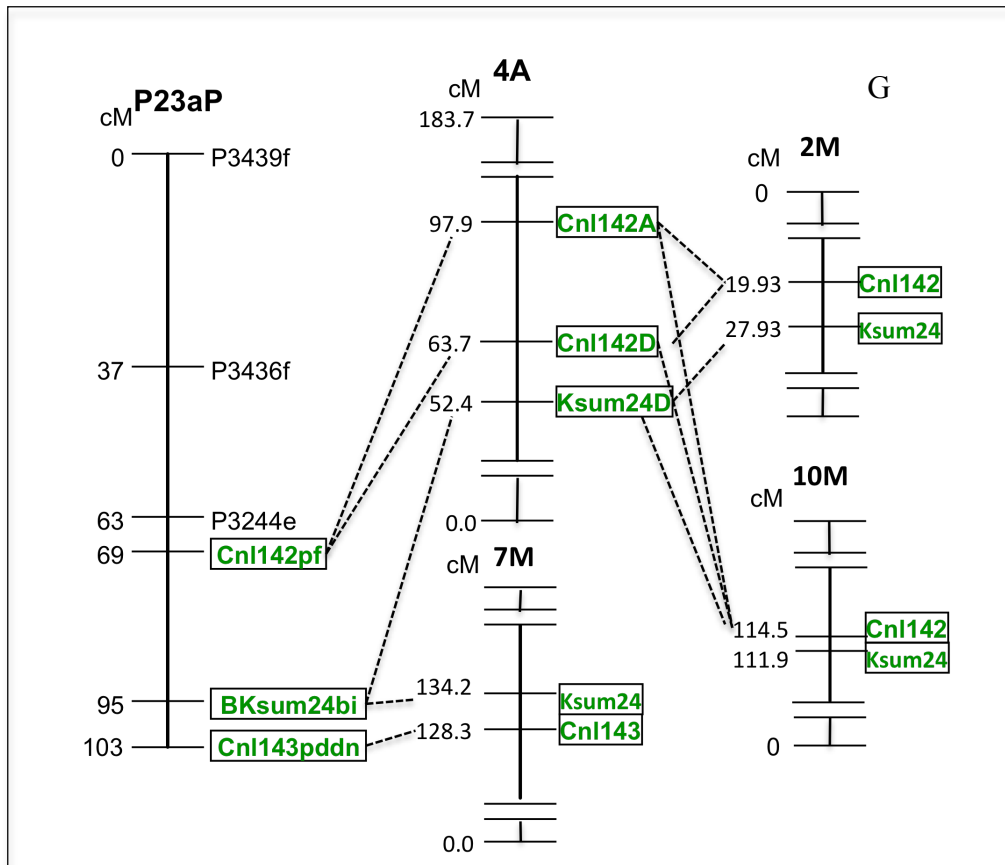


Figura 14

MxxP o PxxP indican los grupos de ligamiento de Q4188 o Q4117 respectivamente. xA o xM indican el número de cromosoma de arroz y maíz, respectivamente. Las distancias en cM fueron estimadas de acuerdo a lo descrito en el punto IV.5.3.

IV.5.3.1.3- Estudios de mapeo comparativo de la región genómica responsable de la aposporía

Dada la importancia que representa la caracterización molecular del *locus* que controla la apomixis en *P. notatum*, se realizó un estudio particular de esta región genómica. Se ha informado que el carácter aposporía en la especie está controlado por un *locus* simple dominante con distorsión en la segregación (Martínez et al., 2003). Trabajos previos determinaron que este *locus* mapea en una región genómica denominada ASGR (*Apospory Specific Genomic Region*) que presenta restricción de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004). La ASGR de *P. notatum* fue mapeada en el grupo de ligamiento paterno P17a (Stein et al., 2007). Este segmento cromosómico presenta 20 *loci* completamente ligados a la aposporía (dentro de los cuales se encuentra el marcador de RFLP C1069) y otros siete marcadores de AFLP localizados a ambos lados del mismo (Stein et al., 2007; Rebozzio et al., 2010). Otra característica importante es que este segmento muestra *sinténia* con segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz (Pupilli et al., 2004) y 5 de maíz (Podio et al., 2012). Se han determinado asimismo los presuntos cromosomas homólogos del progenitor apomítico (P10a, P10b y P17b) y uno de los cromosomas homólogos del progenitor femenino sexual (M11) (Stein et al., 2007).

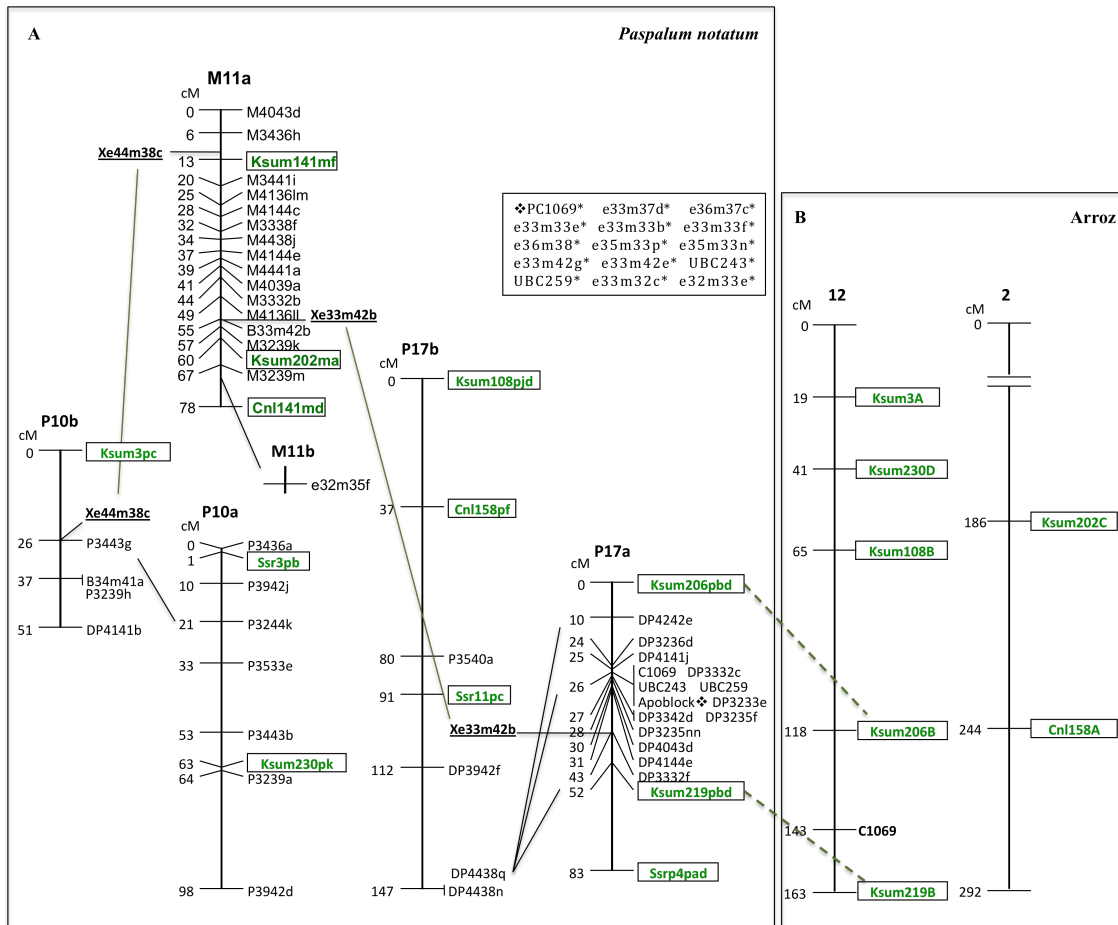
Como resultado de este trabajo de tesis doctoral fueron identificados 12 nuevos marcadores SSR asociados a los distintos grupos de ligamiento relacionados a la ASGR de la especie. De estos, nueve corresponden a marcadores de tipo EST-SSR y tres corresponden a marcadores SSRs genómicos. Como se puede ver en la Figura 15, los marcadores de EST-SSR generados por los cebadores Ksum206, Ksum219 y el marcador Ssr4 mapean en fase de acoplamiento a ambos lados de la ASGR (Figura 15 A). Dos marcadores derivados de Ksum206 y Ksum219 se encuentran localizados sobre el cromosoma 12 de arroz dentro de una región previamente asociada con la aposporía (Pupilli et al., 2004). La Figura 15 muestra la relación existente entre el grupo de ligamiento P17a de *P. notatum* y el segmento distal del cromosoma 12 de arroz *sinténico* al fragmento que contiene al *locus* de la aposporía (Figura 15 A y B). En el mismo se encuentra el marcador de RFLP C1069 de arroz asociado previamente al carácter (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007). Como se puede observar en la Figura 15, los dos marcadores generados por los EST-SSR (Ksum206 y Ksum219) que se

hallan a ambos lados del marcador C1069 en arroz, se presentan en el mismo orden y una distancia similar en ambas especies (arroz y *Paspalum*). Además, se determinó por medio de un análisis *in silico* que el marcador *Ssr4pad* mapea en el cromosoma 2 de arroz (ver más adelante).

Por otro lado, varios marcadores generados por EST-SSR pertenecientes a los cromosomas 12 y 2 de arroz, se localizaron en los grupos homólogos a P17a (Figura 15 A y B). El análisis *in silico* de estos marcadores determinó que los mismos, con excepción del marcador Ksum108, se localizan en los cromosomas 3, 5 y 8 de maíz. Se determinó también que el marcador microsatélite Ssr11 localizado en el grupo de ligamiento *P17b* mapea en el cromosoma 2 de arroz. Además los tres marcadores Ssr (Ssr3, Ssr4 y Ssr11) y el marcador Ksum108 localizados en esta región coinciden en el cromosoma 2 de maíz (no mostrado).

Estos resultados indican que un segmento de alrededor de 52 cM del grupo de ligamiento P17a de *P. notatum* que contiene al locus responsable de la aposporia resultó *sinténico* a un fragmento de aproximadamente 46 cM del cromosoma 12 de arroz (Figura 15). Los marcadores identificados en esta tesis, definen por lo tanto un segmento cromosomal que podría incluir los genes disparadores del carácter.

Figura 15: A) Grupos de ligamiento relacionados a la aposporía en *P. notatum* tetraploide. B) Cromosomas de arroz que llevan marcadores ligados a la aposporía en *P. notatum*.



Los cuadros indican los marcadores EST-SSR. A) M11a: Grupo de ligamiento de Q4188 homólogo al grupo de ligamiento que lleva la aposporía (P17a) de acuerdo a Stein et al. (2007). P10a, P10b, P17a y P17b: grupos de ligamiento de Q4117 asociados a la ASGR de acuerdo a Stein et al., 2007. B) Segmentos de los cromosomas 12 y 2 de arroz. Las líneas de puntos señalan dos marcadores de arroz que se encuentran en el grupo P17a en *P. notatum*.

IV.6- Análisis de transferencia de marcadores EST-SSR y SSR genómicos a distintas especies de *Paspalum* y evaluación de su capacidad para la realización de estudios de filogenia

IV.6.1- Transferencia de EST-SSR en distintas especies de *Paspalum*

El siguiente análisis se diseñó con el objetivo de explorar la transferibilidad de los marcadores EST-SSR de trigo y SSR genómicos, descritos anteriormente, a otras especies del género *Paspalum* para su posterior utilización en el mejoramiento y/o estudios de filogenia. De esta manera la información derivada de los trabajos realizados en *P. notatum* podría ampliarse a otras especies relacionadas. En este contexto se utilizaron 33 introducciones pertenecientes a seis grupos taxonómicos del género (ver Tabla I en Materiales y Métodos). Las mismas incluyeron 11 especies diferentes con accesiones que presentaban variaciones de ploidía (en un rango de 2x-6x) y modo de reproducción (sexuales y apomícticas). En la Figura 16 se muestra la distribución geográfica de las accesiones correspondientes a las 11 especies utilizadas en este estudio. Como control externo en cada uno de los experimentos de amplificación se incluyó trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.) cv. Federal. Las reacciones de PCR se realizaron sobre ADN genómico utilizando ocho juegos de oligonucleótidos de EST-SSR de trigo previamente analizados en los genotipos parentales de la población de mapeo (Q4188 y Q4117) y que fueron localizados en el mapa genético de *P. notatum* (ver Tabla XII). Los marcadores seleccionados para el análisis presentaron un patrón de bandas reproducible en por lo menos dos experimentos de amplificación independientes. Todos los marcadores ensayados (Cnl64, Cnl81, Cnl119, Cnl124, Cnl141, Cnl142, Cnl143 y Cnl145) generaron patrones de amplificación similares a los observados en las Figuras 17 (A y B). En total fueron obtenidos 166 fragmentos de los cuales 138 resultaron informativos (mostraron polimorfismos entre las muestras), con un promedio de 17,25 bandas por amplificación y un promedio de 6,16 fragmentos polimórficos por grupo. En este punto cabe destacar que si se consideran siete de los ocho pares de marcadores, se generaron 77 fragmentos informativos con un promedio de 11 bandas informativas por cebador y 3,63 fragmentos polimórficos por grupo. Por su parte, el marcador Cnl142 generó por si solo un total de 62 fragmentos con 61

fragmentos informativos que generaron en promedio 23,66 bandas polimórficas por grupo.

Figura 16: Distribución geográfica de las introducciones correspondientes a los distintos grupos taxonómicos utilizados en este trabajo.

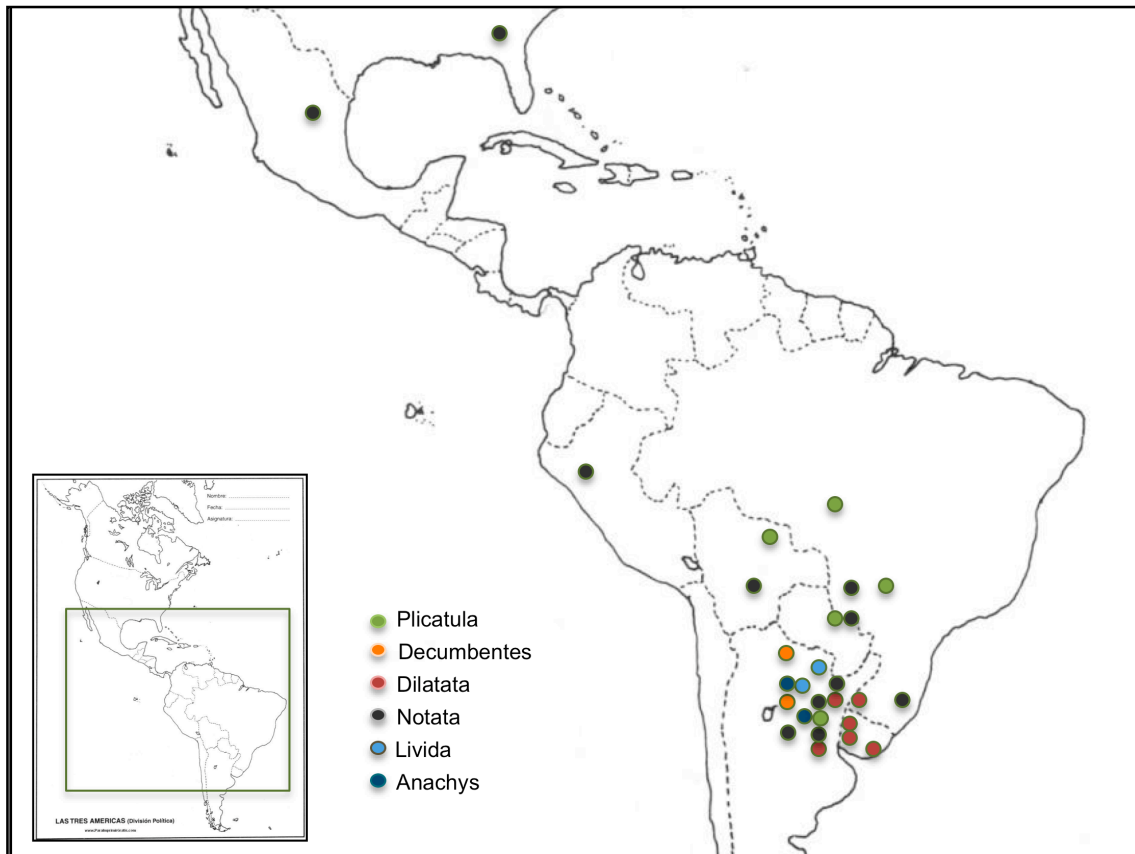
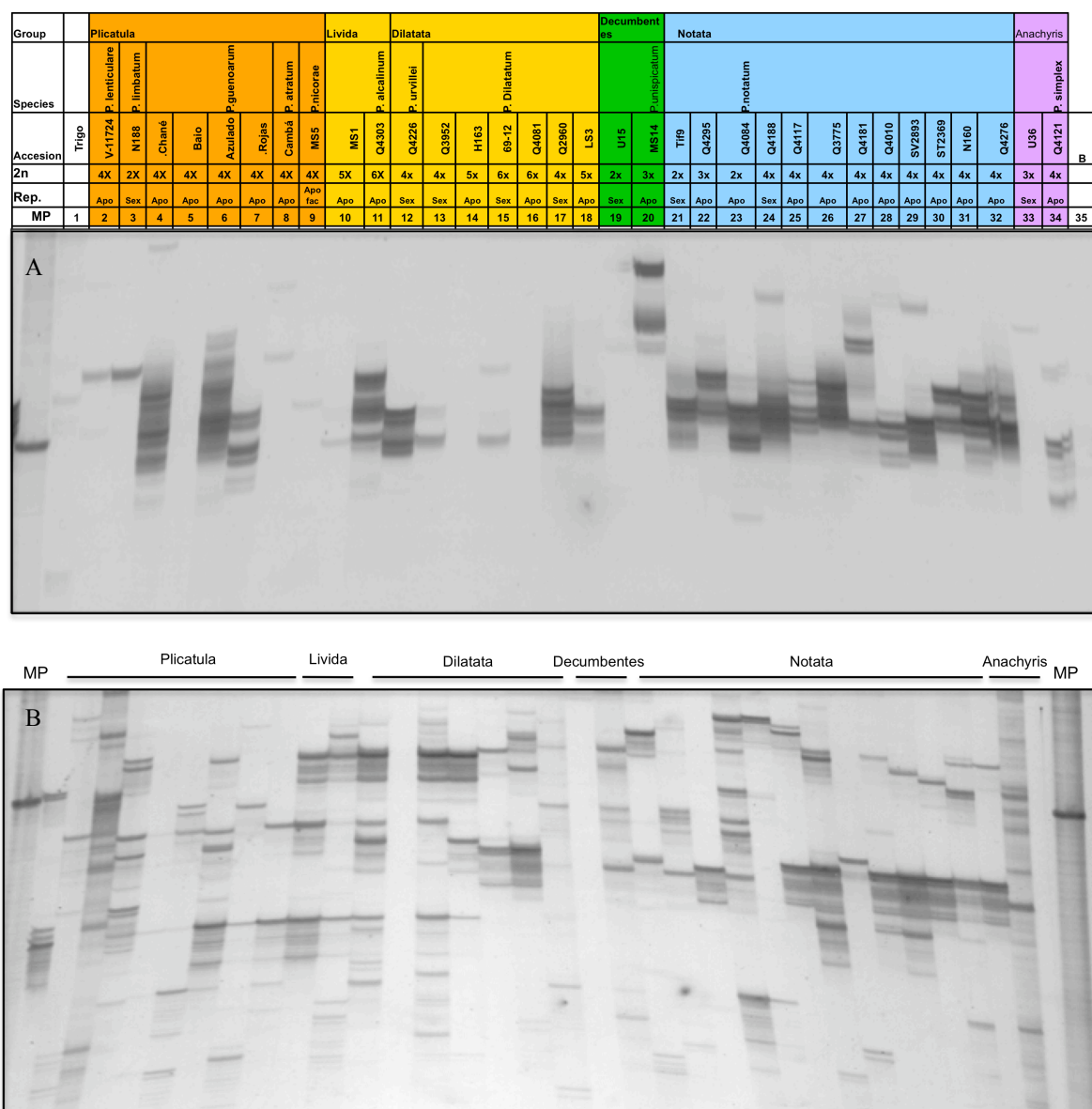


