



Facultad de Ciencias Agrarias  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



UNR  
Universidad Nacional de Rosario

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

---

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

SISTEMAS GENÉTICOS Y DIVERSIDAD EN *ACROCERAS*  
*MACRUM STAPF*

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

SILVANA CONSUELO FERRARI USANDIZAGA

Tesis presentada para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrarias

DIRECTOR: Ing. Agr. (Ph.D.) CARLOS ALBERTO ACUÑA

CODIRECTORA: Ing. Agr. (Ph.D.) ADRIANA NOEMÍ ANDRÉS

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. Instituto de Botánica del Nordeste. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Corrientes. Corrientes (Corrientes), Argentina.

2015

# SISTEMAS GENÉTICOS Y DIVERSIDAD EN *ACROCERAS* *MACRUM STAPF*

Silvana Consuelo Ferrari Usandizaga

Licenciada En Biotecnología - UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar por el grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra universidad. Es el producto de investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias perteneciente a la Universidad Nacional del Nordeste, en laboratorios del Instituto de Botánica del Nordeste y en la Estación Experimental Agropecuaria Corrientes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria durante el período comprendido entre el 15 de octubre de 2010 y el 15 de septiembre de 2014 bajo la dirección del Ing. Agr. (Ph.D.) Carlos Alberto Acuña y la codirección de la Ing. Agr. (Ph.D.) Adriana Noemí Andrés.

Lic. Silvana Consuelo Ferrari Usandizaga

Dr. Carlos Alberto Acuña

Dra. Adriana Noemí Andrés

Defendida el

de 2015

# Agradecimientos

---

Agradezco a las instituciones que me dieron esta enorme posibilidad, la Agencia Nacional De Promoción Científica y Tecnológica, al INTA, la UNNE y la UNR. Todo mi cariño y un agradecimiento muy especial a mis directores, el Dr. Carlos Acuña y la Dra. Adriana Andrés y también al Dr. Eric Martinez, la Dra. Elba Pagano y la Dra. Ana Honfi, quienes han desempeñado roles cruciales en el desarrollo de este trabajo; todos ellos han sido infinitamente generosos en tiempo, paciencia, y transfiriendo sus conocimientos; pero me queda con ellos una deuda aún mayor por confiar en mí, por ayudarme a crecer en lo profesional y en lo personal, por abrirme las puertas de sus casas, de sus familias y de sus vidas, y tendrán por siempre mi eterno afecto. También agradezco a los demás profesionales que compartieron conmigo su vastísima experiencia en numerosas oportunidades: el Dr. Camilo Quarín, la Dra. Cristina Goldfarb, el Dr. Mario Urbani, la Dra. Irene Caponio. Por último, pero no menos importantes agradezco a mis queridos amigos, por cumplir natural, solidaria y voluntariamente un rol simbiótico desde lo profesional y la vida diaria, dejando a veces de lado sus propias actividades para colaborar con las mías cuando los tiempos apremiaban: a Andrea Brugnoli, Alex Zilli, Cecilia Randazzo, Patricia Aguilera, Patricia Novo, Mara Schedler, Alejandra Weiss, Diego Ledezma, Florencia Marcón, y el resto de mis amigos desde su rol de alumnos (que por no olvidarme de nadie, cometeré la injusticia de no nombrar a ninguno); con todos ustedes, espero, estaremos siempre unidos por el fuerte e invisible lazo del cariño sincero. Por último, pero no menos importante, mi aprecio eterno a Alejandro Ferrari, Arturo Zamudio y Federico Zamudio quienes incondicionalmente pusieron a mi servicio su experto manejo de la literatura y el lenguaje.

*A mi familia, especialmente a mis padres y mis hermanos. Por ser ejemplo de voluntad, y don de gente, por el apoyo, por los consejos...Por estar ahí siempre.*