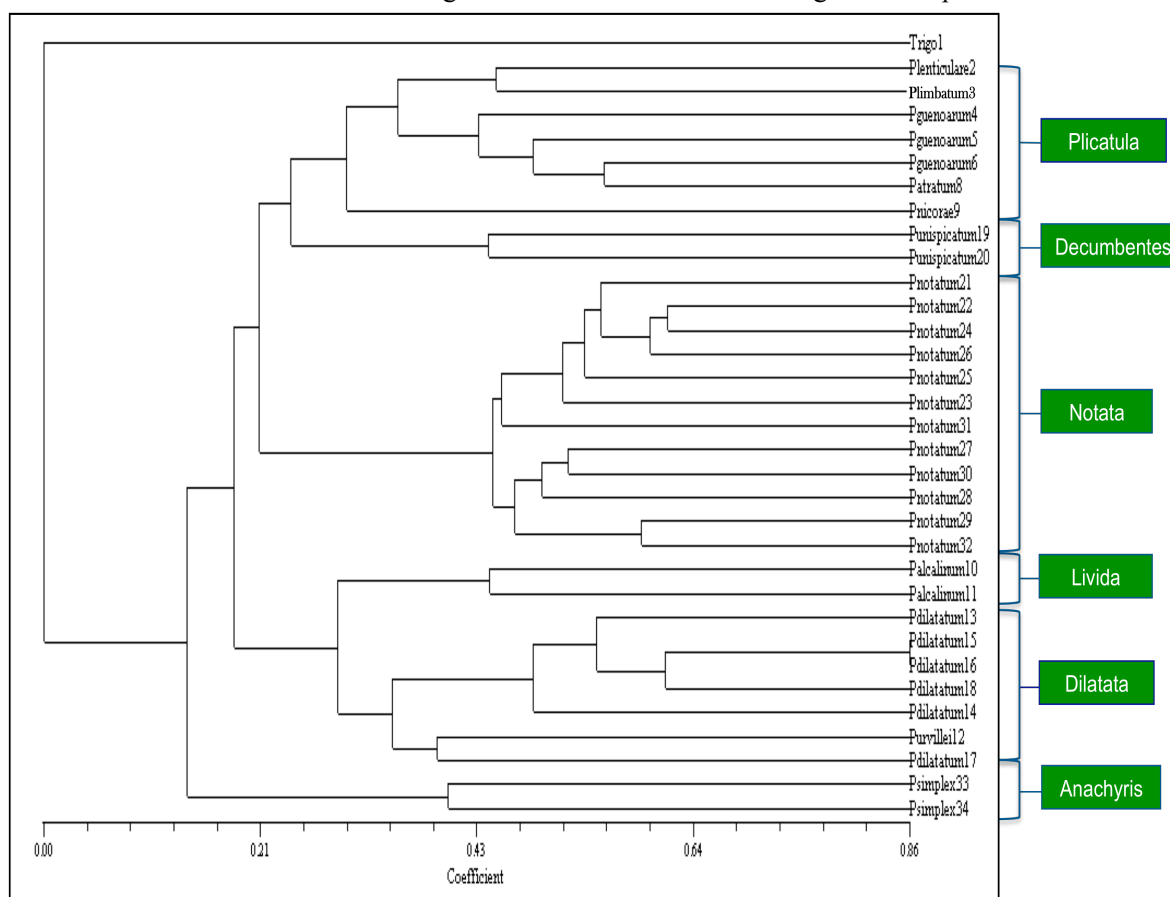
Figura 17: Patrones de amplificación obtenidos con los marcadores Cnl145(A) y Cnl142(B) sobre las 33 accesiones de *Paspalum* empleadas en este estudio.



Geles de acrilamida al 5 % teñido con nitrato de plata mostrando la amplificación del marcador EST-SSR Cnl145 (A) y Cnl142 (B) sobre las 33 accesiones del género *Paspalum*. En la tabla sobre el gel se indica el grupo taxonómico, la especie, el nivel de ploidía, el nombre de la accesión y modo de reproducción de cada genotipo utilizado. Con números se identifican las entradas en los análisis de agrupamiento y variabilidad. Rep: modo de reproducción (Apo: Apomítica, Sex: Sexual). MP: Marcador de Peso Molecular. B: Blanco de reacción.

Con los patrones de amplificación obtenidos en cada introducción se generó una matriz de datos según lo descrito en Materiales y Métodos (apartado III.10) y se realizó un análisis utilizando el programa NTSYS 4.0 (Rohlf, 1998). La similitud entre las unidades taxonómicas se determinó mediante el índice de Jaccard (1908) y el agrupamiento fue realizado por el método del UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). La Figura 18 muestra el dendrograma obtenido luego del análisis de agrupamiento. En el mismo se puede observar que los marcadores empleados permitieron diferenciar los grupos taxonómicos analizados y las especies dentro de cada uno.

Figura 18: Dendrograma obtenido a partir del análisis de agrupamiento realizado empleando marcadores EST-SSR sobre el ADN genómico de 33 accesiones del género *Paspalum*.



Dendrograma resultante del análisis de agrupamiento realizado utilizando ocho pares de oligonucleótidos que generaron un total de 166 bandas informativas. La longitud de las ramas indica la similitud entre los individuos. El trigo cv. Federal se utilizó como control externo. Los números al lado de cada especie corresponden a las accesiones utilizadas en el estudio de acuerdo a la Figura 17.

Con el objetivo de determinar el poder de discriminación del grupo de marcadores utilizados en el agrupamiento se utilizó el programa GenAlex 6.3 (Peakall y Smouse, 2006) para realizar un análisis de coordenadas principales (PCA) (Peakall y Smouse, 2006). Para esto se utilizó la matriz de datos binarios (codificada como presencia 1, ausencia 0) y dos tipos de análisis. Primero se consideró que los datos pertenecían a una única población y luego se tomó cada uno de los seis grupos taxonómicos como una población individual. Para cada análisis se realizó una matriz de distancia a partir de la cual se llevaron a cabo los estudios. En la Figura 19 A se muestra el gráfico de coordenadas principales obtenido cuando se utilizó a cada grupo como una población independiente. Como se observa, fue posible diferenciar claramente los grupos Plicatula, Dilatata y Notata, mientras que la división entre los tres grupos restantes (Livida, Anachyris y Decumbentes) no fue tan marcada. A partir de los resultados obtenidos en ambos análisis (UPGMA y PCA) y por medio de sus respectivos gráficos de agrupamiento (Figuras 18 y 19) es posible detectar que:

- En Notata se observa un grupo bien definido, sin embargo es posible diferenciar dos sub-grupos. Los agrupamientos entre los distintos genotipos del grupo fueron coincidentes entre los dos métodos de análisis empleados. Por un lado podemos observar un agrupamiento entre los individuos Q4295 (*P. notatum* 22), Q4084 (*P. notatum* 23), Q4188 (*P. notatum* 24), Q4117 (*P. notatum* 25) y Q3775 (*P. notatum* 26) mientras que otro sub-grupo se forma con los individuos Q4181 (*P. notatum* 27), Q4010 (*P. notatum* 30), SV2893 (*P. notatum* 28), ST2369 (*P. notatum* 29) y Q4276 (*P. notatum* 32).
- En el grupo Plicatula se observa asimismo que todos los individuos se encuentran próximos. Es de destacar que *P. guenoarum* (6) se ubica más cerca de *P. atratum* (8) que a otros individuos de su misma especie (*P. guenoarum* 4 y 5). Por otro lado *P. nicorae* se encuentra más alejado del resto de los genotipos del grupo con el análisis de UPGMA (Figura 18) aunque muy cercano a las accesiones de *P. limbatum* (3) y *P. lenticulare* (2) con el otro método de análisis empleado (PCA) (Figura 19 A).
- En el grupo Dilatata es posible observar que dos de los genotipos analizados, Q69-12 (*P. dilatatum* 15) y Q4081 (*P. dilatatum* 16) casi no pudieron ser diferenciados uno del otro. Además estos dos genotipos fueron localizados cerca

del genotipo Ls3 (*P. dilatatum* 18) de *P. dilatatum*. Se destaca asimismo que el genotipo Q2960 de *P. dilatatum* (17) está más cercano a *P. urvillei* (Q4226, *P. urvillei* 12) que a otros individuos de su propia especie.

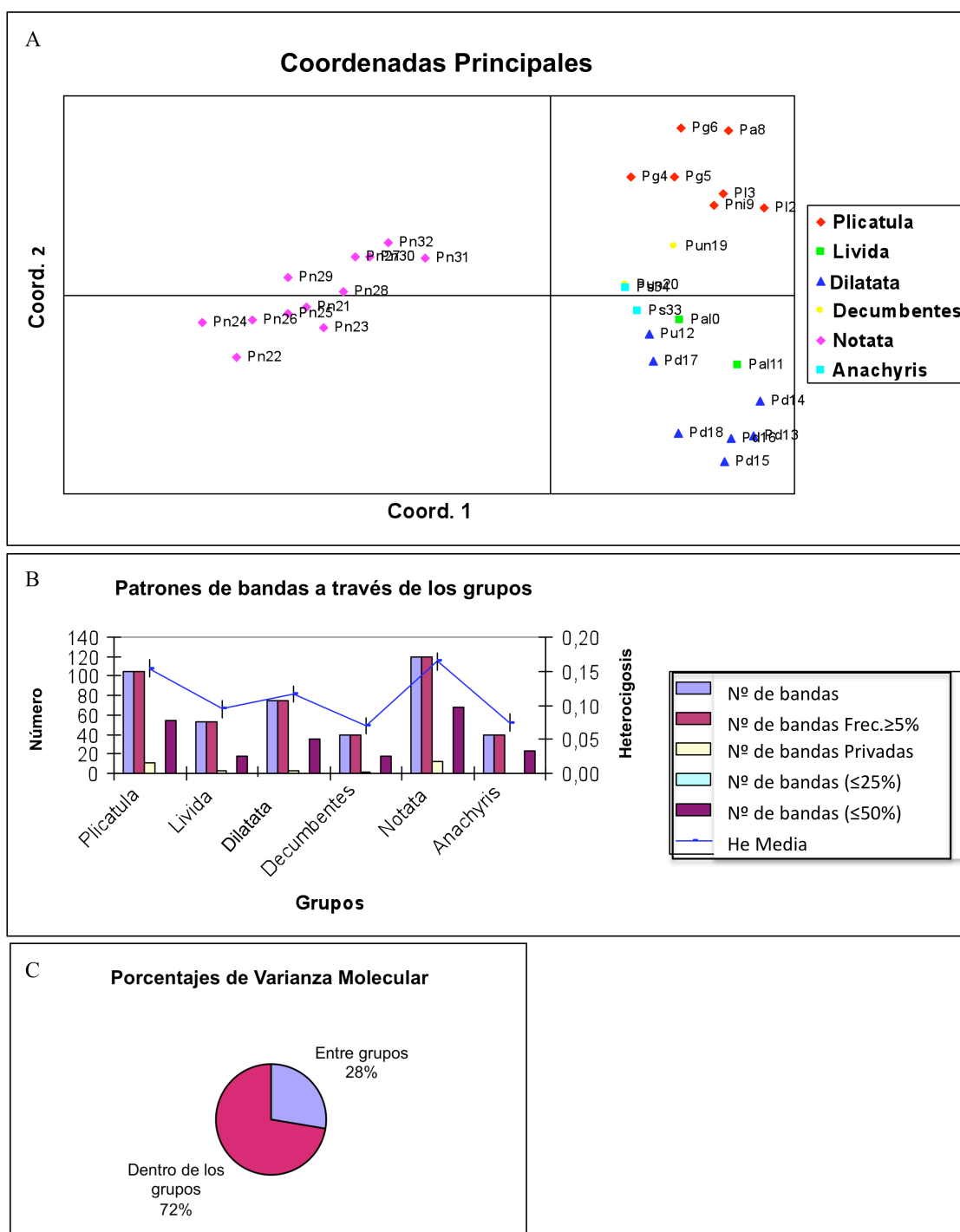
- Los grupos *Livida* y *Dilatata* mostraron una distancia menor entre sí que con el resto de los grupos analizados.

Resultados similares de agrupamiento (entre los representantes de cada grupo taxonómico) fueron obtenidos cuando se utilizó a todos los individuos como una única población (no se muestra).

En la Tabla XIII se puede observar la media y el desvío estándar de los valores obtenidos en los distintos grupos taxonómicos correspondientes a: *i*) número de alelos diferentes (N_a), *ii*) número de alelos efectivos (N_e), *iii*) Índice de Shannon (I), *iv*) heterocigosis esperada (H_e), *v*) heterocigosis esperada corregida (U_{He}) y *vi*) porcentaje de *loci* polimórficos (% *loci* P) cuando se analizó cada grupo por separado con todos los marcadores estudiados. Entre las estadísticas analizadas, el valor medio del número de alelos diferentes por grupo presentó un rango comprendido entre 1,419 y 0,401. El valor máximo (1,419) corresponde al grupo Notata seguido por Plicatula (1,228) y Dilatata (0,880). En cuanto al número de alelos efectivos se observaron valores de 1,253 para Notata y 1,119 para Decumbentes. El índice de Shannon mostró un rango de 0,266 para Notata hasta 0,101 para Decumbentes. La heterocigosis esperada va desde 0,171 (Notata) a 0,093 (Decumbentes) y por último el % de *loci* polimórficos varió entre 70,66 (Notata) a 16,77 (Decumbentes).

En la Tabla XIII también se expresan las medias totales de los parámetros estudiados considerando todos los grupos analizados.

Figura 19: Diagrama de Coordenadas Principales obtenidos a partir del agrupamiento realizado con marcadores de EST-SSR sobre el ADN genómico de 33 accesiones del género *Paspalum* y el programa GenAlex.



A) Gráfico resultante del análisis de coordenadas principales obtenido a partir de 166 bandas informativas. Los distintos grupos taxonómicos se resaltan en distintos colores. Los números al lado de cada especie corresponden a las accesiones utilizadas en el estudio. Las correspondencias entre las accesiones y los números que las representan se detallan en la Tabla sobre el gel del Figura 17 A. Coord. 1: Coordenada 1, Coord. 2: Coordenada 2. B) Patrones de bandas en las poblaciones. C) Porcentaje de Varianza Molecular.

Tabla XIII: Valores de media y el desvío estándar obtenidos en los distintos grupos taxonómicos para los parámetros poblacionales analizados.

Media y desvío estándar de los <i>loci</i> analizados para cada grupo								
Grupo		N	Na	Ne	I	He	UHe	% <i>loci</i> P
Plicatula	Media	6,946	1,228	1,233	0,249	0,154	0,166	60,48
	DS	0,018	0,075	0,021	0,018	0,012	0,013	
Livida	Media	2,000	0,545	1,161	0,138	0,094	0,126	22,75
	DS	0,000	0,065	0,023	0,020	0,013	0,018	
Dilatata	Media	5,587	0,880	1,177	0,187	0,117	0,128	43,11
	DS	0,070	0,076	0,020	0,018	0,012	0,013	
Decumbentes	Media	2,000	0,401	1,119	0,101	0,069	0,093	16,77
	DS	0,000	0,059	0,021	0,018	0,012	0,016	
Notata	Media	11,784	1,419	1,253	0,266	0,164	0,171	70,66
	DS	0,032	0,070	0,023	0,018	0,013	0,013	
Anachyris	Media	2,000	0,419	1,127	0,109	0,074	0,099	17,96
	DS	0,000	0,060	0,021	0,018	0,012	0,016	
Medias y desvío estándar totales								
		N	Na	Ne	I	He	UHe	% <i>loci</i> P
Total	Media	5,053	0,815	1,178	0,175	0,112	0,131	38,62
	DS	0,114	0,030	0,009	0,008	0,005	0,006	9,45

DS: Desvío Estándar, % *loci* P: Porcentaje de *loci* polimórficos, N: tamaño de muestra, Na: N° de alelos diferentes, Ne: N° de alelos efectivos, I = índice de Shannon, He: heterocigosis esperada, UHe: heterocigosis esperada no desviada.

En la Figura 19 B y en la Tabla XIV, se describen los patrones de bandas obtenidas en cada población. El número de bandas registradas en cada grupo, varió de 119 para Notata a 39 para Decumbentes. Por otro lado, el número de bandas privadas por grupos, es decir el número de bandas que son exclusivas de un grupo en particular, mostró un rango de variación entre 12 para Notata a 0 para Anachyris. El número de bandas comunes en al menos el 50 % de los grupos varió entre 68 para Notata a 17 para Decumbentes. Estos resultados indicaron que el número de bandas privadas de cada grupo resultó inferior al número de bandas comunes entre los grupos. En particular los grupos Plicatula y Notata fueron los que presentaron un mayor número de bandas privadas y porcentajes de *loci* polimórficos (Figura 19 B, Tabla XIV).

Tabla XIV: Análisis del patrón de bandas a través de la población o grupos.

Grupo	Plicatula	Livida	Dilatata	Decumbentes	Notata	Anachyris
N° Bandas dif	104	53	75	39	119	40
N° Bands Frec. $\geq 5\%$	104	53	75	39	119	40
N° Bandas Privadas	11	3	3	2	12	0
N° Bandas m Com. ($\leq 25\%$)	0	0	0	0	0	0
N° Bandas m Com. ($50 \leq \%$)	54	18	36	17	68	23

N° **Bandas dif.** = número de bandas diferentes, N° **Bands Frec. $\geq 5\%$** = número de bandas diferentes con una frecuencia mayor al 5%, N° **Bandas Privadas** = número de bandas únicas de una población, N° **Bandas m comunes ($\leq 25\%$)** = número de bandas menos comunes (cuya frecuencia es mayor al 5%) encontrada en al menos 25% de los grupos, **No. Bandas m comunes ($\leq 50\%$)** = número de bandas menos comunes (cuya frecuencia es mayor al 5%) encontrada en al menos 50% de los grupos.

Con el objetivo de discriminar la variación genética dentro de cada grupo, a partir de la matriz de distancias obtenida previamente, se realizó un análisis de la varianza molecular. En la Tabla XV se muestran los resultados obtenidos en el análisis de AMOVA para los seis grupos analizados y el correspondiente valor de PhiPT. Además se muestran los valores de suma de cuadrados (SS) y suma de cuadrados medios (MS) para el cálculo de la varianza entre y dentro de cada grupo.

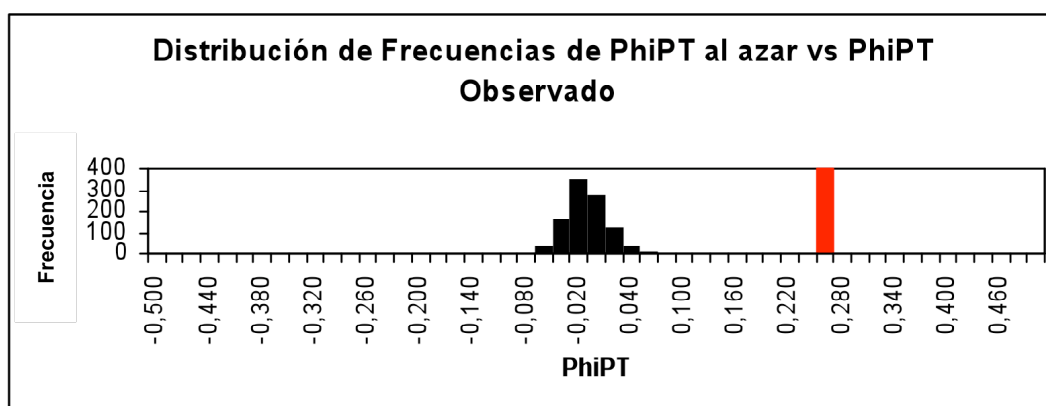
A partir del valor obtenido con el estimador PhiPT (0,277) es posible inferir que existen diferencias en la variabilidad genética presente en los distintos grupos, con una probabilidad asociada menor al 0,001. El análisis de varianza molecular (AMOVA) que se realizó a partir de la matriz de distancias indicó que el 72 % de la variación se encuentra dentro de los grupos, mientras que solo el 28% es explicable por la variación entre grupos (Figura 19 C). En la Figura 20 se observa el gráfico de la distribución de las frecuencias del estimador PhiPT obtenido al azar a partir de 999 permutaciones (ver Materiales y Métodos) y el valor calculado en el análisis de AMOVA (barra en color rojo). Como es posible observar en la figura, el valor calculado de PhiPT fue localizado fuera del rango de valores de esperados por azar (distribución de PhiPT color negro en la Figura 20) confirmando los resultados obtenidos.

Tabla XV: Resumen de los datos obtenidos luego del análisis de varianza molecular (AMOVA).

AMOVA					
Fuente	df	SS	MS	Var. Est.	MV%
Entre grupos	5	261,231	52,246	7,033	28%
Dentro de grupos	26	478,362	18,399	18,399	72%
Total	31	739,593		25,432	100%
No.	4,813				
Estadística	Valor	P(azar ≥ data)			
PhiPT	0,277	0,001		PhiPT = $AP_V / (WP_V + AP_V) = AP_V / \text{Varianza}_{TOT}$	

No.: número promedio de especies en cada grupo, **df**: grados de libertad, **SS**: suma de cuadrados, **MS**: Suma de cuadrados medios, **Var. Est.:** varianza estadística, **MV%:** Porcentaje de Varianza Molecular, AP_V = Varianza estimada entre poblaciones, WP_V = Varianza estimada dentro de poblaciones, $P(\text{azar} \geq \text{data})$: Probabilidad para PhiPT esta basado sobre las permutaciones a través de los datos totales.

Figura 20: Distribución de frecuencias del estimador PhiPT obtenida por permutaciones al azar vs. el valor calculado luego del análisis de datos.

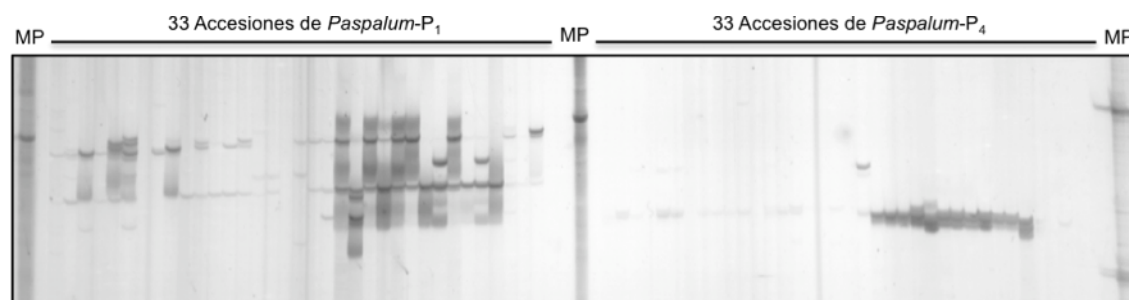


La barra roja indica el valor PhiPT calculado en el análisis de AMOVA.

IV.6.2-Transferencia de SSR genómicos a distintas especies de *Paspalum*

Continuando con la evaluación de los marcadores SSR utilizados en este trabajo para la realización de análisis de filogenia, los 11 marcadores SSR genómicos de *P. notatum* fueron ensayados en las 33 accesiones del género descritas anteriormente, utilizando un análisis de coordenadas principales. La Figura 21 muestra un ejemplo de los patrones de amplificación obtenidos con estos marcadores en las distintas accesiones analizadas. En total se obtuvieron 104 fragmentos, con un promedio de 13 fragmentos informativos por cebador y 4,39 fragmentos polimórficos por especie. En este punto es importante informar que los 11 SSR genómicos amplificaron patrones de bandeo múltiples en el grupo Notata (que incluyó 12 individuos) e inclusive dos marcadores (SSR-P2, SSR-P4) amplificaron exclusivamente con *P. notatum*. Sin embargo, en las otras especies analizadas no se obtuvieron amplificaciones definidas para la mayoría (o todos) los SSR ensayados.

Figura 21: Patrones de amplificación obtenidos con los marcadores SSR-P₁ y SSR-P₄ sobre ADN genómico de 33 genotipos del género *Paspalum*

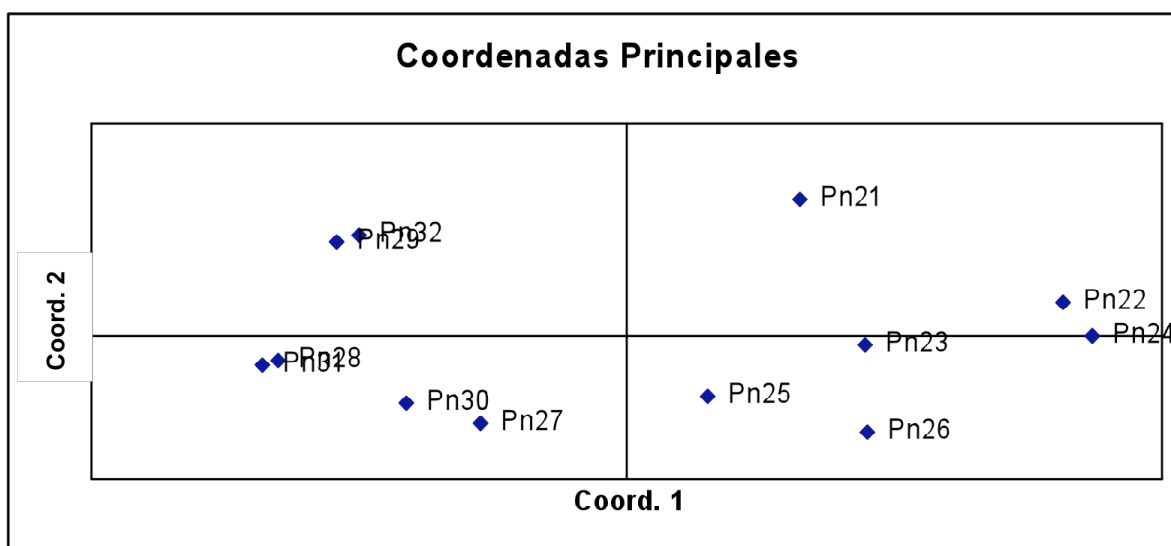


Gel de acrilamida al 5 % teñido con nitrato de plata mostrando la amplificación del marcador SSR-P₁ (PN03-A5₁) y SSR-P₄ (PN03-F2₄) sobre los 33 genotipos del género *Paspalum*. MP: marcador de peso molecular. El orden de siembra es el mismo que se indica en la Figura 17. Las calles donde se observa un patrón uniforme corresponden a los genotipos de *P. notatum*.

A partir de los datos obtenidos se realizó el análisis de coordenadas principales considerando solamente el grupo Notata. Este análisis mostró un agrupamiento similar al obtenido con los marcadores EST-SSR (ver página 140) en el cual se formaron dos

sub-grupos delimitados por la Coordenada 1 (Figura 22). En general los genotipos Q4295, Q4084, Q4188, Q4117 y Q377522 (22, 23, 24, 26 y 25, respectivamente) formaron un sub-grupo mientras que los individuos Q4181, Q4010, SV2893, y Q4276 (27, 30, 31, 28, 29, y 32, respectivamente) formaron otro sub-grupo. En forma particular se pueden observar las cercanías entre los genotipos Q4010 (28) y N160 (31), Q4276 (32) y SV2893 (29), y ST2369 (30) con Q4181 (27) en uno de los grupos y entre Q4295 (22) y Q4188 (24) en el otro.

Figura 22: Análisis de coordenadas principales de las accesiones del grupo Notata realizado con marcadores SSR genómicos y el programa GenAlex.



Los números al lado de cada especie corresponden a las accesiones utilizadas el estudio de acuerdo a la Figura 17. Pn: *P. notatum*.

V DISCUSIÓN

V-DISCUSIÓN

V.1- Transferencia y localización de marcadores de secuencia conocida (EST-SSR, SSR genómicos y COS) a *Paspalum notatum*

En los últimos años los análisis genómicos han tenido un incremento notable. En particular, las técnicas de secuenciación masiva de ADN genómico o ADNc han permitido obtener un gran cúmulo de información sobre el contenido génico y la estructura de los genomas en un gran número de especies. Debido a su importancia económica los genomas de trigo, arroz y maíz han sido algunos de los más estudiados en plantas. Actualmente se dispone de bases de datos públicas como GRAMENE (www.gramene.org) y maizesequence (www.maizesequence.org), entre otras, en donde es posible encontrar las secuencias completas de los genomas de varias especies. En éstas (por ejemplo GRAMENE), los usuarios pueden consultar la lista de genes identificados, la localización física de determinadas secuencias, obtener la colección completa de ESTs de la especie y realizar estudios de genómica comparativa entre cereales como por ejemplo arroz, sorgo, maíz, trigo, avena y cebada, así como con la planta modelo *Arabidopsis*. Asimismo, permite la integración de la información

disponible sobre mapas genéticos, marcadores moleculares, proteínas y rutas metabólicas, localización de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL), fenotipos y diversidad genética (Ware et al., 2002; Liang et al., 2007). La integración de toda esta información permite descifrar muchas de las interacciones entre los componentes de los sistemas biológicos y como éstas afectan a determinadas características. Por lo tanto, estas bases pueden utilizarse en una amplia gama de áreas del conocimiento que van desde la biología, el mejoramiento, la biología molecular, la bioquímica, la bioinformática y la filogenómica (Jaiswal, 2011).

La disponibilidad de un número creciente de secuencias expresadas (EST) de cereales provee una importante fuente de nuevos marcadores. Debido a que las secuencias de los ESTs (y su localización en las especies modelo) son conocidas, es posible desarrollar marcadores a partir de esta información *in silico* y transferirlos desde las especies modelo a otras menos estudiadas. Esta estrategia facilita la generación de marcadores “anclados” en organismos en los cuales la información de secuencia es escasa y permite a los laboratorios de mediana complejidad acceder al desarrollo de marcadores génicos sin la necesidad de involucrarse en proyectos de secuenciación a gran escala. Asimismo, debido a que las secuencias de EST-SSR son más conservadas que las secuencias genómicas anónimas, estos marcadores pueden utilizarse para estudios de genómica comparativa, identificación de genes de interés y estudios de filogenia.

En este trabajo de tesis se seleccionaron marcadores EST-SSR distribuidos de manera uniforme en el mapa genético de arroz de acuerdo a lo descrito en Yu et al. (2004b). Debido a que el genoma de esta especie es considerado como modelo del genoma de gramíneas (Devos y Gale, 2000), esta estrategia fue seleccionada como una forma de cubrir distintas regiones del genoma de *P. notatum* y de evitar trabajar con marcadores concentrados en regiones específicas. Los análisis de mapeo realizados posteriormente (ver más adelante), mostraron una amplia distribución de los marcadores seleccionados en los mapas genéticos de Q4188 y Q4117, confirmando la utilidad de la estrategia seleccionada. Esta cobertura genómica fue asimismo corroborada por los estudios de mapeo *in silico* en maíz, en donde las secuencias de EST-SSR seleccionadas mostraron una gran distribución sobre todo el genoma de esta especie.

Utilizando los cebadores correspondientes a cada uno de los EST-SSR elegidos se realizaron en primer lugar ensayos sobre Q4188 y Q4117. Los resultados obtenidos demostraron una alta tasa de transferencia de estos marcadores (80%) y un alto grado de polimorfismo entre los genotipos. En general, las amplificaciones obtenidas mostraron patrones de bandeo múltiples. Esta característica pudo deberse al carácter poliploide del material utilizado y a la presencia de múltiples alelos por *locus*, debido a que ambos genotipos derivan esencialmente de materiales silvestres con muy baja proporción de homocigosis. Si bien los patrones múltiples aumentaron considerablemente el número promedio de marcadores por amplificación (en promedio 10), esta característica impidió la identificación de alelos en los *loci* evaluados y por lo tanto la caracterización de los marcadores EST-SSR como codominantes. En todos los casos, la presencia/ausencia de los marcadores obtenidos en cada amplificación fue considerada por separado (de manera dominante). A pesar de que esta clasificación aporta menor información genética que la codificación codominante (Phillips y Vasil, 1996), fue la única posible para este caso en donde se analizó un organismo poliploide con marcadores de bandeo múltiple. Considerando este razonamiento, todos los análisis genéticos y filogenéticos fueron realizados para marcadores de tipo dominante.

El aislamiento y secuenciación de marcadores EST-SSR de *P. notatum*, mostró que una proporción de los mismos (30 %) presentó valores de similitud mayores al 60 % con las secuencias originales de trigo de las cuales derivaron. Este resultado confirmó la amplificación de secuencias ortólogas entre ambas especies y en especial justificó la realización de estudios comparativos. Es de destacar que en la mayoría de los casos fue posible detectar también la secuencia del SSR, aunque las mismas mostraron variaciones respecto al clon de EST original.

En los estudios previos de Wang et al. (2006) se realizó un análisis de la transferencia de marcadores EST-SSR de trigo a cuatro especies de *Paspalum* que resultó en un nivel promedio de 67.50 % (con un máximo de 74,00 % para *P. vaginatum*). Si bien en nuestro trabajo el valor de transferencia resultó similar (72,72 %) se debe tener en cuenta que se utilizaron solo los marcadores que previamente habían amplificado en arroz. Además estos marcadores resultaron polimórficos en los genotipos parentales de la población de mapeo de este estudio, con un promedio de ocho bandas polimórficas por marcador. Si bien en el trabajo de Wang et al. (2006) se informó cinco bandas polimórficas por marcador, debe considerarse que para cualquier

marcador de ADN, los niveles de polimorfismo detectados dependen principalmente del método de detección, marcadores y accesiones utilizadas. De acuerdo con este razonamiento, en el trabajo de Wang et al. (2006), los autores utilizaron geles de agarosa al 3 % para separar los fragmentos de ADN. De esta manera la resolución para la detección de una diferencia entre dos fragmentos fue de al menos 20 pares de bases entre los mismos, esto es un poder de resolución mucho menor que si se utilizan geles de poliacrilamida el cual detecta diferencias de 2 a 4 pares de bases. En su trabajo Wang et al. (2006) postulan que si se hubieran utilizado este último método con los mismos marcadores podrían haber detectado hasta ocho bandas polimórficas por combinación de cebadores, que es el número promedio de bandas polimórficas de EST-SSR halladas en nuestro estudio.

Los estudios dedicados al desarrollo de marcadores de secuencia conocida a partir de genes relacionados con el desarrollo del gametofito (marcadores COS) mostraron resultados variables según los casos analizados. Por una lado se obtuvieron secuencias ortólogas al gen *serk* de *Poa pratensis* a partir de la amplificación de un fragmento conservado del mismo de 200 pb (*Pnserk*), aunque no fue posible localizar esta secuencia en el mapa genético de la especie. A pesar de varios intentos realizados no fueron detectados fragmentos polimórficos en esta secuencia entre los genotipos parentales por lo cual el análisis de ligamiento fue impracticable. Por otro lado, varios marcadores fueron obtenidos a partir de segmentos conservados de los genes *apostar*, *baby boom* y *pkd*. En el primer caso, los marcadores obtenidos fueron localizados en el mapa de Q4117 mientras que los dos restantes fueron localizados en Q4188. Sin embargo, los análisis de las secuencias segregantes obtenidas a partir de la secuencia de los fragmentos de *baby boom* y *pkd*, no mostraron similitud con dicho gen y por lo tanto fueron consideradas como marcadores anónimos. Estos resultados sugieren que el éxito en el desarrollo de este tipo de marcadores debe considerarse para cada caso y que no es posible realizar una generalización con respecto a la eficiencia de los mismos. Los marcadores SSR genómicos desarrollados por Cidade et al. (2009) mostraron buenas amplificaciones en ambos genotipos ensayados y al igual que los marcadores EST-SSR generaron patrones de bandeo múltiples. Muchos de estos marcadores pudieron asimismo ser localizados en los mapas genéticos y asignados a determinados grupos de ligamiento.

El primer mapa genético al nivel tetraploide de *P. notatum* fue reportado por Stein et al. (2007). En el mismo se presentaron los mapas de ligamiento de los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico) y la identificación de la región genómica responsable de la aposporía, a partir de la utilización de una población de mapeo F₁ segregante por el modo de reproducción y marcadores de AFLP (Stein et al., 2007). Ambos mapas fueron utilizados en este trabajo de tesis como marcos de referencia para la localización de marcadores EST-SSR de trigo, marcadores COS desarrollados en nuestro laboratorio y SSR genómicos específicos de la especie desarrollados por Cidade et al. (2009).

El trabajo de tesis permitió generar un total de 264 marcadores de los cuales 109 fueron obtenidos a partir de Q4188, 97 de Q4117 y 58 desde ambos genotipos (biparentales) (ver Resultados, Tablas III y V y punto IV.3). Al igual que en el caso de los marcadores de AFLP y RFLP desarrollados previamente en esta población por Stein et al. (2007), la mayoría mostró una relación de segregación por presencia/ausencia de 1:1. Esta condición facilitó el análisis de ligamiento y permitió lograr una cobertura aceptable del genoma. Asimismo, se obtuvo un total de 27 marcadores (10,22 %) biparentales con segregación 3:1, los cuales son informativos para identificar grupos homólogos en los mapas de ambos genotipos. Este porcentaje fue similar al obtenido por Stein et al. (2007) quienes identificaron un 9 % de marcadores con este tipo de segregación. Por otro lado, del total de marcadores obtenidos 73 presentaron un tipo de segregación distorsionada, de los cuales 24 y 19 derivaron de Q4188 y Q4117 respectivamente. En general, la distorsión en los valores de segregación se debió a una sub-representación de la presencia de los marcadores en la progenie. Dentro de este grupo, 15 (13,76 %) y 12 (12,34 %) marcadores correspondientes a Q4188 y Q4117, respectivamente, mostraron relaciones de presencia/ausencia de 1:3 – 1:6, las cuales son similares a las observadas en la transmisión del carácter aposporía (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2007). Este grupo de marcadores estaría representando *loci* que se transmiten a la descendencia en menor número que el esperado y por lo tanto estarían afectados por algún tipo de letalidad gamética o cigótica. Este tipo de distorsión en la segregación podría ser causada por factores letales parciales localizados en la región circundante al marcador (Cheng et al., 1998). La presencia de un factor letal parcial fue propuesto para explicar la distorsión en la segregación de la aposporía en *P. notatum* por Martínez et al. (2001). Las mismas relaciones de segregación fueron obtenidas para

el carácter aposporia por Stein et al. (2007) por lo que se postuló que factores similares podrían estar afectando a otros *loci* a través del genoma. Del total de marcadores distorsionados segregantes desde el progenitor apomictico, cuatro fueron localizados en grupos de ligamiento relacionados a la aposporia (ver más adelante). Estos resultados confirman que esta región genómica en particular está afectada por algún efecto letal parcial como fue propuesto por Martínez et al. (2001).