# Índice de contenidos

---

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS .....</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>X</b>
<i>PUBLICACIONES CON REFERATO .....</i>	<i>XIII</i>
<i>RESÚMENES DE PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y OTRAS REUNIONES CIENTÍFICAS. ....</i>	<i>XIII</i>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVI</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>EL GÉNERO ACROCERAS.....</b>	<b>4</b>
<i>LA ESPECIE ACROCERAS MACRUM.....</i>	<i>5</i>
<i>ACROCERAS MACRUM EN ARGENTINA .....</i>	<i>9</i>
<b>EL MODO DE REPRODUCCIÓN EN LAS GRAMÍNEAS.....</b>	<b>11</b>
<i>LA REPRODUCCIÓN SEXUAL DE LAS GRAMÍNEAS .....</i>	<i>16</i>
<i>LA AGAMIOESPERMIA DE LAS GRAMÍNEAS.....</i>	<i>20</i>
<b>LA DIVERSIDAD GENÉTICA .....</b>	<b>22</b>
<i>MARCADORES BASADOS EN SECUENCIAS DE ADN .....</i>	<i>24</i>
<i>MARCADORES DE RASGOS FENOTÍPICOS OBSERVABLES .....</i>	<i>31</i>
<b>ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE ESPECIES VEGETALES POLIPLOIDES.....</b>	<b>31</b>
<b>ESTUDIOS BÁSICOS PARA INICIAR UN PLAN DE MEJORAMIENTO .....</b>	<b>35</b>
<b><u>HIPOTESIS .....</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b><u>OBJETIVO GENERAL .....</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b><u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b><u>CAPÍTULO 1.....</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b><u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b><u>INTRODUCCIÓN.....</u></b>	<b><u>53</u></b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
<i>MATERIAL VEGETAL.....</i>	58
<i>TIPIFICACIÓN GENÉTICA.....</i>	59
<i>DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA.....</i>	61
<i>ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MOLECULAR.....</i>	63
<i>ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MORFOLÓGICA, AGRONÓMICA Y FENOLÓGICA.....</i>	65
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
<i>TIPIFICACIÓN GENÉTICA.....</i>	70
<i>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PLOIDÍA.....</i>	73
<i>ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MOLECULAR.....</i>	74
<i>ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MORFOLÓGICA, AGRONÓMICA Y FENOLÓGICA.....</i>	81
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<i>COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....</i>	99
<i>TIPIFICACIÓN GENÉTICA DEL GERMOPLASMA.....</i>	99
<i>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PLOIDÍA.....</i>	100
<i>DIVERSIDAD MOLECULAR.....</i>	101
<i>DIVERSIDAD MEDIANTE CARACTERES MORFOLÓGICOS, AGRONÓMICOS Y FENOLÓGICOS.....</i>	103
<i>CORRELACIÓN ENTRE LA DIVERSIDAD MEDIANTE CARACTERES MOLECULARES Y MORFOLÓGICOS, AGRONÓMICOS Y FENOLÓGICOS.....</i>	106
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b><u>CAPÍTULO 2.....</u></b>	<b><u>109</u></b>
<i><b>OBJETIVOS.....</b></i>	<b>109</b>
<i><b>INTRODUCCIÓN.....</b></i>	<b>110</b>
<i><b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b></i>	<b>112</b>
<i><b>MATERIAL VEGETAL.....</b></i>	112
<i>ANÁLISIS DE LA MEGASPOROGÉNESIS Y LA MEGAGAMETOGÉNESIS.....</i>	112
<i>ESTUDIO DE LA MICROESPOROGÉNESIS.....</i>	113
<i>ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DEL POLEN.....</i>	114
<i>DETERMINACIÓN DEL SISTEMA DE POLINIZACIÓN Y DE LA FERTILIDAD.....</i>	115
<i>DETERMINACIÓN DEL ORIGEN HÍBRIDO DE LA PROGENIE.....</i>	125
<i><b>RESULTADOS.....</b></i>	<b>127</b>
<i>ESTUDIO DEL ORIGEN Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS SACOS EMBRIONARIOS.....</i>	127
<i>ANÁLISIS DE LA MEGAESPOROGÉNESIS Y LA MEGAGAMETOGÉNESIS.....</i>	127
<i>ESTUDIO DE LA MICROESPOROGÉNESIS.....</i>	133
<i>ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE POLEN.....</i>	137
<i>DETERMINACIÓN DEL SISTEMA DE POLINIZACIÓN Y DE LA FERTILIDAD.....</i>	137
<i>PRODUCCIÓN DE SEMILLAS POR CRUZAMIENTOS CONTROLADOS.....</i>	140

<i>DETERMINACIÓN DEL ORIGEN HÍBRIDO DE LA PROGENIE</i> .....	143
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>158</b>
<b><u>COMENTARIOS FINALES</u></b> .....	<b><u>159</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b><u>164</u></b>

# Índice de tablas

---

<i>Tabla 1. Marcadores moleculares basados en secuencias de ADN comúnmente utilizados en la familia Poaceae.</i>	26
<b>Tabla 1. 1.</b> <i>Información de los iniciadores involucrados en la identificación de genotipos y el análisis de la diversidad molecular.</i>	63
<b>Tabla 1. 2.</b> <i>Información molecular obtenida con 5 iniciadores de ISSR en la tipificación genética de una colección de 47 accesiones de A. macrum.</i>	70
<b>Tabla 1. 3.</b> <i>Repeticiones de genotipos, obtenidas en la tipificación genética de una colección de A. macrum.</i>	72
<b>Tabla 1. 4.</b> <i>Información molecular obtenida a partir de 10 iniciadores de ISSR en una colección de 27 genotipos de A. macrum.</i>	75
<b>Tabla 1. 5.</b> <i>Matriz de distancias Jaccard (1-S) obtenida mediante marcadores de ISSR, para una colección de 27 genotipos de A. macrum.</i>	76
<b>Tabla 1. 6.</b> <i>Matriz de distancias ultramétricas obtenida mediante marcadores de ISSR, para una colección de 27 genotipos de A. macrum.</i>	77
<b>Tabla 1. 7.</b> <i>Correlaciones entre marcadores de ISSR y los dos primeros componentes principales del análisis de la diversidad molecular de una colección de A. macrum.</i>	80
<b>Tabla 1. 8.</b> <i>Resumen del análisis de la diversidad morfológica, agronómica y fenológica, de una colección de A. macrum.</i>	92
<b>Tabla 1. 9.</b> <i>Correlaciones según Pearson de 16 variables morfológicas y agronómicas de una colección de A. macrum.</i>	93
<b>Tabla 1. 10.</b> <i>Distancias Euclídeas obtenidas mediante 16 variables morfológicas, agronómicas y fenológicas para una colección de A. macrum.</i>	94
<b>Tabla 1. 11.</b> <i>Distancias ultramétricas obtenidas mediante mediante 16 variables morfológicas, agronómicas y fenológicas para una colección de A. macrum.</i>	94