En el trabajo original desarrollado por Stein et al. (2007) se reportan 263 marcadores en el mapa de Q4188 que cubren una distancia de 1.815 cM. El presente trabajo de tesis permitió incorporar 59 marcadores nuevos a este mapa (alcanzando un total 322 marcadores), de los cuales 44 corresponden a EST-SSR, SSR y COS y 15 a marcadores de AFLP y RFLP desarrollados previamente (Stein et al., 2007). La incorporación de estos nuevos marcadores permitió la identificación de 34 grupos de ligamiento, generando de esta manera ocho grupos nuevos a los 26 originalmente desarrollados por Stein et al. (2007) y extender la cobertura del mapa a una distancia de 1.920 cM. Por otro lado, los marcadores génicos y genómicos mapeados en este trabajo se distribuyeron en 19 de los 34 grupos de ligamiento.

Para el caso del mapa del genotipo apomictico Q4117, el trabajo realizado por Stein et al. (2007), incluyó 216 marcadores que cubren una distancia de 2.708 cM. En esta tesis se logró incorporar 133 marcadores nuevos al mapa disponible, incrementando el número total de marcadores localizados en el mapa a 349. Dentro de los 133 marcadores incorporados, 66 correspondieron a marcadores EST-SSR, SSR genómicos y COS, mientras que los 67 restantes derivaron de marcadores generados previamente por Stein et al. (2007). El análisis de ligamiento permitió definir 45 grupos de ligamiento, seis nuevos a los 39 generados previamente (Stein et al., 2007). Los marcadores desarrollados en este trabajo se distribuyeron en 33 de los 45 grupos de ligamiento y permitieron cubrir una distancia genética de 3.118 cM. Entre los grupos nuevos se identificaron dos grupos de ligamiento homólogos a los grupos P2a y P4 (nombrados como P2c y P4b, respectivamente).

La comparación de los resultados del mapeo obtenido en los genotipos Q4188 y Q4117 mostró que la eficiencia para detectar grupos de cosegregación fue diferente entre ambos genotipos (34 vs. 45). Esta diferencia fue notada también en el trabajo de Stein et al. (2007). De acuerdo a lo postulado por dichos autores una de las razones de

este resultado sería el origen de ambos genotipos parentales. El genotipo Q4188 fue obtenido experimentalmente a partir de un tetraploide apomíctico facultativo con altos niveles de sexualidad (Q3664) derivado de un tetraploide sexual obtenido por tratamiento con colchicina (Quarin et al., 2003). Esta constitución poliploide inducida recientemente podría haber originado una buena proporción de *loci* en condición multiplexa (es decir, sin segregación), reduciendo la eficiencia para detectar ligamiento en algunas áreas genómicas. Por otro lado, Q4117 es un genotipo natural cuya constitución genética actual podría haber derivado de numerosas generaciones llevando a muchos *loci* a un estado heterocigota simplexo, lo cual facilita la detección de ADS y las posibilidades de detectar ligamientos.

El mapa de ligamiento reportado por Stein et al. (2007) fue construido fundamentalmente en base a marcadores de AFLP (aunque algunas sondas de RFLP relacionadas con la aposporia fueron también incluidas), lo cual no permitió realizar estudios comparativos sobre la presencia y orden de determinados *loci* en relación a su disposición en el genoma de otras especies de gramíneas (Stein et al., 2007). En esta tesis fueron incorporados a los mapas de Q4188 y Q4117 marcadores SSR y COS de secuencias conocidas, que permitieron iniciar estudios de mapeo comparativo entre los genomas de *P. notatum*, arroz y trigo. Estos estudios iniciales permitieron determinar que algunos segmentos cromosómicos se mantienen constantes en las tres especies, como por ejemplo los definidos por los marcadores Ksum141 y Cnl142. Estos marcadores definen un segmento de aproximadamente 10 cM en el grupo de ligamiento P1a de *P. notatum* y de 22 cM en el cromosoma 11 de arroz, coincidiendo además en el cromosoma 1 de maíz (18 cM). Estos análisis demostraron asimismo que las distancias genéticas entre los marcadores se mantuvieron relativamente estables. Es de destacar que debido al carácter poliploide de *P. notatum*, en varios casos se detectaron marcadores cosegregantes que derivan de diferentes bloques génicos de arroz. Serían necesarios nuevos estudios incluyendo un mayor número de marcadores “anclados” a fin de definir segmentos cromosómicos más pequeños en todo el genoma (10 – 15 cM) para poder realizar estudios comparativos detallados en cada uno de los grupos de ligamiento. Este trabajo podría asimismo complementarse con el estudio de la disposición de los mismos marcadores en las razas diploides y de esa manera determinar la presencia de duplicaciones, inversiones y deleciones producidas por la tetraploidización. Si bien en este trabajo de tesis se logró distribuir estos marcadores en

19 y 33 grupos de ligamiento materno y paterno, respectivamente, solo se identificaron 13 posibles bloques conservados entre las tres especies analizadas. Dos de los mismos corresponden al genotipo Q4188 y 10 al genotipo Q4117. Es de esperar que a medida que se incorporen más marcadores génicos a los mapas será posible identificar un mayor grupo de bloques conservados entre las tres especies.

En el caso especial del grupo P17a se pudo determinar que los dos marcadores de EST-SSR (Ksum206 y Ksum219) que mapean en fase de acoplamiento a ambos lados de la región genómica específica de aposporía (ASGR) pertenecen al cromosoma 12 de arroz y flanquean a la sonda de RFLP C1069, sobre un segmento de alrededor 46 cM . Estos tres marcadores mostraron la misma disposición en *P. notatum* definiendo un bloque cromosómico de 52 cM del grupo de ligamiento que contiene al *locus* responsable de la aposporía. De esta manera es posible que genes homeólogos a los determinantes de la aposporía en *P. notatum* podrán encontrarse en este segmento del cromosoma 12 de arroz.

El estudio realizado por Yu et al. (2004a) sugiere que los EST-SSRs tienden a localizarse en regiones de alta recombinación en trigo donde los marcadores son menos probables de identificar usando marcadores basados en ADN genómico. La localización preferencial en puntos de alta recombinación aumenta el valor de estos marcadores. En el caso particular de la señalización de la región de la apomixis, a pesar de haber ensayado en este estudio 12 marcadores pertenecientes a los cromosomas 2 y 12 de arroz, no fue posible detectar marcadores fuertemente ligados a este carácter. De todas maneras la identificación de marcadores flanqueantes al *locus* responsable de la aposporía (*ksum206pbd* y *ksum219pbd*) podrían considerarse como bordes genéticos para estrategias de búsqueda de genes de arroz asociados al carácter. Por otro lado, el resultado del mapeo *in silico* determinó que estos marcadores mapean en los cromosomas 3, 5 y 8 de maíz indicando que secuencias ortólogas a los determinantes de la aposporía podrían estar localizados en esos cromosomas. Además dos marcadores SSR, generados por los pares de oligonucleótidos PN03-F2₄ (*Ssrp4*) y PN02-H7₁₁ (*Ssrp11*), se localizaron en el cromosoma 2 de arroz, mientras que los experimentos de mapeo en *P. notatum* determinaron que se ubican en los grupos de ligamiento P17a y P17b respectivamente. De esta manera se obtuvieron dos marcadores SSR que se encuentran en la ASGR de *P. notatum* y mapean en el cromosoma 2 de arroz, confirmando la relación entre la parte distal de este cromosoma y el grupo de ligamiento

responsable de la aposporía en *P. notatum* (Pupilli et al., 2004). Estos resultados soportan la relación estructural entre arroz y *Paspalum* reportadas en estudios comparativos previos, en el sentido de que el grupo de ligamiento que contiene los determinantes de la aposporía en la especie podría consistir en un cromosoma híbrido formado por segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz (Pupilli et al., 2004; Hojsgaard et al., 2011) o 3, 5, y 8 de maíz.

Los marcadores microsatélites desarrollados a partir de bibliotecas genómicas, pueden pertenecer tanto a regiones transcritas como a regiones no-transcritas del genoma, y raramente existe información disponible de acuerdo a su función (Varshney et al., 2005a). Por el contrario los marcadores microsatélites génicos a menudo tienen funciones conocidas o “presuntas” y son marcadores génicos con el potencial de representar marcadores funcionales en los casos donde el polimorfismo en la longitud del SSR afecta la función del gen en el cual reside (Anderson y Lübbersted, 2003). Han sido reportadas funciones posible para una proporción significativa de EST-SSR (Thiel et al., 2003; Yu et al., 2004a; Gao et al., 2004). En este trabajo se utilizaron para los experimentos de mapeo 28 marcadores de EST-SSR y a 19 de los mismos fue posible asignarles una función (Universidad de Cornell, USA (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/Cornell>)) (Anexo: Tabla I).

Los marcadores EST-SSR son una clase de marcadores que pueden contribuir a la selección dirigida de alelos si se demuestra que los mismos se hallan completamente asociados o son responsables de un rasgo de interés (Varshney et al., 2005a). Por ejemplo, un homólogo Dof (gen *DAG1* que muestra un fuerte efecto en la germinación de semillas en *Arabidopsis*) ha sido mapeado en el cromosoma 1B de trigo por medio de cebadores de EST-SSR (Gao et al., 2004). De manera similar Yu et al. (2004b) identificaron marcadores EST-SSR ligados al gen de respuesta al fotoperiodo (*ppd*) en trigo que fueron incluidos en este trabajo de tesis (Cnl157, Cnl158, Ksum186 y Ksum202).

El análisis *in silico* de las secuencias de los SSR de *P. notatum* mostró en general uno o dos alineamientos en los genomas de arroz y maíz, lo cual es coherente con el hecho de que son marcadores genómicos poco conservados. Sin embargo, dos marcadores alinearon con múltiples *loci* de arroz y maíz. El análisis de BLAST realizado con estas secuencias contra la base de transcritos, mostró varios

alineamientos localizados en distintos lugares del genoma tanto de arroz como maíz, indicando que en estos casos podrían tratarse de regiones codificantes. De esta manera, los SSR utilizados estarían marcando secuencias codificantes y no codificantes del genoma de *P. notatum*. Si bien el desarrollo de este tipo de marcadores es dificultoso, la disponibilidad de un mayor número de los mismos posibilitaría una mejor cobertura del genoma y permitiría la identificación de regiones no necesariamente codificantes. El desarrollo de este tipo de marcadores por el momento excede las posibilidades técnicas de nuestro laboratorio, por lo cual sería necesario establecer colaboraciones con otras instituciones nacionales o internacionales interesadas en este tema o temas relacionados como para llevar adelante este tipo de proyecto en un futuro cercano.

V.2- Evaluación de marcadores EST-SSR en especies del género *Paspalum*

El alto nivel de conservación que han evidenciado muchos marcadores de EST-SSR en especies de gramíneas poco relacionadas, indica el potencial de estos marcadores para realizar estudios detallados de filogenia en este grupo complejo de especies y resolver problemas taxonómicos. En especial la taxonomía del género *Paspalum* ha sido siempre una cuestión difícil de resolver debido a que los presuntos taxones han sido enmascarados por las frecuentes superposiciones de caracteres morfológicos, diferencias en los niveles de ploidía, hibridación interespecífica y la forma de reproducción apomítica (Rúa et al., 2010). Debido a esto, los grupos informales propuestos por Chase (1929), sobre la base de similitudes de caracteres morfológicos, ha tomado el lugar de una clasificación formal para el rango subgenérico (Zuloaga y Morrone, 2005), a pesar del hecho que Chase (1929) reconoció que "algunos grupos son agregados naturales de especies estrechamente relacionadas" (Mian et al., 2005; Chase, 1929).

Es probable que la conservación de los marcadores EST-SSR a través de las gramíneas se deba a dos razones principales: *i*) los estudios de mapeo comparativo han demostrado que los genomas de las gramíneas están altamente conservados, aún a través de especies poco relacionadas al nivel de grandes bloques cromosomales (Ahn y Tanksley, 1993; Kurata et al., 1994; Gale y Devos, 1998) y *ii*) el propio origen de los marcadores EST-

SSR que al derivar de regiones transcritas del ADN, se espera que sean más conservados que las regiones no codificantes (Kantety et al., 2002; Mian et al., 2005).

Los ensayos de amplificación realizados en las 33 introducciones del género, pertenecientes a seis grupos taxonómicos y 11 especies, demostraron que los marcadores inicialmente desarrollados para *P. notatum* pueden utilizarse en otras especies del género. El grado de polimorfismo evidenciado por los marcadores en los distintos grupos resultó semejante y como consecuencia de ello es probable que puedan utilizarse directamente para estudios genéticos y/o asistencia al mejoramiento en poblaciones segregantes. Asimismo, los estudios filogenéticos realizados en este trabajo demostraron que los marcadores EST-SSR derivados de trigo resultaron útiles para evaluar la variación genética en las especies de *Paspalum* seleccionadas. La utilización de estos marcadores permitió diferenciar los genotipos dentro de cada especie así como discriminar entre los grupos taxonómicos estudiados, asignados previamente por medio de caracteres morfológicos. Los marcadores EST-SSR fueron también útiles en el establecimiento de relaciones entre los genotipos dentro de una especie y entre especies dentro de un grupo.

El análisis de los patrones de bandas a través de la totalidad de los OTUs analizadas mostró que el número de bandas privadas (bandas dentro de un grupo) fue menor que el número de bandas comunes entre los grupos. Asimismo se observó que el valor del porcentaje de la varianza molecular dentro de grupos fue del 72 % mientras que el valor entre grupos fue 28 %. Estos resultados indicarían que la variabilidad de los EST-SSR entre grupos es menor que la variabilidad dentro de un mismo grupo. Esta característica puede deberse al origen génico de estos marcadores (que haría que estén presentes en los distintos taxones del género) y a la presencia de alelos y/o variaciones en las secuencias codificantes (que se darían dentro de las especies de cada grupo).

El valor del nivel de polimorfismo de los marcadores EST-SSR transferidos en este trabajo depende del grupo estudiado. El nivel más alto fue observado en el grupo *Notata* (70,66%), seguido por *Plicatula* (60,48%) y *Dilatata* (43,11%) (ver Tabla XIII). El alto nivel de polimorfismo está directamente relacionado con un elevado grado de heterocigosis, que es mantenido por la forma de reproducción de los individuos analizados. Si bien este valor, así como los otros parámetros analizados (número bandas privadas y número de bandas comunes) varían entre grupos indicando que *Notata*,

Plicatula y Dilatata son los grupos genéticamente más variables, se debe tener en cuenta que estos grupos incluyeron un mayor número de especies. Los tres grupos restantes solo incluyeron dos genotipos cada uno. El número de individuos analizados también puede ser el motivo de que sea tan definida la diferenciación de los grupos Notata, Plicatula y Dilatata cuando se les realizó el análisis de coordenadas principales, mientras que este análisis no dio una diferenciación tan marcada en Decumbentes, Livida y Anachyris. En base a estos resultados, nuevos estudios, incluyendo un mayor número de especies en cada grupo, serán necesarios para comparar los parámetros genéticos entre los grupos taxonómicos analizados.

A partir de la observación de los dendrogramas obtenidos es posible destacar algunos agrupamientos interesantes: *i*) el análisis del grupo Dilatata incluyó dos especies, *P. dilatatum* (representada por seis genotipos) y *P. urvillei* (ejemplificada por solo un genotipo). Uno de dichos agrupamientos se manifiesta entre dos individuos de *P. dilatatum* (Ls3 (pasto miel común) y Q4081 (Uruguay, *Chirú*)). El aval de este resultado se encuentra en una investigación filogenética del género iniciada en 1970 con el fin de identificar los progenitores del pasto miel común (*dalligrass*; *P. dilatatum* Poir). En la misma se utilizaron distintas especies relacionadas y se identificaron varios genomas (Burson 1983; Burson 1991a). A partir de estos estudios los autores determinaron que dos genomas (I y J) están presentes en especies que pertenecen a varios grupos taxonómicos diferentes (Burson et al., 1973; Burson, 1978; Burson, 1991a). Para el caso del pasto miel común, que es un apomíctico pentaploide ($2n = 5x = 50$), Burson (1981) le atribuyó un genoma de fórmula IJJX, en donde la X fue asignada para representar un genoma desconocido (Burson, 1981). Por otro lado, el biotipo Uruguayo (*Chirú*) es un hexaploide apomíctico (Burson et al., 1991) al que le fue asignado también los genomas I y J así como un tercer genoma no identificado al que le llamaron X (Burson, 1991a). Si bien, la designación del genoma X en ambos biotipos, fue realizada arbitrariamente sin evidencia de similitud entre ambos, Burson (1991b) realizó un estudio para establecer si éste presentaba homología en los dos biotipos analizados. Los resultados determinaron no solo que el genoma X era similar en ambos biotipos sino que además los genomas I y J tenían una relación cercana entre ellos, sustentando la teoría de que el biotipo Uruguayo hexaploide estuvo involucrado en el origen de pasto miel común. Los resultados del agrupamiento realizado en este trabajo están de acuerdo a esta hipótesis ya que el biotipo *P. dilatatum* común (LS3) (*P.*

dilatatum 18) y el Uruguayo (*Chirú*, Q4081) (*P. dilatatum* 16) agruparon juntos en el dendrograma (Figura 18), indicando que comparten gran parte de los *loci* de SSR analizados y por lo tanto un alto grado de homología genómica.

Por otro lado, entre las accesiones estudiadas de *P. dilatatum* se encuentra el citotipo tetraploide sexual ($2n = 4x = 40$) con anteras amarillas clasificado taxonómicamente como *P. dilatatum flavescens* (Q3952, *P. dilatatum* 13) (biotipo que ha sido utilizado ampliamente en estudios filogenéticos de la especie) y la accesión Q4226 (*P. urvillei* 12) correspondiente a *P. urvillei* Steud. (*Vaseygrass*), una gramínea forrajera tetraploide ($2n = 4x = 40$) nativa de América del Sur. *Vaseygrass* está cercanamente relacionado al pasto miel y taxonómicamente ambos son miembros del grupo Dilatata de *Paspalum*. La relación filogenética entre ambos ha sido previamente determinada de manera indirecta mediante cruces inter-específicas que concluyeron que *P. urvillei* tiene la misma fórmula genómica que *P. dilatatum flavescens* (Burson y Bennett, 1972). Sin embargo, en trabajos previos se realizaron cruzamientos entre *P. dilatatum flavescens* y *P. urvillei* que determinaron que los híbridos no sobrevivían luego de florecer (Burton, 1943; Burson, 1983). Por otro lado, se incluyó en este estudio un biotipo tetraploide sexual de *P. dilatatum* (Q2960) hallado por Caponio y Quarín (1987). El mismo se caracteriza por tener anteras amarillas y espigas más largas que cualquier otra forma de pasto miel y se le llamó *P. dilatatum* Virasoro. En los trabajos previos realizados por Caponio y Quarín (1990), se estudió la posibilidad de realizar híbridos intra e inter-específicos con estos tres genotipos. Los resultados obtenidos por Caponio y Quarín (1990) demostraron que hay una mayor efectividad de cruzamiento y fertilidad en los híbridos entre *P. urvillei* y *P. dilatatum* Virasoro. Los resultados de los estudios filogenéticos realizados en este trabajo de tesis determinaron que *P. dilatatum* Virasoro Q2960 (*P. dilatatum* 17) está más cercano a *P. urvillei* (Q4226, *P. urvillei* 12) que a los otros individuos de su propia especie analizados en estos experimentos. Esto concuerda con los resultados de los cruzamientos obtenidos por Caponio y Quarín (1990) descriptos previamente.