<b>Tabla 1. 12.</b> <i>Correlaciones entre variables morfológicas, agronómicas y fenológicas con los componentes principales del análisis de la diversidad de A. macrum</i>	98
<b>Tabla 2. 1.</b> <i>Metodología de clarificado de ovarios, utilizada en Acroceras macrum.</i>	113
<b>Tabla 2. 2.</b> <i>Detalle de los cruzamientos controlados entre genotipos de A. macrum.</i>	121
<b>Tabla 2. 3.</b> <i>Análisis de megaesporogénesis y megagametogénesis en ovarios de Acroceras macrum en estadios tempranos de maduración.</i>	132
<b>Tabla 2. 4.</b> <i>Características de sacos embrionarios maduros de Acroceras macrum, en pistilos recolectados durante la antesis.</i>	133
<b>Tabla 2. 5.</b> <i>Arreglos cromosómicos observados en el citotipo tetraploide (4x) y el hexaploide (6x) de una colección de A. macrum.</i>	134
<b>Tabla 2. 6.</b> <i>Porcentajes de granos de polen viable y semillas producidas en autopolinización y polinización abierta, para una colección de 27 genotipos de A. macrum</i>	138
<b>Tabla 2. 7.</b> <i>Correlaciones según Pearson de algunas características relacionadas a la fertilidad de 27 genotipos de A. macrum.</i>	140
<b>Tabla 2. 8.</b> <i>Combinaciones genotípicas para la evaluación de la producción de semillas de A. macrum en cruzamientos controlados.</i>	141
<b>Tabla 2. 9.</b> <i>Producción de semillas de los genotipos de una colección de A. macrum como progenitor masculino o femenino, en cruzamientos controlados.</i>	141
<b>Tabla 2. 10.</b> <i>Correlaciones para las distancias genéticas de los progenitores y la fertilidad de cruzamientos homoploides 4x de A. macrum.</i>	143
<b>Tabla 2. 11.</b> <i>Iniciadores utilizados para la determinación del origen híbrido de la progenie obtenida por cuatro cruzamientos de A. macrum.</i>	144
<b>Tabla 2. 12.</b> <i>Determinación del porcentaje de descendientes de origen híbrido de cuatro familias de A. macrum.</i>	145

# Índice de figuras

---

<b>Figura 1. 1.</b> <i>Colección de germoplasma de <i>Acroceras macrum</i>.</i>	59
<b>Figura 1. 2.</b> <i>Ensayo experimental de <i>A. macrum</i> en EEA-INTA Corrientes.</i>	66
<b>Figura 1. 3.</b> <i>Patrones electroforéticos obtenidos en accesiones de <i>A. macrum</i> con el iniciador para amplificación en regiones génicas ISSR (GT)8 C.</i>	71
<b>Figura 1. 4.</b> <i>Dendrograma en base a perfiles moleculares ISSR de 47 accesiones de <i>A. macrum</i>, utilizando el método UPGMA y los coeficientes de disimilitud de Jaccard (1-S).</i>	73
<b>Figura 1. 5.</b> <i>Células meristemáticas de <i>A. macrum</i> en prometafase tratadas con el método de Squash y la tinción de Feulgen.</i>	74
<b>Figura 1. 6.</b> <i>Patrón electroforético de 27 genotipos de <i>A. macrum</i> obtenido con el iniciador de ISSR (GA)8 G.</i>	74
<b>Figura 1. 7.</b> <i>Dendrograma en base a perfiles moleculares ISSR de 27 genotipos de <i>A. macrum</i>, utilizando el método UPGMA y los coeficientes de disimilitud de Jaccard (1-S).</i>	78
<b>Figura 1. 8.</b> <i>Gráfico de componentes principales correspondiente al análisis de la diversidad genética en regiones ISSR de 27 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	79
<b>Figura 1. 9.</b> <i>Diferentes portes, capacidad de cobertura de suelo y estado fenológico de ejemplares de <i>A. macrum</i>, a seis semanas de plantado el ensayo experimental.</i>	82
<b>Figura 1. 10.</b> <i>Variación en altura (A) y diámetro de la corona (DC) de la planta en 26 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	83
<b>Figura 1. 11.</b> <i>Variación en el largo (LL) y ancho (AL) de la lámina foliar en 26 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	84
<b>Figura 1. 12.</b> <i>Largo del primer entrenudo visible (LEn) medido a las nueve semanas de plantado el ensayo para 26 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	85
<b>Figura 1. 13.</b> <i>Variación en el largo (LEs) y ancho (AEs) de la espiguilla en 26 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	86
<b>Figura 1. 14.</b> <i>Variación en la longitud de la pánicula (LP) y del racimo basal (LRB) en 26 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	87
<b>Figura 1. 15.</b> <i>Variación en el número de espiguillas (NEs) y el porcentaje de espiguillas abiertas por panícula (EsA) en 26 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	88
<b>Figura 1. 16.</b> <i>Variación en crecimiento inicial (CI) y cobertura del suelo (CS) en 26 genotipos de <i>A. macrum</i>.</i>	89

<b>Figura 1. 17.</b> Biomasa seca de la planta entera (B); medida a los 180 días de plantado el ensayo, para 26 genotipos de <i>A. macrum</i> .	90
<b>Figura 1. 18.</b> Variación en la duración del periodo vegetativo (PV) y el pico de floración (PF) en 26 genotipos de <i>A. macrum</i> .	91
<b>Figura 1. 19.</b> Dendrograma generado mediante el método de agrupamiento UPGMA, en base a 16 caracteres morfológicos, fenológicos y agronómicos de 26 genotipos de <i>A. macrum</i> .	95
<b>Figura 1. 20.</b> Componentes principales obtenidos a partir de 16 caracteres morfológicos, fenológicos y agronómicos evaluados en 26 genotipos de <i>A. macrum</i> .	96
<b>Figura 1. 21.</b> Correlación entre distancias genéticas obtenidas con marcadores de ISSR y a partir de caracteres morfológicos, fenológicos y agronómicos, en una colección de <i>A. macrum</i> .	98
<b>Figura 2. 1.</b> Criterio de viabilidad del polen para una colección de <i>A. macrum</i> .	115
<b>Figura 2. 2.</b> Material de <i>A. macrum</i> utilizado en cruzamientos.	116
<b>Figura 2. 3.</b> Cámara húmeda utilizada para los cruzamientos controlados con emasculación en condiciones de autopolinización y de polinización abierta.	121
<b>Figura 2. 4.</b> Secuencia desde la obtención de cariósides por cruzamiento controlado entre diferentes genotipos de <i>Acroceras macrum</i> , hasta su germinación.	124
<b>Figura 2. 5.</b> Características y desarrollo de los órganos reproductivos femeninos de <i>A. macrum</i> .	128
<b>Figura 2. 6.</b> Desarrollo del saco embrionario en ovarios clarificados de <i>A. macrum</i> .	130
<b>Figura 2. 7.</b> Microesporogénesis del citotipo tetraploide ( $2n = 4x = 36$ cromosomas) de <i>A. macrum</i> .	135
<b>Figura 2. 8.</b> Microesporogénesis del citotipo hexaploide ( $2n = 6x = 54$ cromosomas) de <i>A. macrum</i> .	136
<b>Figura 2. 9.</b> Porcentaje de granos de polen viables para una colección de <i>A. macrum</i> .	137
<b>Figura 2. 10.</b> Producción de semillas para una colección de <i>A. macrum</i> .	139
<b>Figura 2. 11.</b> Identificación de descendientes de origen híbrido en <i>A. macrum</i> , por medio de marcadores moleculares.	144

# Publicaciones

---

### **PUBLICACIONES CON REFERATO**

Ferrari Usandizaga, S. C., Brugnoli, E. A., Weiss, A. I., Zilli, A. L., Shedler, M., Pagano, E. M., Martínez, E. J., Acuña, C. A. (2014). Genetic and morphological characterization of *Acroceras macrum* Stapf. *Grass and Forage Science*. Recibido, 3 Abril 2014; revisado, 24 Agosto 2014; publicado online, 28 de noviembre 2014.

### **RESÚMENES DE PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y OTRAS REUNIONES CIENTÍFICAS.**

Ferrari Usandizaga, S. C., Golfarb, M. C., Acuña, C. A. (2011). *Acroceras macrum*: colección y contribuciones a su caracterización. Comunicación. *Revista Argentina de Producción Animal*, 31(1), 521.

Cuyeu, A. R., Randazzo, C., Guariniello, J., Ferrari Usandizaga, S. C., Goldfarb, M. C., Pagano, E. M. (2011). Adaptación de la técnica de microsatélites para la caracterización genética de *Acroceras macrum*. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 22(1), 197.

Ferrari Usandizaga, S. C., Quarín C. L., Martínez, E. J., Goldfarb, M. C., Acuña, C. A. (2012). Niveles de Ploidía y Asociaciones Cromosómicas durante la Meiosis de *Acroceras macrum* Stapf (Resumen). *Journal of Basic & Applied Genetics*, 23(1), 244.

Ferrari Usandizaga, S. C., Martínez, E. J., Quarín, C. L.; Zilli, A., Brugnolli, E. A., Randazzo, C., Pagano, E. N., Acuña, C. A. (2012). Avances en la caracterización genética de *Acroceras macrum* Stapf. *Ciencias Agronómicas*, 20, 61.

Schedler, M., Ferrari Usandizaga, S. C., Brugnoli, E. A., Zilli, A. L., Weiss, A. I., Acuña, CA, Martínez, E. J. (2013). Sistema de polinización, fertilidad e hibridación en *Acroceras macrum* Stapf. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 24(1), 188.

Ferrari Usandizaga, S. C., Schedler, M., Brugnolli, E. A, Zilli, A. L, Martínez, E. J, Acuña, C. A. (2013). Diversidad genética en *Acroceras macrum* Stapf. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 24(1), 189.

Weiss, A. I., Ferrari Usandizaga, S. C., Brugnolli, E. A., Schedler, M., Martínez, E. J., Acuña, C. A. (2013). Variabilidad Morfológica y Fenológica en *Acroceras macrum* Stapf. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 24(1), 189.

Acuña, C. A. (2013). Mejoramiento genético de especies forrajeras de ciclo estival en Corrientes. *Informe técnico INTA – Estación Experimental Agropecuaria Rafaela: Jornada Forrajeras Tropicales 2013*, 58, 42-48.