Otro de los genotipos de *P. dilatatum* estudiados en este trabajo fue el Q62-12 (*P. dilatatum* 15). Según Millot (1977), si bien la apomixis obligada fue el método reproductivo prevalente en los exámenes de progenie incluyendo más de cien clones del ecotipo Uruguayo (*Chirú*), se han observado plantas fuera de tipo (OTP) sugiriendo un comportamiento apomictico facultativo. En su trabajo Millot (1977) informó que la

mayoría de estas plantas son apomícticas pero una de ellas (Q62-12, *P. dilatatum* 15) segrega para diferentes caracteres exhibiendo fenotipos nunca vistos en la naturaleza. Q69-12 es un individuo sexual de anteras amarillas que deriva del genotipo Q4081 (*P. dilatatum* 16) (Chirú) (apomíctico facultativo de anteras púrpura) por lo que es coherente que en los análisis filogenéticos realizados en este estudio no se pueden distinguir uno de otro genéticamente con el número de marcadores analizados. En este punto cabe destacar que si bien las 166 bandas polimórficas generadas con los ocho marcadores posibilitaron la construcción de un dendrograma (Figura 18) en el que se pudo distinguir entre grupos de especies, hay un compromiso entre el número de bandas empleadas y el grado de diferenciación genética detectada para caracterizar y evaluar las relaciones entre las accesiones. En el trabajo de Wang et al. (2006) se determinó un dendrograma de 73 accesiones de *Paspalum* con marcadores SSR con un total de 209 bandas polimórficas que no se modificó demasiado cuando se lo realizó solamente con 100 de esas bandas. Sin embargo, Wang et al. (2006) también observó que para dos agrupamientos fue imposible distinguir la diferencia genética entre accesiones con el menor número de bandas. Por esta razón es probable que si se utiliza un mayor número de bandas se pueda llegar a resolver el agrupamiento entre los genotipos Q69-12 (*P. dilatatum* 15) y Chirú (Q4081, *P. dilatatum* 16) obtenidos en el dendrograma de este trabajo.

Se observó también que el grupo Dilatata se encuentra cercano al grupo Livida, esto coincide con trabajos previos que demostraron que ambos grupos forman una clado cuando se realizaron análisis filogenéticos del género *Paspalum* (Souza-Chies et al., 2006). Además, esto es coherente con hipótesis previas de que *P. lividum* contribuyó a la fórmula genética de *P. pauciciliatum* (Parodi) Herter, una especie que aunque no fue incluida en este análisis, pertenece al grupo Dilatata (Valls, 2000).

En el caso del grupo Notata fue posible determinar que con los dos métodos utilizados (agrupamiento por el método de grupo de pares que utiliza promedios no ponderados UPGMA y análisis de coordenadas principales, PCA) se formaron dos grupos bien definidos en donde las distancias entre los distintos genotipos coinciden con los dos métodos utilizados. Por un lado podemos observar un agrupamiento entre los individuos Q4295 (*P. notatum* 22), Q4084 (*P. notatum* 23), Q4188 (*P. notatum* 24), Q3775 (*P. notatum* 26) y Q4117 (*P. notatum* 25) mientras que otro grupo se forma con los individuos Q4181 (*P. notatum* 27), ST2379 (*P. notatum* 30), Q4010 (*P. notatum* 28),

SV2893 (*P. notatum* 29), y Q4276 (*P. notatum* 32). Un agrupamiento similar fue obtenido cuando se utilizaron solo los marcadores SSR genómicos generados a partir de *P. notatum* (Cidade et al., 2009), confirmando el agrupamiento obtenido con los EST-SSR génicos. En este punto cabe destacar que Cidade et al. (2009) obtuvieron una buena transferencia cruzada de los marcadores SSR génicos en tres especies del grupo Notata (*P. subciliatum*, *P. cromyorrhizon* y *P. ionanthum*). En este estudio se pudo obtener una amplificación total de estos marcadores en todos los genotipos de *P. notatum* del grupo Notata, sin embargo las especies de los otros grupos no amplificaron con todos los marcadores analizados. Por lo tanto, si bien se observa transferencia cruzada de los SSR entre diferentes especies de un mismo grupo taxonómico (Cidade et al., 2009), no se obtiene el mismo nivel de transferencia cuando se analizan especies de grupos diferentes. Esto concuerda con el hecho de que los SSR genómicos al localizarse en regiones menos conservadas, muestran una eficiencia de transferencia menor a través de especies (Röder et al., 1995; Sourdille et al., 2001; Kantety et al., 2002) que los SSR derivados de EST (Thiel et al., 2003; Gupta et al., 2003).

En el grupo Plicatula se incluyeron cinco especies distintas (*P. lenticulare*, *P. limbatum*, *P. guenoarum*, *P. atratum*, *P. nicorae*) y también se obtuvieron agrupamientos interesantes. Lo que se puede observar en el dendrograma de la Figura 18 es que todas las especies de Plicatula agruparon juntas aunque se destacan algunos agrupamientos inter-específicos. Particularmente se puede remarcar que si bien se incluyeron tres genotipos de *P. guenoarum*, solo dos de los mismos agruparon juntos. El genotipo restante (Azulado) *P. guenoarum* 6 presentó una similitud mayor con *P. atratum* (*P. atratum* 9). A pesar de que es un agrupamiento inter-específico la especie presenta características morfológicas de tamaño de laminas, número de racimos y pilosidad muy variables, además trabajos previos determinaron que *P. guenoarum* es afín a *P. atratum* (Zuloaga y Morrone, 2005).

Dentro de las especies estudiadas en el grupo Plicatula, *P. nicorae* es la más fácil de diferenciar morfológicamente del resto de las especies por sus rizomas catafilosos (Zuloaga y Morrone, 2005), motivo por el cual no resulta extraño que se diferencie de las otras especies en el análisis realizado por el método del UPGMA. Por otro lado, en este análisis se obtuvo el agrupamiento inter-específico entre *P. limbatum* (3) y *P. lenticulare* (2). Estas especies son morfológicamente muy similares (Espinoza et al., 2001), la principal característica utilizada para distinguir *P. limbatum* de *P. lenticulare*

es el tamaño de la planta en general, y particularmente el tamaño de las espiguillas, las cuales son más pequeñas en *P. limbatum* (Killeen, 1990). Además, *P. lenticulare* tiene un gran número de racimos por inflorescencia (Espinoza et al., 2001). En el trabajo de Espinoza et al. (2001) se propone que estas diferencias morfológicas menores y el probable origen autoploide de *P. lenticulare* sugieren que *P. limbatum* podría ser la forma diploide de *P. lenticulare*. Por otro lado con el método de PCA se obtuvo otro agrupamiento inter-específico entre *P. limbatum* y *P. nicorae* en coincidencia con lo propuesto por Zuloaga y Morrone (2005).

El análisis de los agrupamientos obtenidos y el grado de polimorfismo evidenciado demuestra que los marcadores EST-SSR generados en este trabajo resultaron adecuados para estudiar la diversidad de especies de *Paspalum* incluidas en este trabajo. Estos podrían ser asimismo una buena fuente de marcadores para su utilización en distintas especies de gramíneas relacionadas a *Paspalum* en las que hay pocos marcadores desarrollados. Los polimorfismos detectados fueron adecuados para evaluar relaciones genéticas entre genotipos dentro de cada especie, especies dentro de cada grupo y entre grupos. Si bien se utilizaron estos marcadores generados a partir de trigo que es una especie distantemente relacionada, su uso para establecer relaciones filogenéticas en *Paspalum* concuerda con las relaciones genéticas previamente conocidas de las especies estudiadas. Estos resultados confirman que este tipo de marcadores podría contribuir a la taxonomía de un grupo complejo de especies como lo constituye el género *Paspalum*.

VI CONCLUSIONES

V- CONCLUSIONES

El estudio realizado en este trabajo de tesis estuvo dedicado a la evaluación de la transferencia de marcadores de secuencia conocida (EST-SSR, SSR genómicos y COS) a *P. notatum* y otras especies del género. Se realizó un análisis y selección de marcadores distribuidos uniformemente por el genoma de arroz y se determinaron secuencias ortólogas a los mismos en el genoma de maíz mediante experimentos de mapeo *in silico*. Dichos marcadores fueron incorporados en los mapas de ligamiento genético de los genotipos Q4188 y Q4117 de *P. notatum* y se realizaron estudios de mapeo comparativo. Los marcadores desarrollados fueron asimismo ensayados en otras especies del género y evaluados para la realización de estudios filogenéticos en el género. Las principales conclusiones derivadas de los experimentos realizados y los resultados obtenidos pueden resumirse en:

1. Fue posible transferir marcadores EST-SSR de bases públicas a *Paspalum notatum* para la realización de estudios de mapeo genético, marcado de genes y análisis de variabilidad.

2. El 46,15 % de las secuencias de los marcadores EST-SSR amplificadas en *Paspalum* mostraron una similitud mayor a 60 % con los clones originales de trigo de los cuales derivan. Esta comprobación permitió identificar secuencias ortólogas entre ambas especies y sustentar la utilización de estos marcadores en estudios de mapeo comparativo.
3. Los marcadores transferidos mostraron un alto nivel de polimorfismo en *P. notatum* y evidenciaron la presencia de múltiples alelos en la población. Una gran proporción de los mismos segregó como alelos en dosis simples por lo cual fue posible su utilización en experimentos de ligamiento genético.
4. Todos los marcadores microsatélites genómicos específicos de la especie mostraron patrones de amplificación múltiples en los materiales analizados y fueron utilizados en experimentos de mapeo genético. Estos últimos experimentos permitieron asignar dichos marcadores a los mapas de ligamiento genéticos de Q4188 y Q4117.
5. Ciento diez marcadores (44 maternos y 66 paternos) nuevos fueron asignados a los mapas genéticos de los genotipos Q4188 y Q4117. Los marcadores EST-SSR se distribuyeron en 15 grupos de ligamientos de Q4188 y 27 de Q4117. Los SSR genómicos se localizaron en cinco y 15 grupos maternos y paternos, respectivamente.
6. Los marcadores incorporados permitieron la identificación de ocho y seis grupos de ligamientos nuevos en los mapas de Q4188 y Q4117, respectivamente. Este resultado aporta información sobre áreas genómicas que no habían sido cubiertas hasta el momento.
7. Marcadores EST-SSR pertenecientes a los cromosomas 2 y 12 de arroz (y 3, 5 y 8 de maíz) fueron localizados en grupos de ligamiento relacionados a la aposporia en *P. notatum*. Estos marcadores delimitaron un segmento cromosómico de alrededor 46 cM del cromosoma 12 de arroz que muestra un alto grado de conservación con el segmento cromosómico que contiene el *locus* responsable de aposporia en *P. notatum*. En especial los marcadores *ksum206pbd* y *ksum219pbd* delimitan los bordes genéticos de este segmento

y pueden utilizarse para la selección asistida por marcadores y la búsqueda de genes candidatos en base a la información disponible en especies modelo.

8. Los marcadores EST-SSR y SSR genómicos desarrollados en *Paspalum notatum* fueron ensayados exitosamente en otras especies del género pertenecientes a distintos grupos taxonómicos. Los estudios realizados permitieron la diferenciación entre grupos y especies así como estimar parámetros de variabilidad poblacional.
9. Los resultados obtenidos en el punto anterior demostraron la utilidad de los marcadores EST-SSR para la realización de estudios filogenéticos en el género.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn S, Anderson JA, Sorrells ME y Tanksley SD (1993) Homologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol Gen Genomics* 241: 483-490.

Ahn S y Tanksley SD (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7980-7984.

Aitman TJ, Hearne CM, McAleer MA, and Todd JA (1991) Mononucleotide repeats are an abundant source of length variants in mouse genomic DNA. *Mamm Genome* 1: 206-210.

Akiyama Y, Conner JA, Goel S, Morishige DT, Mullet JE, Hanna WW y Ozias-Akins P (2004) High resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of genomic region associated with apomixis. *Plant Physiol* 134: 1733-1741.

Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A (2005) SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixes in *Poa pratensis*. *Plant Physiol* 138: 218-299.

Ali S, Müller CR y Epplen JT (1986) DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum Genet* 74: 239-243.

- Alm V, Fang C, Busso CS, Devos KM, Vollan K, Grieg Z y Rognli OA (2003) A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. *Theor Appl Genet* 108: 25-40.
- Andersen JR y Lübberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends Plant Sci* 8: 554-560.
- Anderson JA, Oghiara Y, Sorrells ME y Tanksley SD (1992) Development of chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theor Appl Genet* 83: 1035-1043.
- Archibald JK, Mort, ME y Crawford DJ (2003) Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. *Taxon* 52: 187-191.
- Asker SE y Jerling L (1992) Apomixis in plants. Boca Raton, FL, Florida, CRC Press, USA.
- Avise JC (1994) Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Chapman & Hall, New York and London.
- Ayres NM, McClung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA y Park WD (1997) Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germoplasma. *Theor Appl Genet* 94: 773-781.
- Bachmann K (1997) Nuclear DNA markers in plant biosystematic research. *Opera Bot* 132: 137-148.
- Beckmann JS y Weber JL (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12: 627-631.
- Benko-Iseppon AM, Winter P, Hüttel B, Staginnus C, Muehlbauer FJ y Kahl G (2003) Molecular markers closely linked to Fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to patogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. *Theor Appl Genet* 107: 379-386.
- Bennetzen JL (2003) The genetic colinearity of rice and other cereals on basis of genome sequence analysis. *Curr Opin Plant Biol* 6: 128-133.

- Bennetzen JL, SanMiguel P, Chen M, Tikhonov A, Francki M, Avramova Z (1998) Grass genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1975–1978.
- Benson DA, Kirsch-Mizrachi I, Limpman DJ, Ostell J y Wheeler DL (2004) GeneBank: update. *Nucleic Acids Res* 32: D23-D26.
- Bert PF, Charmet G, Sourdille P, Hayward MD y Balfourier F (1999) A high density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne* L.) using AFLP markers. *Theor Appl Genet* 99: 445-452.
- Boivin K, Deu M, Rami JF, Trouche G y Hamon P (1999) Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 98: 320-328.
- Bonilla JR y Quarin CL (1997) Disporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Sci* 127: 97-104.
- Borstnik B y Pumpernik D (2002) Tandem repeats in protein coding regions of primate genes. *Genome Res* 12: 909-915.
- Botstein D, White RL, Skolnick M y Davis W (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Boutin SR, Young ND, Olson T, Yu ZH, Shoemaker RG y Vallejos C (1995) Genome conservation among three legume genera detected with DNA markers. *Genome* 38: 928-937.
- Breme K (1988) The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Brouat C, McKey D y Douzery JP (2004) Differentiation in a geographical mosaic of plants coevolving with ants: phylogeny of *Leonardoxa africana* complex (Fabaceae: Caesalpinioideae) using amplified fragments length polymorphism markers. *Mol Ecol* 13: 1157-1171.
- Brown LY y Brown SA (2004) Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet* 20: 51-58.

- Brown TA (2000) Mapping genomes by genetic techniques. Chapter 2. En: Genomes, Wiley & Son Inc. New York, USA
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertson MC y CW Stuber (1988) Gene Mapping with Recombinant Inbreds in Maize. *Genetics* 118: 519-526.
- Burrow GB, Jessup RW, Bowers JE, Schulze SR, Li Z, Wang YW, Burson BB; Hussey MA y Patterson AH (2001) Alignment of *Pennisetum ciliare* and sorghum bicolor chromosomes based on EST-enriched genetic maps. http://www.intl-pag.org/pag/9/abstracts/W25_03.html.
- Burson BL (1978) Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. *Can J Genet Cytol* 20: 365-372.
- Burson BL (1981) Cytogenetic relationships between *Paspalum jurgensii* and *P. intermedium*, *P. vaginatum*, and *P. setaceum* var. *ciliatifolium*. *Crop Sci* 21: 515-519.
- Burson BL (1983) Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. Proceedings of the 14th International Grassland Congress, Lexington, KY, 15-24 June 1981. Edited by J.A. Smith and V.W. Hays. Westview Press, Boulder, CO, pp 170-173.
- Burson BL (1991a) Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Bot Gaz (Chicago)* 152: 219-223.
- Burson BL (1991b) Homology of chromosomes of X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Genome* 34: 950-953.
- Burson BL y Bennett HW (1972) Cytogenetics of *Paspalum urvillei* X *P. jurgensii* and *P. urvillei* X *P. vaginatum* hybrids. *Crop Sci* 12: 105-108.
- Burson BL, Lee H y Bennett HW (1973) Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. *Crop Sci* 13: 739-743.
- Burson BL, Voigt PW y Evers CW (1991) Cytology, reproductive behavior, and forage potential of hexaploid dallisgrass biotypes. *Crop Sci* 31: 636-641.

- Burton GW (1940) A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. J Agric Res 60: 193-197.
- Burton GW (1943) Interspecific hybrids in the genus *Paspalum*. J Hered 34: 14-23.
- Burton GW (1967) A search for the origin of Pensacola Bahia Grass. Econ Bot 21: 379-382.
- Burton GW (1974) Recurrent restricted phenotypic selection increases forage yields of Pensacola Bahiagrass. Crop Sci 14: 831-835.
- Calderini O, Chang SB, de Jong H, Busti A, Paolocci F, Arcioni S, de Vries SC, Abma-Henkens MHC, Klein Lankhorst RM, Donnison IS y Pupilli F (2006) Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. Theor Appl Genet 112(6): 1179–1191.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC y Sutherland GR (1993). Incidence and origin of “null” alleles in the (CA)_n microsatellite markers. Am J Hum Genet 52: 922-927.
- Campbell CS, Alice LA y Wright WA (1999) Comparisons of within-population genetic variation in sexual and agamospermus *Amelanchier* (Rosaceae) using RAPD markers. Plant Syst Evol 215: 157-167.
- Caponio I y Quarin CL (1987) El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. Kurtziana 19: 35-45.
- Caponio I y Quarin CL (1990) Intra- and Interspecific Hybridization between Dallisgrass and Vaseygrass. Crop Sci 30: 362-364.
- Carman JG (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony (review). Biol J Linn Soc 61: 51-94.
- Causse M, Fulton TM, Chao YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, Mc Couch SR y Tanksley SD (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics 138: 1251-1274.

- Cervigni GDL, Paniego N, Diaz M, Selva JP, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Martelotto L, Felitti S, Pessino S, Spangenberg G and Echenique V (2008) Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Mol Biol* 67(1-2):11-10.
- Chase A (1929) North American species of *Paspalum*. *Contr US Natl Herb Vol* 28: Part 1.
- Chaudhury AM, Peacock JW (1993) Approaches toward isolating apomictic mutants in *Arabidopsis thaliana*: prospects and progress. In GS Kush, ed, *Apomixis: Exploiting hybrid vigour in rice*. International Rice Research Institute, Manila, The Philippines, pp 66-71.
- Chen X, Salamini F y Gebhardt C (2001) A potato molecular function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor Appl Genet* 102: 284-295.
- Cheng R, Kleinhofs A, Ukai Y (1998) Method for mapping a partial lethal-factor locus on a molecular-marker linkage map of a backcross and doubled-haploid population. *Theor Appl Genet* 97: 293-298
- Chittenden LM, Schertz KF, Lin YR, Wing RA y Paterson AH (1994) A detailed RFLP map of *Sorghum bicolor* x *S. propinquum* suitable for high density mapping suggests ancestral duplication of *Sorghum* chromosomes or chromosomal segments. *Theor Appl Genet* 87: 925-933.
- Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch SR, Park WD, Ayres N y Cartinhour S (2000) Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa*). *Theor Appl Genet* 100: 713-722.
- Cidade FW, de Souza-Chies TT, Batista LAR, Dallagnol M, Zucchi MI, Jungmann L y Souza AP (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae). *Conserv Genet* 10: 1977-1980.
- Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, et al. (2008) Sequence Analysis of Bacterial Artificial Chromosome Clones from the Apospory-Specific Genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant Physiol* 147: 1396-1411.