Schedler, M., Ledesma, D. A., Ferrari Usandizaga, S. C. (2014). Hibridación y eficiencia reproductiva en *Acroceras macrum*. *XX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

# Resumen

---

*Acroceras macrum* es una especie  $C_3$  perenne originaria de regiones húmedas, tropicales y subtropicales, de África. Sus destacables propiedades nutricionales se traducen en producción de carne, y su excelente adaptación a regiones con problemas de anegamiento del nordeste de nuestro país, la convierten en una especie de especial interés para ser incorporada en los sistemas ganaderos de estas regiones. Su baja producción de semillas es un limitante para su adopción y es uno de los fundamentos para incluir la especie en un programa de mejoramiento genético. Los escasos estudios que se han realizado hasta el momento no son suficientes para iniciar un correcto plan de mejoramiento genético, lo que hace necesario estudiar el sistema reproductivo, los mecanismos de polinización y las características citogenéticas en *A. macrum*. Además de esto, es indispensable establecer si el germoplasma disponible contiene una diversidad genética lo suficientemente amplia, para que sea posible el mejoramiento genético. En este trabajo de tesis se realizó el acopio de germoplasma introducido hace varios años en Argentina y se lo caracterizó molecularmente mediante marcadores ISSR y por 16 características morfológicas y agronómicas, en ambos casos con la finalidad de estudiar su diversidad genética. Sus niveles de ploidía fueron determinados por conteo cromosómico y se estudió el tipo de poliploidía a partir de la observación de las asociaciones cromosómicas en la meiosis masculina. El modo de reproducción se determinó observando la megasporogénesis, megagametogénesis y sacos embrionarios maduros, además de cruzamientos en condiciones de polinización abierta, autopolinización, cruzamientos controlados, y finalmente testeando el origen híbrido de la progenie obtenida en los cruzamientos controlados. La fertilidad se estudió mediante las observaciones de los procesos de formación de las gametas, estimando la fertilidad del polen, y evaluando la producción de semillas por cruzamientos controlados, autopolinización y polinización abierta. La información obtenida a partir de estos estudios fue que el germoplasma estudiado cuenta con 27 genotipos, 22 de ellos tetraploides con 36 cromosomas y 5 hexaploides con 54 cromosomas. La mayor diversidad genética fue detectada dentro del genotipo tetraploide, tanto por el método molecular como por el fenotípico. Ambas metodologías ofrecieron información complementaria acerca de la diversidad genética del germoplasma estudiado y presentaron una correlación significativa, aunque baja. Los estudios de las variables fenotípicas arrojaron importantes datos de variables de interés agronómico y otros datos que

serán de utilidad en un plan de mejoramiento de esta especie. La observación de las asociaciones cromosómicas durante la meiosis masculina, indicó que ambos citotipos son alopoliploides por su origen. Las características del desarrollo del megagametófito y el tipo de saco embrionario que se observó, indican que la especie sólo forma sacos embrionarios por procesos meióticos. La relación entre la producción de semillas en polinización abierta (con una media general del 28 %) con la de autopolinización forzada (con una media general del 4 %), indicó alogamia. A su vez, mediante el testeó de la progenie de cuatro familias obtenidas mediante cruzamientos controlados, fue posible corroborar la reproducción sexual y alógama de la especie. Dichos cruzamientos, diseñados sin la emasculación previa del progenitor femenino, resultaron en una progenie cuyo origen híbrido pudo ser corroborado para la amplia mayoría de los individuos. Dentro de los dos citotipos, los genotipos presentaron diferentes niveles de fertilidad masculina y femenina; según la viabilidad del polen, y la producción de semillas en polinización abierta y autopolinización forzada, respectivamente. A partir de los resultados de los distintos estudios, fue posible establecer que el citotipo tetraploide presenta una mayor fertilidad general que hexaploide. El citotipo tetraploide, presentó una media de abortos durante los procesos de megaesporogénesis y megagametogénesis del 8 %, 47,5 % de irregularidades durante la microesporogénesis, viabilidad media del polen de 43,3 %, y una producción media de semillas de 5,1 % en autopolinización y de 34,5 % en polinización abierta. Por su parte, el hexaploide, presentó una media de abortos durante los procesos de megaesporogénesis y megagametogénesis del 22 %, 78,1 % de irregularidades durante la microesporogénesis, viabilidad media del polen de 26,2 %, fue estéril en autopolinización, y presentó una producción media de semillas del 1,5 % en polinización abierta. El porcentaje de divisiones meióticas con irregularidades, durante la microesporogénesis, fue similar al del polen calificado como no-viable, para ambos citotipos. Esto indica que el desarrollo normal de la meiosis es determinante para la viabilidad del polen. Aun así, la fertilidad del polen no resultó un factor limitante para la producción de semillas. Fue posible deducir que, más allá de la fertilidad masculina o femenina de los genotipos individuales, el factor determinante en la producción de semillas es la combinación de los genotipos utilizada en cruzamientos controlados. Una acertada combinación puede alcanzar interesantes porcentajes de semilla viable. Estos resultados proporcionan información básica necesaria para diseñar un plan de mejora para esta especie, basado en hibridación, propagación y selección.

# Abstract

---

*Acroceras macrum* Stapf is a perennial grass native to Africa. Its high nutritional value, translated to weight gain in ruminants and their adaptation to waterlogged soils in northeastern Argentina, have sparked interest in the improvement of some agronomic traits of the species, mainly the production and retention of seeds. In this thesis basic studies have been conducted that were not previously documented on the *A. macrum* germplasm available in Argentina. *A. macrum* germplasm adapted to the northeastern region of the country was studied. Genetic diversity was assessed by ISSR molecular markers and by morphological, agronomical and phenological traits. Interesting information was obtained either by the molecular method as for the phenotypical. This germplasm contained 27 different genotypes. The ploidy levels were determined by chromosome counting, resulting in 22 tetraploid genotypes (36 chromosomes) and five hexaploid genotypes (54 chromosomes). Most genetic diversity was in the tetraploid cytotype. Chromosomal studies in male meiotic chromosomal associations demonstrated that the origin of both cytotypes was allopolyploid. The mode of reproduction of the species was sexual; that conclusion came from observations of ontological processes of embryo sac in clarified gineceos, and the study of the origin of hybrids obtained by crossing. The pollination system of the species was allogamy, this was determined from the comparison of the levels of seed produced in terms of open-pollination, self-pollination and controlled cross-pollination with and without emasculating the female parent. The confirmation of this came from the result of the progeny test. Both, male fertility and female fertility were significantly greater in the tetraploid cytotype than in the hexaploid cytotype. This was concluded from pollen viability, seed production in the different conditions of pollination (open pollination, self-pollination and controlled crosses) and observing embryo sacs. The combination of genotypes used at crossing was the most important factor in the seed setting. These results provide the necessary basic information to design an improvement plan for the species based on hybridization, propagation and selection.



# Introducción

---

La familia de las gramíneas (*Poaceae*) es una de las más ricas del reino vegetal con aproximadamente 700 géneros y unas diez mil especies que se distribuyen globalmente en todas las latitudes (Watson y Dallwitz, 1992).

Un factor determinante en la distribución geográfica de las distintas especies de gramíneas es la vía metabólica que utilizan para la asimilación de CO<sub>2</sub>, es decir si son plantas C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub>. Su metabolismo de carbono les confiere a las plantas C<sub>4</sub> mayor eficiencia en la utilización del agua y la energía lumínica, lo cual las habilita para adaptarse a ambientes donde las plantas C<sub>3</sub> no están preparadas fisiológicamente para sobrevivir. Pero a su vez, las gramíneas C<sub>4</sub> tienen condicionada su existencia a lugares con alta temperatura e intensidad lumínica porque su mayor requerimiento enzimático implica un gasto mayor de energía que deben compensar con una mayor eficiencia fotosintética (más CO<sub>2</sub> fijado por molécula de agua transpirada), lo cual sólo se alcanza a elevadas temperaturas. Así, las plantas C<sub>3</sub> son muy competitivas en climas templados y húmedos mientras que las plantas C<sub>4</sub> son más competitivas en climas con largos periodos de sequías, aridez o con baja humedad relativa (Salisbury y Ross, 2000). Además de su mecanismo de asimilación de CO<sub>2</sub>, las gramíneas también se distinguen entre sí por otros aspectos fisiológicos relacionados a su adaptación a distintos ambientes, como el metabolismo secundario y la modificación de órganos y de la estructura de la planta (Salisbury y Ross, 2000). Todo lo anterior puede afectar las potencialidades en la productividad de materia seca en un determinado ambiente y otros aspectos con relevancia agronómica y para la producción animal, como diferente composición química de los tejidos, las condiciones climáticas y edafológicas en las que podrán lograr su mejor desarrollo, características nutricionales, palatabilidad y digestibilidad.

El territorio argentino presenta una amplia diversidad edafológica y climática, de relieve y de balance hídrico; todo ello producto principalmente de su extensión longitudinal, latitudinal, su posición relativa a los océanos y a la Cordillera de los Andes. Estos factores físicos y su distribución heterogénea, traen como consecuencia una gran diversidad ecológica y de las principales actividades productivas que se desarrollan, las cuales también se distribuyen heterogéneamente y a su vez interaccionan con los factores físicos introduciendo nuevas modificaciones (Matteucci y Morello, 2001).

En los últimos años, factores como la demanda sostenida de granos y el aumento de precios, han generado la necesidad de expandir el área productiva, tanto para la agricultura como para la ganadería. El resultado de esto es la creciente utilización de zonas marginales

(donde los suelos tienen una baja aptitud para la producción de granos), entre ellas las regiones con suelos bajos susceptibles a encharcamientos temporarios de la provincia de Corrientes, las cuales son utilizadas por la ganadería vacuna para la producción de carne (Sampedro y col., 2007). La manera de sostener la productividad necesaria para mantener la rentabilidad de la actividad ganadera es incrementar la oferta forrajera mediante estrategias que involucren la incorporación de especies estivales, mejoramiento del campo natural, verdeos invernales, suplementación y/o reservas de heno o silajes. Actualmente la alternativa más conveniente para recuperar a la inversión a corto plazo en las áreas anegables de Corrientes es incorporar pasturas estivales ya sea como pastoreo o pastoreo y reserva (Sampedro y col., 2007). Los suelos de las regiones del nordeste de Argentina con tendencia al anegamiento son principalmente alfisoles y vertisoles (Garbulsky y Deregibus, 2004) caracterizados por una textura arcillosa y una fertilidad media; tienen drenaje deficiente, tendencia a la acidez y suelen ser pobres en materia orgánica (USDA- NRCC Soil Survey Staff, 2010). Una interesante opción para el aprovechamiento de estos suelos es la introducción y cultivo de plantas forrajeras exóticas, y la selección de los cultivares con mejor características de adaptación y producción para ser incorporadas a los nuevos sistemas de explotación. En este contexto, surge la necesidad de generar información básica para la selección de materiales forrajeros, para el desarrollo de cultivares mejorados en su capacidad productiva, bajo condiciones edafológicas y climáticas restrictivas, respondiendo a las necesidades específicas de estas áreas.