- Cordeiro GM, Casu R, McIntyre CL, Manners JM y Henry RJ (2001) Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. *Plant Sci* 160: 1115-1123.
- Cummings CJ y Zoghbi HY (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet* 9: 909-916.
- Da Silva JAG, Sorrells ME, Burnquist WL y Tanksley SD (1993) RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36: 782-791.
- Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L y Decroocq S (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106: 912-922.
- Denham SS (2005) Revisión sistemática del subgénero *Harpostachys* de *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). *Ann Missouri Bot Gard* 92: 463-532.
- Denham SS y Zuloaga FO (2007) Phylogenetic relationships of the “Decumbentes” group of *Paspalum*, *Thrasya* and *Thrasypopsis* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Aliso* 23: 545-562.
- Denham SS, Zuloaga FO y Morrone O (2002) Systematic revision and phylogeny of *Paspalum* subgenus *Ceresia* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Ann Mo Bot Gard* 89: 337-399.
- Devos KM y Gale MD (1997) Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol Biol* 35: 3-15.
- Devos KM y Gale MD (2000) Genome relationships: the grass model in current research. *Plant Cell* 12: 637-646.
- Devos K, Atkinson M, Chinoy C, Liu C y Gale MD (1992) RFLP-based genetic map of the homeologous group three chromosomes of wheat and rice. *Theor Appl Genet* 83: 931-939.
- Devos K, Millam T y Gale MD (1993) Comparative RFLP maps of homeologous group 2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor Appl Genet* 85: 784-792.

- Devos K, Moore G y MD Gale (1995) Conservation of marker synteny during evolution. *Euphytica* 85: 367-372.
- Devos, K.M., Z.M. Wang, J. Beales, I Sasaki, and M.D. Gale. 1998. Comparative genetic maps of foxtail millet (*Setaria italica*) and rice (*Oryza sativa*). *Theor Appl Genet* 96: 63-68.
- Dice LR (1945) Measure of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Döll JC (1877) Gramineae, pp1-358, in *Flora Brasiliensis* vol.2 pars. 2, edited by C. F. O. Martius, A.G. Eichler, München.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K y Mattick JS (1991) “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahra M y Nakayima K (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Sci* 51: 71-78.
- Edwards A, Civitello A, Hammond H y Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49: 746-754.
- Ender CG, Schweank K, Städler T, Streit B y Schierwater B (1996) RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Mol Ecol* 5: 437-441.
- Epplen JT, Kyas A y Mäueler W (1996) Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. *FEBS Lett* 389: 92-95.
- Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P y Powell W (2000) Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. *Theor Appl Genet* 100: 713– 722.
- Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P y Powell W (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for phenotyping the A and B genomes of wheat. *Theor Appl Genet* 104:399-407.

- Espinoza F, Urbani MH, Martínez EJ y Quarin CL (2001) The breeding system of three *Paspalum* species with forage potential. Trop Grasslands 35: 211–217.
- Espinoza F, Daurelio LE, Pessino SC, Valle EM y Quarin CL (2006) Genetic Characterization of *Paspalum notatum* accession by AFLP markers. Pl Sys Evol 258: 14-159.
- Farris JS, Albert VA, Källersjö M, Lipscomb D y Kluge AG (1996) A parsimony jackknifing outperforms neighbour joining. Cladistics 11: 99-124.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Felsenstein J (2004) Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Field D y Wills C (1996) Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. Proc R Soc London Ser B 263: 209-215.
- Foote T, Roberts M, Kurata N, Sasaki T y Moore G (1997) Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the Ph1 locus in wheat. Genetics 147: 801-807.
- Forbes I y Burton GW (1961) Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. Crop Sci 1: 402-406.
- Fulton TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT y Tanksley SD (2002) Identification, Analysis, and Utilization of Conserved Ortholog Set Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. Plant Cell 14: 1457–1467.
- Gale MD y Devos KM (1998) Plant comparative genetics after 10 years. Science 282: 656-659.
- Gallego F, Feuillet C, Messmer M, Penger A, Graner A, Yano M, Sasaki T y Keller B (1998) Comparative mapping of the two wheat leaf rust resistance loci Lr1 and Lr10 in rice and barley. Genome 41: 328-336.
- Garcia AAF, Kido EA, Meza AN, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, Da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A y Souza AP (2006) Development of an

- integrated genetic map of sugarcane (*Sacharum* spp.) commercial cross, based on a maximum likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theor Appl Genet* 112: 298-314.
- Gao LF, Jing RL, Huo NX, Li X, Li XP, Zhou RH, Chang XP, Tang JF, Ma ZY y Jia JZ (2004) One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor Appl Genet* 108: 1392-1400.
- Gates RN, Quarin CL y Pedreira CGS (2004) Bahiagrass. In Moser LE, Burson BL & Sollenberger LE (Eds.) *Warm-Season (C4) Grasses*. pp. 651-680. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Höfferer M, Hug M, Rusconi S y Schaffner W, (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 263: 808-811.
- Gilmour DS, Thomas GH y Elgin SCR (1989) *Drosophila* nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science* 245: 1487-1490.
- Giovanonni J, Wing R y Tanksley SD (1992) Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Res* 19: 6553-6558.
- Giussani LM, Zuloaga FO, Quarin CL, Cota-Sánchez H, Ubayasena K, Morrone O (2009). Phylogenetic relationships in genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): an assessment of the *Quadrifaria* and *Virgata* informal groups. *Syst Bot* 34: 32-43.
- Graner A, E Bauer, A Kellermann, S Kirchner, JK Muraya, A Jahoor y G Wenzel (1994) Progress of RFLP map construction in winter barley. *Genet Newsl* 23: 53-61.
- Granok H, Leibovitch BA, Shaffer CD, and Elgin SCR (1995) Ga-ga over GAGA factor. *Curr Biol* 5: 238-241.

- Grant D, Cregan P y Shoemaker RC (2000) Genome organization in dicots: genome duplication in *Arabidopsis* and sinteny between soybean and *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 4168-4173.
- Green P (1999) SWAT/Crossmatch/PHRAP Packaged, University of Washington. URL: <http://www.phrap.org>.
- Grimanelli D, García M, Kaszas E, Perotti E y Leblanc O (2003) Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. Genetics 165: 1521-1531.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E y Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. Trends Genet 17: 597-604.
- Grossniklaus U, Nogler GA y van Dijk PJ (2001) How to avoid sex: The genetic control of gametophytic apomixis. Plant Cell: 1491-1497.
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J y Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theor Appl Genet 89: 998-1006.
- Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kurmar N y Balyan HS (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Mol Genet Genomics 270: 315-323.
- Gur-Arie R, Cohen CJ, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM y Kashi Y (2000) Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundante, distribution, composition, and polymorphism. Genome Res 10: 62-71.
- Hackauf B y Wehling P (2002) Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. Plant Breed 121: 17-25.
- Haldane, JBS (1919) The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. J Genetics 8: 299-309.

- Hale ML, Borland AM, Gustafsson MHG y Wolff K (2002) Causes of size homoplasy among chloroplast microsatellites in closely related *Clusia* species. *J Mol Evol* 58: 182-190.
- Hall, B.G. (2001) *Phylogenetic Trees Made Easy*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hanna WW y Bashaw EC (1987) Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Sci* 27: 1136-1139.
- Harlan JR, Brooks MH, Borgaonkar DS y deWet JMJ (1964) Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Bot Gaz* 125: 41- 46.
- Hauge XY y Litt M (1993) A study of the origin of “shadow bands” seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by PCR. *Hum Mol Genet* 2: 411- 415.
- Hein JJ (1990) “Unified approach to alignment and phylogenies” In *Methods in Enzymology* 183: 626-645.
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaeffer A y Nienhuis J (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 72: 761-769.
- Herron BJ, Silva GH y Flaherty L (1998) Putative assignment of ESTs to the genetic map by use of the SSLP database. *Mamm Genome* 9: 1072-1074.
- Holton TA, Christopher JT, McClure L, Harker N y Henry RJ (2002) Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Mol Breeding* 9: 63-71.
- Hojsgaard DH, Martínez EJ , Acuña C, Quarín CL y Pupilli F (2011) A molecular map of the apomixis-control locus in *Paspalum procurrens* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122-011-1639-z
- Horn GT, Richards B y Klinger KW (1989) Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 2140.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R y Bollback JP (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.

- Huelsenbeck JP y Crandall KA (1997) Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu Rev Ecol Syst* 28: 437-466.
- Hulbert SH, Richter TE, Axtell JD y Bennetzen JL (1990) Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4251-4255.
- Ishibashi Y, Saitoh T, Abe S y Yoshida MC (1996) Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus*. *Mol Ecol* 5: 589-590.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44: 223-270.
- Jaiswal P (2011) Gramene data base: A hub for comparative plant genomics. *Methods Mol Biol* 678: 247-275.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R y Keyte J (1988) Amplification of human minisatellites by the polimerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 16: 10053-10971.
- Jones AG, Stockwell CA, Walker D y Avise JC (1998) The molecular basis of a microsatellite null allele from the White sands pupfish. *J Hered* 89: 339-342.
- Jurka J y Pethiyagoda C (1995) Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *J Mol Evol* 40: 120-126.
- Kantama L, Sharbel TF, Schranz ME, Mitchell-Olds T, de Vries S y de Jong H (2007) Diploid apomicts of the *Boechera holboellii* complex display large-scale chromosome substitutions and aberrant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 104: 14026-14031.
- Kantety RV, Rota ML, Matthews DE y Sorrells ME (2002) Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol Biol* 48: 501-510.
- Kijas JMH, Thomas MR, Fowler JCS y Roose ML (1997) Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theor Appl Genet* 94:701-706.

- Kilian A, Chen J, Han F, Steffenson B y Kleinhofs A (1997) Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance gene Rpg1 and rpg4 using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol Biol* 35: 187-195
- Killeen TJ (1990) The grasses of Chiquitanía, Santa Cruz, Bolivia. *Ann Missouri Bot Gard* 77: 125–201.
- Koltunow AM (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow AM, Bicknell RA y Chaudhury AM (1995) Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilisation. *Plant Physiol* 108: 1345-1352.
- Koltunow AM y Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54: 547-574
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.
- Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, Harushima Y, Sue N, Wu J, Antonio BA, Shomura A, Shimizu T, Lin SY, Inoue T, Fukuda A, Shimano T, Kuboky Y, Toyam T, Miyamoto Y, Kirihara T, Hayasaka K, Miyao A, Monna L, Zhonh HS, Tamura Y, Wang ZX, Momma T, Umehara Y, Yano M, Sasaki T y Minobe Y (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nat Genet* 8: 367-372.
- Lacadena JR (1988) Capítulo XV: Variaciones cromosómicas numéricas: poliploidía. En *Genética*. 4º Edición. Agesa. Madrid.
- La Rota CM (2000) EST clustering for database simplification and candidate gene discovery in rice. M.S. Thesis, Cornell University, New York.
- La Rota M y Sorrells ME (2004) Comparative DNA sequence analysis of mapped wheat ESTs reveals the complexity of genome relationships between rice and wheat. *Funct Integr Genomics* 4: 34-46.
- Lakshmanan KK y Ambegaokar KB (1984) Polyembryony. En: Johri BM(Ed.), *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin 445–474.

- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE y Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lee D, Grant D, Vallejos CE y Shoemaker RC (2001) Genome organization in dicots. II. *Arabidopsis* as a “bridging species” to resolve genome evolution events among legumes. *Theor Appl Genet* 103: 765-773.
- Lee Y, Tsai J, Sunkara S, Karamycheva S, Pertea G, Sultana R, Antonescu V, Chan A, Cheung F y Quackenbush J (2005) The TIGR Gene Indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 33: D71–D74.
- Li YC, Korol A, Fahima T y Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 21: 991-1007.
- Liang et al. (2007) Gramene: a growing plant comparative genomics resource. *Nucleic Acids Res* 36: D947–D953.
- Litt M y Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397-401.
- Liu S y Anderson JA (2003) Targeted molecular mapping of major wheat QTL for *Fusarium* head Blight resistance using wheat ESTs and synteny with rice. *Genome* 46: 817-823.
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R y Jahn MK (1999) Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in Solanaceae. *Genetics* 152: 1183-1202.
- Marino CL, Nelson JC, Lu YH, Sorrells ME y Leroy P (1996) Molecular genetic maps of the Group 6 chromosome of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell). *Genome* 39: 359-366.
- Martinez HM (1983) An efficient method for finding repeats in molecular sequences. *Nucleic Acids Res* 11: 4629-4634.

- Martínez EJ, Hopp E, Stein J, Ortiz JPA y Quarín CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Mol Breeding* 12 (4): 319-327.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL y Ortiz JPA (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Mc Couch Sr, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR y Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76: 815-829.
- Menancio-Hautea D, Fatokun G, Kumer L, Danesh D y Young N (1993) Comparative genome analysis of mungbean (*Vigna radiata* L. *Witzcek*) and cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walpers) using RFLP mapping data. *Theor Appl Genet* 48: 797-810.
- Mian MAR, Saha MC, Hopkins AA y Wang ZY (2005) Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses. *Genome* 48: 637-647.
- Michelmore RW, Paran I y Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- Miller RT, Christoffels AG, Gopalakrishnan C, Burke J, Ptitsyn AA, Broveak TR y Hide WA (1999) A comprehensive approach to clustering of expressed human gene sequence: the sequence tag alignment and consensus knowledge base. *Genome Res*: 9: 1143-1155
- Millot JC (1977) Sexuality em *Paspalum dilatatum* Poir ssp. *Dilatatum* Roseng. Joint seminar and Workshops aspects of the chromosome organization and function. III Latin-American congress of Genetics. Montevideo, Uruguay. pp 252.
- Missaoui AM, Paterson AH y Bouton JH (2005) Investigation of genomic organization in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using DNA markers. *Theor Appl Genet* 110: 1372-1383.

- Moore G (2000) Cereal chromosome structure, evolution and pairing. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 195-222.
- Moore G, Devos KM, Wang Z y Gale MD (1995) Grasses, line up and form a circle. *Curr Opin Genet Dev* 51: 737-739.
- Morgante M y Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3: 175-182.
- Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 20: 277-318.
- Mullis KB, Ferré F y Gibbs RA, Eds (1994) *The Polymerase Chain reaction*. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- Naumova T (1992) *Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1931 USA
- Naumova TN, Hayward MD y Wagenvoort M (1999) Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sex Plant Reprod* 12: 43-52.
- Needleman SB y Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarity in the amino acid sequence at two proteins. *J Mol Biol* 48: 443-453.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 76: 379-330.
- Nelson, JC, Van Deynze AE, Autrique E, Sorrells ME, Lu YH, Merlino M, Atkinson M y LeRoy P (1995a) Molecular mapping of wheat: homeologous Group 2. *Genome* 38: 516-524.
- Nelson, JC, Van Deynze AE, Autrique E, Sorrells ME, Lu YH, Negre S, Bernard M y LeRoy P (1995b) Molecular mapping of wheat: homeologous Group 3. *Genome* 38: 525-533.
- Nelson JC, Sorrells ME, Van Deynze AE, Autrique E, Lu YH, Atkinson M, Bernard M, LeRoy P, Faris JD y Anderson JA (1995c) Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homeogous groups 4,5 and 7. *Genetics* 141: 721-731.

- Nogler GA (1984) Gametophytic apomixis. En: Johri BM (ed). Embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, pp. 475-518.
- Norrmann GA, Quarin CL y Burson BL (1989) Cytogenetics and reproductive behaviour of different chromosomes races in six *Paspalum* species. J Hered 80:24-28.
- Oliveira RC y Valls JFM (2002) Taxonomia de *Paspalum* L., grupo Linearia (Gramineae-Paniceae) do Brasil. Rev Bras Bot 25: 371-389.
- Oliveira RC (2004) Estudo taxonômico das espécies de *Paspalum* L., grupo *Plicatula* (Poaceae-Panicoidae-Paniceae) no Brasil. PhD tesis, Universidad de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
- Olson M, Hood L, Cantor C & Dotstein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. Science 245:1434-1435.
- Orgel LE y Crick FHC (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 284: 604-607.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K y Sekira T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci 86: 2766-2770.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD y CL Quarin (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. Theor Appl Genet 95: 850-856.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Bhat V, Hayward MD y Quarin CL (2001) A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. Crop Sci 41: 823-830.
- Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Thibaud-Nissen F, Malek RL, Lee Y, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J y Buell CR (2007) The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. Nucleic Acids Res 35:D883-D887.
- Ozias-Akins P y van Dijk PJ (2007) Mendelian genetics of apomixis in plants. Annu Rev Genet 41:509-537.

- Paetkau D y Strobeck C (1995) The molecular basis and evolutionary history of microsatellite null allele in bears. *Mol Ecol* 4: 519-520.
- Page RDM y Holmes EC (1998) *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.
- Paterson AH, Bowers JE, Burow MD, Draye X, Elvik CG, Jialg CX, Katsar CS, Lan TH, Lin YR, Ming R y Wright RJ (2000) Comparative genomics of plant chromosomes. *Plant Cell* 12: 1523-1540.
- Peakall R y Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pelgas B, Isabel N y Bousquet J (2004) Efficient screening for expressed sequence tag polymorphisms (ESTPs) by DNA pool sequencing and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in spruces *Mol Breeding* 13: 263-279.
- Pemberton JM, Slate J, Bamcroft DR y Barrett JA (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Eco* 4: 249-252.
- Pilger RFK (1941) Graminae, Panicoidae. En: Engler A, Prantl KAE (eds) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, vol 14e: 2nd edn. W. Engelmann, Leipzig, pp 1-208.
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia E, Falistocco E y Falcinelli M (2002) Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor Appl Genet* 104: 273-280.
- Powell W, Machray GC y Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1: 215-222.
- Pozzobon MT y Valls JFM (1997) Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Braz J Genetics* 20: 29.34.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL y Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol Gen Genomics* 270: 539-548.

- Pupilli F y Barcaccia G (2011) Cloning plants by seeds: Inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *J Biotechnol* (in press).
- Qu L y Hancock JF (2001) Detecting and mapping repulsion-phase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theor Appl Genet* 103: 136-143.
- Quackenbush J y Liang F (2000) The TIGR Gene Indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. *Nucl Acids Res* 28: 141-145.
- Quarin CL (1986) Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid and tetraploid plants of *Paspalum cromyrrhizon*. *Euphytica* 35:515–522.
- Quarin CL (1992) The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Quarin CL (1999) Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 11 (6): 331- 335.
- Quarin CL y Burson BL (1991) Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 56: 223-228.
- Quarin CL, Burson BL y Burton GW (1984) Cytology of intra and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. Cromyorrhizon*. *Bot Gaz* 145: 420-426.
- Quarin CL y Lombardo EP (1986) Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7: 101-107.
- Quarin CL y Norrmann GA (1987) Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. En: *Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica*, Bogotá, Colombia 3:25-35.
- Quarin CL, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC y Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13: 243-249.