El mejoramiento genético de plantas forrajeras debe ser dirigido hacia la obtención o selección de materiales superiores que puedan aumentar la cantidad o calidad del forraje producido, la eficiencia de la producción animal y consecuentemente el lucro de la actividad ganadera. Las características propias del material vegetal a menudo hace necesario introducir modificaciones específicas sobre las metodologías de mejoramiento base utilizadas para los cultivos alógamos o autógamos (teniendo en cuenta si la especie presenta apomixis, o si su modo de propagación es preferentemente vegetativo; depende también del grado de prolificidad del cultivo; y hay que tener en cuenta si se trata de un cultivo de ciclo perenne o anual) de modo de obtener una mayor eficiencia en el proceso. Tratándose de especies forrajeras, el objetivo final es el mejor desempeño productivo del animal y no sólo el desempeño agronómico de la planta, por lo cual se requiere conocer y manejar las relaciones

clima-suelo-planta-animal. Todo esto requiere de disponer una base de información para orientar correctamente el plan de mejora (Pereira y col., 2001).

El presente trabajo de Tesis se enfoca hacia estudios básicos sobre germoplasma de *Acroceras macrum* Stapf. Esta especie está adaptada a zonas bajas, susceptibles al anegamiento, del nordeste de Argentina. En esas áreas, la principal actividad económica es la ganadería, pero las condiciones climáticas y edafológicas son la principal dificultad para la producción de forraje, forzando en muchos casos a la dependencia de la suplementación. El germoplasma estudiado corresponde a líneas de *A. macrum* seleccionadas e introducidas a nuestro país de Sudáfrica, las cuales fueron seleccionadas por sus características agronómicas en la región sudafricana antes denominada Transvaal, demostrando tener una excelente adaptación a las mencionadas zonas de Argentina.

## EL GÉNERO *ACROCERAS*

El género *Acroceras* es cosmopolita, abarca unas 22 especies, cuatro de las cuáles son americanas y las restantes son africanas. Incluye especies que hasta 1920 estaban incluidas en el género *Panicum*, entre ellas *Acroceras macrum* (la cual es de origen africano). El autor que separa los géneros *Acroceras* y *Panicum*, Otto Stapf, incluye en su descripción diagnóstica caracteres de la espiguilla, de los cuales el criterio más relevante es la presencia de un engrosamiento verdoso en forma de cresta en el ápice de las glumas superior e inferior del antecio superior y lemma inferior (Zuloaga y col., 1987).

Stapf (1920), citado por Zuloaga y col. (1987), describe los integrantes del género *Acroceras* como plantas anuales o perennes con cañas decumbentes, cundidoras y a menudo ramificadas en los nudos inferiores; sus características foliares incluyen lígulas membranáceas a membranáceo-ciliadas y láminas ovalo-lanceoladas a lanceoladas, cortamente pseudopeciadas con o sin venas anastomadas (Zuloaga y col., 1987).

En su revisión, Zuloaga (1987) citando a Stapf también describe las características de la inflorescencia, la espiguilla y sus componentes. La inflorescencia se compone de espiguillas divergentes del raquis que se ubican de a pares (o solitarias, hacia el extremo de los racimos), y poseen pedicelos cortos sobre las ramificaciones; las ramificaciones terciarias pueden estar presentes o ausentes, dependiendo de la especie. La espiguilla es siempre biflora, con forma elipsoide a lanceolada, comprimida dorsiventralmente y se articula por debajo de las glumas (Zuloaga y col., 1987). Los bordes de las glumas y la lemma inferior son glabros o

con diferentes grados de pilosidad. La gluma inferior es trinervada y cubre un medio a tres cuartos de la espiguilla, y tiene la característica que es privada del género de poseer una compresión lateral formando una cresta en el ápice, que según la especie puede estar poco o bien definida. La envoltura más externa de la espiguilla se compone de la gluma superior y la lemma inferior, ambas son pentanervadas y sub-iguales y presentan la compresión en la cresta apical. El antecio inferior es masculino (carece de gineceo), y su palea puede ser de tamaño variable o estar ausente. El antecio superior tiene una forma elipsoide a lanceolada, con una compresión dorsiventral y una superficie lisa y lustrosa (con o sin papilas). La flor superior es bisexual con tres estambres, un ovario oblongo con dos estilos y estigmas plumosos; recubierto por dos lodículas cuneadas (Zuloaga y col., 1987).

En el antecio superior, la lemma superior es el criterio taxonómico que separa el género de *Panicum* (en *Acroceras* a diferencia de lo que sucede en *Panicum*, el ápice tiene dos zonas verdosas y reflexas y está comprimido lateralmente formando la cresta) (Morrone y Zuloaga, 1995); la misma cubre con los bordes a la palea superior (binervada) que posee dos protuberancias verdosas hacia los bordes enrollados de la lemma (Zuloaga y col., 1987).