- Quarin CL, Urbani MH, Blount AR, Martínez EJ, Hack CM, Burton GW y Quesenberry KH (2003) Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Sci* 43: 745-746.
- Rafalski A (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* 5: 94-100.
- Ramser J, Weising K, Lopez-Peralta C, Terhalle W, Terauchi R y Kahl G (1997) Molecular marker-based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* – *D. cayenensis*). *Genome* 40: 903-915.
- Rayapati PJ, Gregory JW, Lee M y Wise RP (1995) A linkage map of diploid oat *Avena* based on RFLP loci and locus conferring resistance to *Puccinia coronata* var. *avenae*. *Theor Appl Genet* 89:831-835.
- Rebozzio RN, Rodríguez MP, Stein J, Quarin CL, Ortiz JPA y Espinoza F (2010) Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flügge. *Mol Breeding* DOI 10.1007/s11032-010-9537-7.
- Ribaut JM y Hoisington D (1998) Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3: 236-239.
- Ritter E, Gebhardt C y Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of linkage maps from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125:645–54.
- Roche D, Chen Z, Hanna WW y Ozias-Akins P (2001) Non-mendelian transmission of an apospory-specific genomic region in a reciprocal cross between sexual pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and an apomictic F1 (*P. glaucum* x *P. squamulatum*). *Sex Plant Reprod* 13: 217-223.
- Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD y Ganai MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246: 327-333.
- Röder MS, Korzun V, Wandehake K, Planschke J, Tixier MH, Leroy P y Ganai MW (1998) A microsatellite map wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.

- Podio M, Rodríguez MP, Felittin S, Stein J, Martínez EJ, Siena LA, Quarín CL, Pessino SC y Ortiz JPA (2012) Sequence characterization, *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. Enviado para su publicación.
- Rodríguez MP, Cervigni GDL, Quarín CL y Ortiz JPA (2012) Frequencies and variation in cytosine methylation patterns in diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum notatum*. Biol Plantarum 56 (2): 276-282.
- Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0 - Exeter Software, Setauket, New York.
- Rosenberg O (1908) Cytological studies on the apogamy in *Hieracium*. Bot Tidsskr 28: 143-170.
- Rosenberg O (1930) Apogamie und Parthenogenesis bei Pflanzen. En: Baur E, Hartmann M (eds.) Handbuch Vererbungswiss II (12). Borntraeger, Berlin.
- Rossetto M, Kooyman R, Sherwin W y Jones R (2008) Dispersal limitation, rather than bottlenecks or habitat specificity, can restrict the distribution of rare and endangered rainforest trees. Am J Bot 95: 321-329.
- Rúa GH y Aliscioni SS (2002) A morphology-based cladistic analysis of *Paspalum* sect. *Pectinata* (Poaceae). Syst Bot 27: 489-501.
- Rúa GH, Speranza PR, Arakaki M y Vaio M (2007) Filogenia del género *Paspalum* (Poaceae, Panicoidae): Análisis preliminares de secuencias de 4 fragmentos del cpDNA. Darwiniana 45: 120-121.
- Rúa GH, Speranza PR, Vaio M y Arakaki M (2010) A phylogenetic analysis of genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. Plant Syst Evol 288:227-243.
- Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoor A y Powell W (1997) Direct comparación of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theor Appl Genet 95: 714-722.
- Saghai-Marouf MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q y Allard RW (1984) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity,

- chromosomal locations, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5466-5470.
- Saha MC, Mian R, Zwonitzer JC, Chekhovskiy K y Hopkins AA (2005) An SSR and AFLP based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Theor Appl Genet 110(2): 323-336.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB y Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
- Saitou N y Nei M (1987) The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.
- Salse J, Piégu B, Cooke y Delseny M (2003) New *in silico* insight into the synteny between rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) highlights reshuffling and identifies new duplications in the rice genome. Plant Journal 38: 396-409.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki T, Billet E, Petronis A, Ying D, Parsons T, Macciardi FM, Meltzer HY, Lieberman J, Joffe RT, Ross CA, Micinnis MG, Li SH y Kennedy JL (1996) Psychosis and genes with trinucleotide repeat polymorphism. Hum Genet 97: 244-246.
- Savidan Y (2000) Apomixis: Genetics and breeding. Plant Breeding Reviews 18: 13-86.
- Sax K (1923) The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics 8: 552-560.
- Scataglini MA, Giussani LM, Denham SS, Zuloaga FO y Morrone O (2007). Una aproximación a la filigenia de *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) utilizando tres marcadores de ADN de cloroplasto. Darwiniana 45: 124-125.
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells component to form embryos. Development 124: 2049-2062.

- Schuler GD y Boguski MS (1996) A gene map of the human genome. *Science* 274(5287): 540-546.
- Scott KD, Eggler P, Seaton G, Rossetto M, Ablett EM, Lee LS y Henry RJ (2000) Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor Appl Genet* 100: 723-726.
- Scotti I, Magni F, Paglia GP y Morgante M (2002) Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theor Appl Genet* 106: 40-50.
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27: 379-423, 623-656.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kumlehn J, Vogel H y Rotter B (2009) Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant J* 58(2089): 870–882.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Galla G, Kumlehn J, Klukas C, Schreiber F, Vogel H y Rotter B (2010) Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. *Plant Cell* 22(2092): 655–671.
- Sherwin WB, Jobot F, Rush R y Rossetto M (2006) Measurement of biological information with applications from genes to landscapes. *Mol Ecol* 15: 2857-2869.
- Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarín CL y Ortiz JPA (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.
- Smeets HJM, Brunner HG, Ropers HH y Wieringa B (1989) Use of variable simple sequence motif as genetic markers: application to study of myotonic dystrophy. *Hum Genet* 93: 245-251.
- Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P y Vosman B (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet* 94: 264-272.

- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. - W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Song QJ, Fickus EW y Cregan PB (2002) Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theor Appl Genet* 104: 286-293.
- Sorrells ME (2000a) The evolution of comparative plants genetics. En: JP Gustafson (Ed.) Genomes. Proceedings 22nd Stadler Symposium (6-8 June 1998, Columbia, MO), Kluwer Academic Publishers, Boston MA.
- Sorrells ME (2000b) Comparative genomics for tef improvement. En: H. Tefera (Ed.) Proceedings of the International Workshop for tef Improvement (13-16 October 2000, Addis Ababa, Ethiopia).
- Sorrells ME, Sorrells ME, La Rota M, Bermudez-Kandianis CE, Greene RA, Kantety R, Munkvold JD, Miftahudin, Mahmoud A, Xuefeng Ma, Gustafson PJ, Qi LL, Echaliier B, Gill BS, Matthews DE, Lazo GR, Chao S, Anderson OD, Edwards H, Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Akhunov ED, Dvorak J, Zhang D, Nguyen HT, Peng J, Lapitan NLV, Gonzalez-Hernandez JL, Anderson JA, Hossain K, Kalavacharla V, Kianian SF, Choi DW, Close TJ, Dilbirligi M, Gill KS, Steber C, Walker-Simmons MK, Maguire PE y Qualset CO (2003) Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Res* 13: 1817-1827.
- Sourdille P, Tavaud M, Charmet G y Bernard M (2001) Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B y D genomes. *Theor Appl Genet* 103: 346-352.
- Souza-Chies TT, Essi L, Rúa GH, Valls JFM y Miz R (2006) A preliminary approach to phylogeny of genus *Paspalum* (Poaceae). *Genetica* 126: 15-32.
- Stam P (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J* 3: 739-744.
- Stein J (2006) Estudios de localización y herencia de genes relacionados con la apomixis en razas tetraploides de *Paspalum notatum*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, pp. 196.

- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena L, Quarin CL y Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breeding* 20: 153-166.
- Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC y Ortiz JPAO (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet* 109: 186-191.
- Sturtevant AH (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by mode of association. *J Exp Zool* 14: 43-59.
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ y Hills DM (1996) Phylogenetic inference. In *Molecular Systematics*, 2nd Edition, Hills DM, Mortiz C y Mable BK, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 407-514.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince MW, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W y Young ND (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471.
- Taylor C, Madsen K, Borg S, Moller MG, Boelt B y Holm PB (2001) The development of sequence-tagged sites (STSs) in *Lolium perenne* L.: the application of primer sets derived from other genera. *Theor Appl Genet* 103: 648-658.
- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S y McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellite in rice (*Oryza sativa*): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potencial. *Genome Res* 11: 1441-1452.
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T y McCouch SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellites in rice (*Oryza sativa*). *Theor Appl Genet* 100: 690-712.

- Tessier C, David J, This DP, Boursiquot JM, Charrier A (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification *Vitis vinifera* L. Theor Appl Genet 98: 171-177.
- Thiel T, Michalek W, Varshney RK y Graner A (2003) Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl Genet 106: 411-422.
- Tischler CR y Burson BL (1995) Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. Euphytica 84: 229-235.
- Toth G, Gasparin Z y Jurka J (2000) Microsatellites in different eucaryotic genomes: Survey and analysis. Genomes Res 10: 967-981.
- Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L y Verbrugh H (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiol Mol Biol Rev 62: 275-293.
- Van der Hoeven R, Ronning C y Tanksley SD (2002) Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. Plant Cell 14: 1441-1456
- Van Deynze AE, Dubcovsky J, Gill KS, Nelson JC, Sorrells MD, Dvorak J, Gill BS, Lagudah ES, Mc Couch SR y Appels R (1995) Molecular genetic maps for chromosome 1 in Triticeae species and their relation to chromosomes in rice and oats. Genome 38: 45-59.
- Van Deynze AE, Sorrells ME, Park WD, Ayres NM, Fu H, Cartinhour SW, Paul E y McCouch SR (1998) Anchor probes for comparative mapping of grass genera. Theor Appl Genet 97:356-369.
- Van Ooijen JW y Voorrips RE (2001) JoinMap3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Valls JFM (2000) Impacto do conhecimento citogenético na taxonomia de *Paspalum* e *Axonopus* (Gramineae), pp. 57-60, in Tópicos Atuais em Botânica: Palestras Convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica. Org. Taciana Barbosa

- Cavalcanti et al. – Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil.
- Varshney RK, Graner A y Sorrells ME (2005a) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23: 48-54.
- Varshney RK, Sigmund R, Börner A, Korzun V, Stein N, Sorrells ME, Langridge P y Graner A (2005) Interespecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Sci* 168: 195-202.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Kuiper M y Zabeau M (1995) AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Wang ZM, Devos KM, Liu CJ, Wang RQ y Gale MD (1998) Construction of RFLP based maps of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. *Theor Appl Genet* 96: 31-36.
- Wang ML, Chen ZB, Barkley NA, Newman ML, Kim W, Raymer P y Pederson GA (2006) Characterization of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz) germoplasm by transferred SSRs from wheat, maize and sorghum. *Genet Resour Crop Ev* 53: 779-791.
- Ware D, Jaiswal P, Ni J, Pan X, Chang K, Clark K, Teytelman L, Schmidt S, Zhao W, Cartinhour S, WcCouch S y Stein L (2002) Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucle Acids Res* 30: 103-105.
- Warmke HE (1954) Apomixis in *Panicum maximum*. *Am J Bot* 41: 5-11.
- Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n x (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- Weber JL y May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-396.

- Weising K, Winter P, Hüttel B y Kahl G (1998) Microsatellite markers for molecular breeding. *J Crop Prod* 1: 113-143.
- Weising K, Nybom H, Wolff K y Kahl G (2005). En: *DNA Fingerprinting in Plants. Principle, Methods, and Applications. Second Edition.* Taylor & Francis, Boca Raton, London. pp 444.
- Welsh J y McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 18: 7213-7218.
- Westman AL y Kresovich S (1998) The potencial for cross-taxa simple-sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop brassicas. *Theor Appl Genet* 96: 272- 281.
- White GW y Powell W (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Mol Ecol* 6: 851-860.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA y Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535.
- Wilson WA, Harrington SE, Woodman WL, Lee M, Sorrells ME y McCouch SR (1999) Interferences on the genome structure of progenitor maize through comparative analysis of rice, maize and the domesticated Panicoids. *Genetics* 153: 453-473.
- Winzer N, Di Renzo M, Olmos S y Ibañez M (2010) Métodos multivariados para estimar variabilidad genética. En: Levitus L, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E y Mroginski L (Eds.) *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II.* Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. pp 648.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH y Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor Appl Genet* 83: 294-300.
- Young ET, Sloan JS y Van Riper K (2000) Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154: 1053-1068.

- Young ND (1994) Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. En: DNA Based markers in Plants. Edited by RL Phillips and IK Vasil. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Yu J-K, Dake TM, Singh S, Benscher D, Li W, Gill B y Sorrells ME (2004a) Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. *Genome* 47: 805-818.
- Yu J-K, La Rota M, Kantety RV y Sorrells ME (2004b) EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Mol Gen Genomics* 271: 742 -51.
- Zuloaga FO y Morrone O (2001) Flora Fanerogamica Argentina. Fasc. 71. 19. Poaceae, parte 4. Tribu 18. Paniceae, parte B. 21. *Paspalum*. ProFlora Conicet, Córdoba.
- Zuloaga F y Morrone O (2005) Revisión de las especies de *Paspalum* para América del sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monographs Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, Missouri, USA. Vol 102 pp 297.
- Zuloaga FO, Pensiero J y Morrone O (2004) Systematic of *Paspalum* group Notata (Poaceae-Panicoideae-Paniceae). *Syst Bot Monogr* 71: 1-75.

VIII ANEXOS

Significado de términos utilizados en los análisis mapeo

Alineamiento: es la identificación de correspondencias residuo-residuo. Cualquier asignación de correspondencia que preserve el orden de los residuos es un alineamiento.

BLAST: Algoritmo que se utiliza habitualmente para comparar una secuencia dada contra toda una base de datos de millones de secuencias. Producen alineamientos locales entre cada pareja de secuencias. Además generan un valor de significación estadística para cada alineamiento.

E-value: Es el número esperado de obtener secuencias al azar cuando se busca en una base de datos de un tamaño particular. Este disminuye cuando el score del match se incrementa. es el número de alineamientos que esperamos para una puntuación (score) X (o superior) en la búsqueda que estamos realizando si la base de datos fuese una colección de letras al azar.

Homología: Similitud de la secuencia de una proteína o un ácido nucleico, o en la estructura de un órgano, que refleja un origen evolutivo común. Las moléculas o secuencias que exhiben homología se denominan homólogos. En contraste, la analogía es una similitud en estructura o función que no refleja un origen evolutivo común.

LOD score: logaritmo en base diez del cociente entre la probabilidad de que dos *loci* estén ligados para un dado valor de recombinación, sobre la probabilidad de que ambos *loci* no estén ligados y hallan co-segregado por azar.

Porcentaje de Identidad: Es una medida de cuan iguales son dos secuencias.

Ortólogo: Se llama así a genes homólogos localizados en el genoma de diferentes organismos. Dos secuencias son ortólogas si fueron adquiridas por descendencia vertical (ej; de madre a hijo)

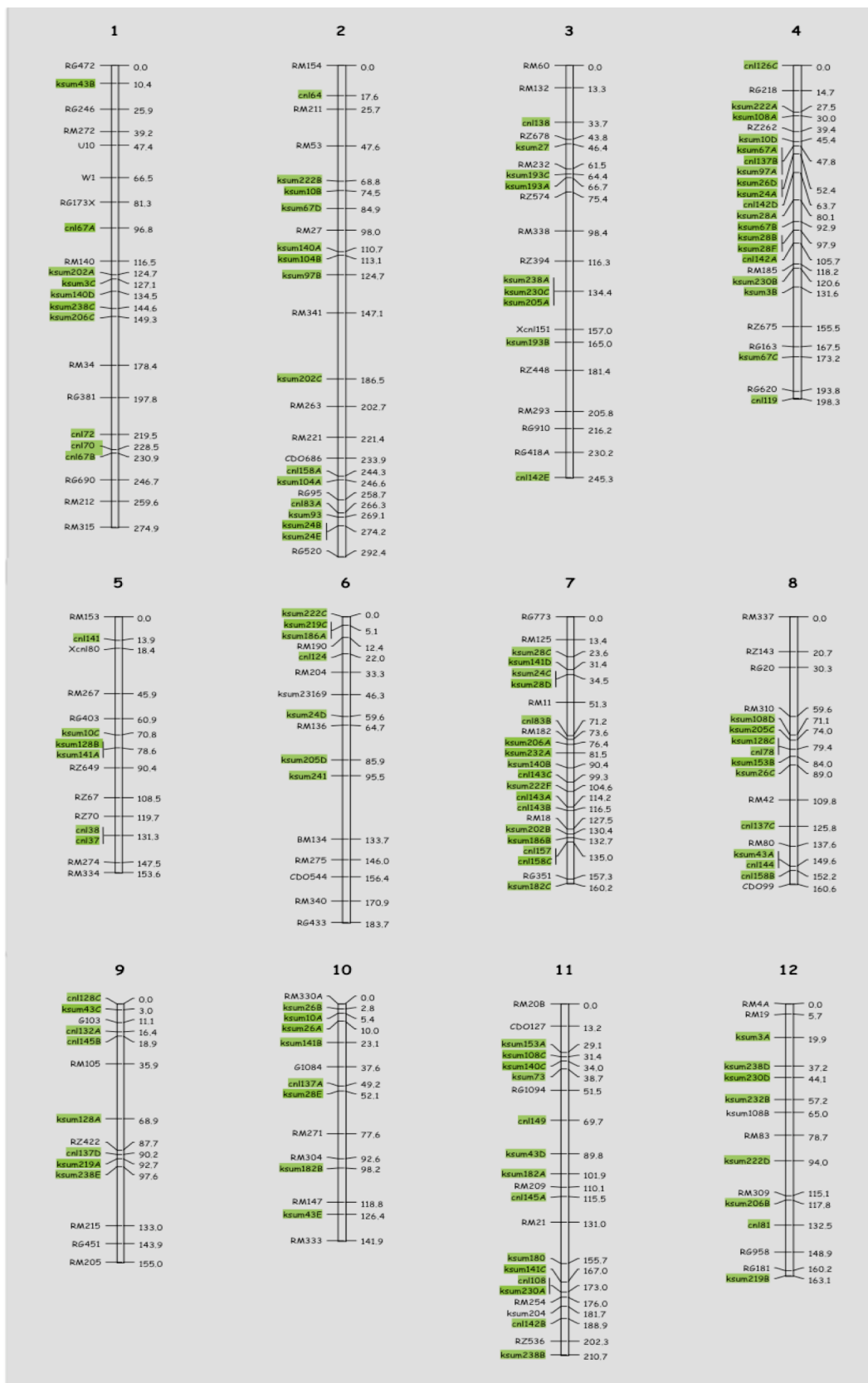
Parálogo: Se dice de dos o más genes homólogos localizados en el mismo genoma. Dos secuencias son parálogas si tuvieron el mismo origen y tienen diferentes copias en un mismo organismo.

Score: Es una función que confiere un valor a un alineamiento determinado. (Match= +1, Mismatch= -1, y Espacio= -2 (sumatoria)).

Similitud: es la observación o medición del parecido y diferencia, independiente del origen del parecido.

Sintenia: Termino que se refiere a un par de genomas en los que por lo menos algunos de los genes están localizados en posiciones similares del mapa.

Figura 1: Mapa de arroz con los marcadores EST-SSR desarrollados por Yu et. al (2004a)



Los marcadores de EST-SSR seleccionados para su transferencia a *P. notatum* están recuadrados en verde. Obtenido del sitio: <http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR>.

Tabla I A: Características de los cebadores EST-SSR de trigo de la serie *cnl* para su amplificación en *Paspalum notatum*.

Marcador	pb ¹	“forward” (directo)	“reverse” (inverso)	Arroz ²	EST ³	BLASTX ⁴
Cnl37	183	CTGCCTCGCGTGAAAGATA	CCTCCTCGATCTGGATGGT	5	AU162529	Thiorredoxin H (Triticum aestivum, AJ009762)
Cnl38+	166	CCTGCTCGCGTGAAAGATA	CCTCCTCGATCTGGATGGT	5	BE401727	Thiorredoxin H (Triticum aestivum, AJ009762)
Cnl64*	254	AATCAACAACAACGCCACAC	CATCAGCCAGAACAAGCTCA	2	BE423103	phenylalanine ammonia-lyase (Hordeum vulgare, Z49146)
Cnl67+	369	AACACCGGCAACGTGTTTCGC	CATCCTCACTTCAATTCCTC	1	BE418272	ns
Cnl70	200	CCGGCCCGAGGAAAAGCT	GGCCGAAGAGGCGGTAGATCTT	1	BE427200	ns
Cnl72+	200	GCTTGGGTGATTTCTTGGAA	GGCCGAAGAGGCGGTAGATCTT	1	C72018	ns
Cnl78	280	GCAAGTGGGCGCTCTCCT	GTCCATGAGCCTGGACACCTC	8	BE498173	heat shock proteína 90 (Oryza sativa, AB037681)
Cnl81*	267	ACTCCTCCTCCTGCTTGC	ATCAGAAGCAGGCGTGCAG	12	AU032107	ns
Cnl83	273	ATCGACGGCACGATCAAG	GGTGGCAGTGGAAAGTGCTAT	2-7	AU094265	ns
Cnl108	206	GAGGAGGAGAGCGGATTCT	CTCCATCGTTTCCCAAGC	11	D25120	ns
Cnl119*	474	ATCGTCTCCTCCTCCTCCA	ATGCCTCGGTGGACTGGTA	4	AF039532	harpin induced gene 1 homolog (Hin 1) (Oryza sativa, AF039532)
Cnl124+	219	TCGTTGTTCTTGGTTGGTTG	GGTTGATGTTGGCCTTCG	6	BE423646	early nodulin (Oryza sativa, AF140229)
Cnl126*	150	CTACGGCATCAGGAAGCTC	GTCTCTGTGCTTACCACCA	4	AU069138	ns
Cnl128	125	CACAAGTTCGAGTACTCCATC	TGCAATGTAGGTGAGCTTCG	9	BE039231	ns
Cnl132*	281	GCAGCAACAACAACCAGTTC	TTGCAGGAACACCTTGCAT	9	BE606854	ns
Cnl137+	194	GAGTCAATCCGTGCTATCATCT	TGTTGTTGTTGAGGTTGTTGC	8-9-10	BF293322	low-molecular-weight glutenin (Triticum durum, P16315)
Cnl138+	191	ACAACCGCAAAACACAGCAT	GCTGCAATACTTGTGAGCTTTC	3	BE605177	ns
Cnl141*	341	ATTAACATGCGGTGTTGCAT	GAGTGGAGGTGGAGGATGAG	5	BE060826	myd4 transcription factor (Hordeum vulgare, X99973)
Cnl142*	218	AATTCGGCACCAGCTCCT	CTGGAAGTCGAGGTTGAGGT	3-4-11	BE414104	cytosolic-60S ribosomal protein L9 (Arabidopsis thaliana, X91958)
Cnl143*	129	AAGAAAGCCGCGCAGAAG	AAGTTAAGGGCCGCTATGC	7	BE517078	ABC transporter homolog (Populus nigra, AB041505)
Cnl144*	240	AGAAGGCGGCTCAGAAGAAG	GCTCCAACCTCAGAATCAACAA	8	AU070020	ABC transporter homolog (Populus nigra, AB041505)
Cnl145*	209	ATCTCCTCTCCTCCGTCCTC	TCACCGACATAGGCATCCTT	9-11	BF482249	actin (ACT-1) (Triticum monococcum, AF326781)
Cnl149	122	CCCACCTCTCCTCCGATTA	TCCTCCTCGTACTGCTCCAT	11	AU075463	putative UDP-galactose 4-epimerase (Arabidopsis thaliana, AC066689)
Cnl157*	181	AAGGCCGCGAGAGGATTC	CATCGTGAACGCCATCTCT	7	D40973	ns
Cnl158*	191	CTCATCCCACCACCACCAC	CCCTGAAGAAGTCGAACACG	7-8	BE401962	ns

¹Tamaño del amplicón, ²Localización en los cromosomas de arroz, ³Clon de EST, ⁴según la información obtenida del sitio <http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/Cornell/>, ns: alineamiento no significativo.* Marcadores que mostraron polimorfismo en *P. notatum*, y fueron empleados en los análisis de mapeo. + Marcadores que mostraron polimorfismo y no fueron aún localizados en el mapa de *P. notatum*.

Tabla I B: Características de los cebadores EST-SSR de trigo de la serie ksum para su amplificación en *Paspalum notatum*.

Marcador	pb ¹	“forward” (directo)	“reverse” (inverso)	Arroz ²	EST ³	BLASTX ⁴
Ksum3*	282	CCTTGGGCTTGTAGGTGTTG	TGACTCAGCTGAAACATCGG	1-4-12	BE516090	ferredoxin-NADP+reductase (<i>Oryza sativa</i> , D17410)
Ksum10*	163	TCCTCTCTCCCTCTTCTCC	CTCTCCCATCTCCTTCTCC	2-4-5-10	BE591917	ns
Ksum24*	178	CGGACCAGCAGAGCAAGAG	GATGGTGAGCAGCAGACAGA	2-4-6-7	BE213330	(AB030211) hydrophobic polypeptide [<i>Oryza sativa</i>]
Ksum26+	208	GTTCTTGCCACCGTGCTCG	CCACACGAAACCAACAAAGC	8-10	BM138345	glutathione transferase (<i>Triticum aestivum</i> , AJ414700)
Ksum27*	237	GCTTACGTGCGTACTTCTCC	TACTCCACTTGCCTAGCTCC	3	U91981	beta expansin B1 (<i>Festuca pratensis</i> , AJ295940)
Ksum28*	230	ACGGTCGCCTGGATATACGG	ACATGGAACCAGACGTCCTC	4-7-10	BE405640	(AP003237) hypothetical protein similar to <i>Arabidopsis thaliana</i>
Ksum43+	279	GCCTGCACCAGAACACGCAC	CATGCCTACACCGAGGATCT	1-8-9-10-11	BE399906	(AB037970) GHS-dependent dehydroascorbate reductase 1 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
Ksum67*	240	CACACCATCACACCCTTGAG	TAGATCTGTTGGGGACGGAG	2-4	BE414553	(X70666) alpha2 purothionin [<i>Triticum aestivum</i>]
Ksum73+	183	GATCAGGCCAGGCTACTCAG	CTTCTCAGCCCCCTCTTCT	11	BE490032	putative MYB family transcription factor (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NM111164)
Ksum93	286	ATCCCTGGTTTGGAGAGACC	GCGCTATGTTGTGTTGCTGT	2	BE606185	(AJ389716) gamma-gliadin [<i>Aegilops searsii</i>]
Ksum97+	293	CACATCGATGGGCATACAAG	CAAGTGGATCTCTGGGGTA	2-4	BE405040	putative proline-rich cell wall protein (<i>Gossypium barbadense</i> , AB026295)
Ksum104+	378	GCAAATCCCCGAGCAATCCC	TAGACACCAACTCCGATGCC	2	AB008497	(AB008497) LMM gluten 3 [<i>Triticum aestivum</i>]; (AJ293097) low molecular weight gluten subunit [<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>]
Ksum108*	316	GGCAGTTGCTGAGGTTGGAC	AACAGCCATATCCGCAGCCG	4-8-11-12	BE499852	(M11076) pre-alpha/beta-gliadin A-III [<i>Triticum aestivum</i>]
Ksum128	177	GGTCACAGGTGGTGCAACAT	CTGCTGCTGAGGTTGGGTGG	5-8-9	BE414482	(J05486) seed storage protein [<i>Avena sativa</i>]
Ksum140*	234	AACCCTCACTAGGCTCTCCC	GACTGTCCAGACAACGCTCA	1-2-7-11	BE488749	(Q09020) wound-induced Basic protein [<i>Phaseolus vulgaris</i>]
Ksum141*	258	GTAGGGGTCGTCGCTGCTAA	GAGACCCCTGCAGCCAACCC	5-7-10-11	BE516331	ns
Ksum153+	261	AGCAACCAGAGAGGCCATAG	GACTGCTCTCCCTCTCTCC	8-11	BE415738	ns
Ksum180+	245	TTCCATGCAGGGATGTTGTA	GAAGGAGACTTGGCTCAACG	11	M10092	pre-alpha-/beta-gliadin A-III (<i>Triticum aestivum</i> , AJ133602)
Ksum182	191	ATGTTGCAGCAGAGCATTTG	TGGGGTTGTTGTTGCTGATA	7-10-11	U86030	(U86030) low-molecular-weight glutenin storage protein (<i>Triticum aestivum</i> , U86030)
Ksum186*	184	TGAAGAAGTGGCACAAGACG	ATGGTCTTGTAGCGGTGGAG	6-7	BE400190	(AC073166) putative Mlo (pathogen resistance) protein [<i>Oryza sativa</i>]
Ksum193	243	CTCCGATGAGAAATGGTCGT	CTTCTTCTCCATCGCTCAG	3	X15870	mRNA Wheat middle repetitive insertion sequence WIS1 (<i>Triticum aestivum</i> , X15870)
Ksum202*	270	AGGAGGTGGTGGAGGAGAA	CTCCAAAGCTCTGAGGGTG	1-2-7	BE402420	(AY099670) early auxina-inducible protein 11 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]

Ksum205*	267	AGAAGGGAGTGTTCGATGGTG	TAGACAATCAGTTTGGCCCC	3-6-8	BE420098	(NW_117095) probable wound-induced protein [Arabidopsis thaliana]
Ksum206*	275	AGAGCAAGCCCTTCGTGTTT	GGCAGAGGAGGAGGAGAAGT	1-7-12	BE425201	(AC079633) Putative EREBP-like protein [Oryza sativa] [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
Ksum219*	265	AAGAAGGAGGAGAAGCCCAAG	TCTTTCCTTCACAACCACC	6-9-12	BE414115	(AB007649) contains similarity to ATFP3-gene_id:MLE2.16 [Arabidopsis thaliana]
Ksum222+	279	CCCAACCAACATCGTACTCC	AAAACAGCCAGACCTCCTCC	2-4-6-7	BE606407	(NM_111959) arginine-tRNA-protein transferase, putative [Arabidopsis thaliana]
Ksum230*	254	ACGTCGTCGAGTTTGAGGTC	ACCACTTCAATAGCCGCCAC	3-4-11-12	BE413996	cold shock protein-1 (Triticum aestivum, AB066265)
Ksum232	267	CACGAGGAGAAGGGGAATTT	GATGAAGCAAGAGCTGCCAT	7-12	BE417984	putative heat shock transcription factor HSF1 (Arabidopsis thaliana, NM11336)
Ksum238	292	GACTCCGACGACCACCAC	CCAGTAGCTCCAAACACCGT	1-3-9-11-12	BE426722	putative NADH-ubiquinone oxidoreductase (Arabidopsis thaliana, AY051072)
Ksum241	138	GTACTCCGTGGAGGAGCACA	CGGAGGTAGTACTTGACGCC	6	BE420319	(AP003433) cysteine proteinase inhibitor Scb-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

¹Tamaño del amplicón, ²Localización en los cromosomas de arroz, ³Clon de EST, ⁴según la información obtenida del sitio <http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/Cornell/>, ns: alineamiento no significativo. * Marcadores que mostraron polimorfismo en *P. notatum*, y fueron empleados en los análisis de mapeo. + Marcadores que mostraron polimorfismo y no fueron aún localizados en el mapa de *P. notatum*.

Tabla II: Datos de Temperaturas y número de bandas segregantes de los marcadores utilizados para el mapeo de los marcadores EST-SSR.

Marcador	EST	Rango de Temperatura ensayado ¹ °C	Temperatura experimental optima °C	Bandas Q4188 pol. ¹	Bandas Q4117 pol. ²	Bandas Biparentales segregantes	Bandas segregantes Totales
Cnl64	BE423103	60-65	63	1	1	1	3
Cnl81	AU032107	60-65	65	9	7	-	16
Cnl119	AF03953	59-65	65	-	2	1	3
Cnl126	AU069138	57-65	65	2	3	10	15
Cnl132	BE606854	56-62*	56	4	-	4	8
Cnl141	BE060826	56-62*	58	7	6	-	13
Cnl142	BE414104	56-62*	58	3	10	4	17
Cnl143	BE517078	56-62*	58	2	2	2	6
Cnl144	AU070020	56-62*	60	-	1	2	3
Cnl145	BE482249	60-66*	65	-	3	-	3
Cnl153	BE517390	58-64*	60	1	1	3	5
Cnl157	D40973	56-62*	58	2	2	-	4
Cnl158	BE401962	60-65	63	2	3	1	6
Ksum3	BE516090	60-65	58	3	1	1	5
Ksum10	BE591917	55-60	56	6	4	4	14
Ksum24	BE213330	60-65	63	5	2	4	11
Ksum27	U91981	58-64*	58	5	-	2	7
Ksum28	BE40560	58-62*	58	1	2	1	4
Ksum67	BE414553	58-64*	58	2	2	-	4
Ksum108	BE499852	60-65	63	6	5	4	12
Ksum140	BE488749	60-65	63	-	1	-	1
Ksum141	BE516331	58-64*	58	6	4	2	12
Ksum186	BE400190	56-62*	62	1	1	-	2
Ksum202	BE402420	60-66	65	3	4	2	9
Ksum205	BE420098	56-62*	60	4	3	1	8
Ksum206	BE425201	59-65	65	3	3	2	8
Ksum219	BE414115	59-65	65	4	2	-	6
Ksum230	BE413996	59-65	65	4	3	4	11
Bandas Totales				86	78	55	219
Promedio				3,07	2,78	1,96	7,8

¹Rango de Temperatura de anillado ensayada en cada marcador. *A partir de la T_m calculada ($T_m: 4\text{ }^{\circ}\text{C} \times (N^{\circ} \text{ de } (G's+C's)) + 2\text{ }^{\circ}\text{C} \times (N^{\circ} \text{ de } (A's + T's))$) se tomó un rango de temperatura de anillado que comprendió 4 °C por arriba y 2 °C por debajo de la misma. Las reacciones de optimización de la temperatura de anillado se realizaron utilizando un termociclador con gradiente marca BIOER, Gene Pro-Thermal Cycler y el Modelo TC-E-96G (ver Materiales y Metodos). ²Bandas polimórficas obtenidas en Q4188, ³Bandas polimórficas obtenidas en Q4117.

Tabla III: Características de los 11 *loci* microsatélites de *Paspalum notatum*

Ssr ¹	<i>locus</i> ² /Accesión en GenBank	Secuencia de los cebadores ²	Motivo Repetitivo ²	Rango de tamaño (pb) ²	NA ²	He ²	PIC ²	PD ²
Ssr1	PN03-A5 ₁ FJ572060	F: GTGGCTGGGATGAAAGAACAAA R: TAGCTCGCGCATAGGGGTAG	(CA) ₃ C(CA) ₅ (AC) ₂ (CA) ₄	249-287	6	0.62	0.59	0.74
Ssr2	PN03-A6 ₂ FJ572061	F: TGTTAACGGCAAATCAAAT R: GCCTACCCAAAGCATACC	(GA) ₃ (GT) ₈	160-188	11	0.86	0.84	0.96
Ssr3	PN03-E9 ₃ FJ572062	F: TGCCTTTTTCCATCCTAC R: GCACTGCAAACCATCATCTTAT	(AC) ₇	168-186	7	0.63	0.57	0.81
Ssr4	PN03-F2 ₄ FJ572063	F: TGCAACAAAAATAGTCAAAGAT R: AGGAGGCATATTATTAGTTCAA	(AC) ₇	241-249	5	0.71	0.66	0.81
Ssr5	PN03-G8 ₅ FJ572064	F: GCACTCTGAACCTTTGGCTCTT R: CAGGTGCTTGCTTGGTCTAA	(CA) ₇	254-258	3	0.44	0.36	0.55
Ssr6	PN03-H10 ₆ FJ572065	F: GGTGCCCAGTGAACAACA R: GAGAATGGATGGATGAAACGAT	(GA) ₁₁	222-272	12	0.87	0.86	0.95
Ssr7	PN02-A12 ₇ FJ572066	F: CGTCGTCAAACCCCTTCAT R: TCGGCGCTGTCTTCATCAT	(GA) ₃ AT(GAA) ₃	185-205	4	0.53	0.48	0.69
Ssr8	PN02-B5B ₈ FJ572067	F: GCATGCATAGAGCCAAATAGAT R: TAGGTAGTGGCGGTGAAGATAGTA	(TCA) ₄	156-188	6	0.64	0.59	0.70
Ssr9	PN02-F6A ₉ FJ572068	F: ACATCAGGAGGCATACGAGTG R: CTAGTTGCCCAGGAAAGGTGA	(CT) ₁₁	140-218	22	0.90	0.89	0.97
Ssr10	PN02-G10 ₁₀ FJ572069	F: GATACGTCTGATTCTTGTTTCG R: TCCTTCATGTGTTGTGGTCTC	(CA) ₈	189-219	7	0.81	0.79	0.90
Ssr11	PN02-H7 ₁₁ FJ572070	F: GATATCCACTCCCTCGCTACT R: CAACCCTACACATATCCCTCAC	(AC) ₈	194-204	4	0.71	0.65	0.90

¹ Codificación de los marcadores Ssr utilizada en esta tesis. F: cebador directo “*forward*”; R: cebador inverso “*reverse*”; tamaño del producto en pares de bases (pb); NA: Número de Alelos; He; Heterocigosis esperada; PIC: Contenido de Información de Polimorfismo; PD: Poder de Discriminación. ²Según la información obtenida de Cidade et al. (2009)

Tabla IV: Cebadores utilizados en los experimentos de clonado y mapeo de los COS

COS	Cebador directo (F)	Cebador inverso (R)
<i>apo start</i>	GCAGTCGACGCCACACCG CCATACTCTAT (F1)	GCATCTAGAGGAACCATCTCTCAGGTCA (R1)
		GCATCTAGATACAFACAGCGAAGGTGACG (R2)
<i>baby boom</i>	GCAGTCGACCTNGCNGCNCTGAAATACTG (F1)	GCATCTAGATGNTGNTGCCTTGTNACTCC (R1)
	GCAGTCGACNGCNGCNCTNCTGAAATACTGG (F3)	GCATCTAGAGTANGCCTCNGCTGCTTCTT (R2)
<i>serk</i>	GCAGGTACCGCGGCTTTGGTGTTGTTTAT (F1)	GCAGAGCTCCCTTCTTTTCGAGGTCATGC (R1)
		GCAGAGCTCCCATAACAAGCGCAGAAGGTT (R2)
<i>pkd</i>	GCAGTCGACTCTACGAGTTCGTCCCAAC (F1)	GCATCTAGAGTGATGAGCTCGAGGAGGAC(R1)
	GCAGTCGACCCGAGCTAGCCAAACTCAAG (F2)	GCATCTAGAAAGGGTAGGGGACATCCAAC (R2)

Este juego de cebadores fueron diseñados por la Dra Silvina Felitti, Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Agronomía, UNR, Zavalla, Santa Fe, Argentina.