La carióspside (cuando se forma) es alargada a elipsoide, posee un hilo linear u oblongo a punctiforme que abarca de la mitad a todo su largo, y en su interior el embrión ocupa la mitad o más del tamaño del ovario (Zuloaga y col., 1987).

### ***La especie Acroceras macrum***

*Acroceras macrum* Stapf es nativa de África donde su distribución natural abarca tanto áreas tropicales como subtropicales de ese continente. En el área tropical nordeste, se encuentra en los países de Chad y Sudán; hacia el centro oeste tropical en Sierra Leona; en el centro subtropical en República de África Central y República Democrática del Congo; hacia el centro este subtropical en Kenya, Uganda y Tanzania; hacia el sur tropical en Angola, Zambia, Malawi, Zimbabwe, Mozambique, Botswana, Swaziland y el nordeste de la República de Sudáfrica (Rhind y Goodenough, 1979). Crece naturalmente, con una preferencia por las regiones altas (de 1000 a 2.000 m sobre el nivel del mar) (Rhind y Goodenough, 1979), en el fondo de valles que se inundan estacionalmente, sobre márgenes de ríos, en esteros y en pastizales húmedos. Requiere humedad acumulada, ya que es poco tolerante a la sequía, pero tolera bien la inundación estacional, por lo cual generalmente crece en regiones con un régimen pluvial entre 625 a 1500 mm anuales de lluvia. En cuanto a los tipos de suelo, crece

bien en texturas franco arenosas, franco arcillosas, y franco limosas. Sus estolones y rizomas le proveen de gran habilidad para expandirse por el terreno, siendo la multiplicación vegetativa su modo habitual de propagación (Skerman y Riveros, 1990). Los diferentes ecotipos y líneas difieren en sus requerimientos de temperatura, pero en general parecen preferir condiciones climáticas subtropicales y son afectados por el frío durante el invierno, aunque toleran bajas temperaturas por periodos cortos pero con una reducción de su productividad (al comparar el rendimiento con temperaturas medias nocturnas de 10 °C respecto de las de 16 °C, la producción media de diferentes líneas se redujo a la mitad) (Rhind y Goodenough, 1979).

Skerman y Riveros (1990) citan a Oliveira y col. (1973), quienes describen algunas características comunes de los integrantes de la especie *A. macrum*. De acuerdo a esos autores, estas plantas son perennes, con rizomas delgados, sus tallos son simples y alcanzan alturas de 40 a 110 cm con porte generalmente decumbente o también pueden ser geniculados, normalmente postrados en la base. La lámina de la hoja es verde brillante con 15 a 25 cm de largo, con una textura glabra o levemente pilosa. La inflorescencia comúnmente mide de 15-25 cm de largo y está generalmente compuesta por entre dos y cinco racimos, con espigas solitarias y muy espaciados sobre un delgado eje central. Los racimos inferiores son de 6-9 cm de largo, volviéndose más cortos hacia la parte superior. Las espiguillas son glabras, miden unos 5 mm de largo y su ápice está claramente comprimido lateralmente formando una cresta bien definida, se disponen en forma individual o de a pares donde se intercala una espiguilla pedicelada y una casi sésil. Skerman y Riveros (1990) también citan a Oliveira y col. (1973) indicando que su metabolismo fotosintético es del tipo C<sub>3</sub>.

El interés por esta especie y su mejoramiento comenzó en Sudáfrica y tuvo su pico en la década de 1970, cuando se iniciaron los primeros estudios (Rhind y Goodenough, 1976; 1979; Theron y Arnott, 1979). Theron y Arnott (1979) indican que un alto interés estaba puesto en mejorar o reforzar la calidad de las pasturas de los valles, y que el objetivo era conseguir gramíneas y leguminosas forrajeras selectas que pudieran competir e incluso reemplazar completamente a las pasturas naturales. Los requerimientos indispensables para que una especie calificara en esta selección eran el buen rendimiento en los suelos ácidos y lixiviados de las regiones con altos volúmenes de precipitaciones, que se adaptara a las condiciones ambientales locales y tenga un hábito de crecimiento que le permita crecer agresivamente, pero a su vez que sea compatible con leguminosas como *Trifolium repens* y *T.*

*pratense*, que sea palatable y responda bien a la fertilización, y que mantenga su palatabilidad y valor nutritivo al madurar de modo de permitir prolongar el período de pastoreo cuando el crecimiento del pastizal decae durante el otoño (Theron y Arnott, 1979). Citando a Botha (1944), Theron y Arnott (1979) afirman que *A. macrum* satisfizo todos esos requerimientos en los suelos ácidos y el clima fresco de la región centro-este de Sudáfrica, allí la especie se desarrollaba bien en las zonas anegadas arenosas, donde la mayoría de las otras pasturas de clima cálido no lograban sobrevivir. Los primeros en interesarse en *A. macrum* fueron productores que notaron la alta palatabilidad de las especies locales en el pastoreo a campo natural. Ellos iniciaron las primeras plantaciones en KwaZulu-Natal e incluso empezaron a utilizar la especie henificada con excelentes resultados (Theron y Arnott, 1979). La especie se utilizó como cultivo también en otras provincias Sudafricanas como El Cabo Occidental, y en la República de Ghana, el Reino de Lesotho y en la República de Suriname. A partir de allí, se inició un plan de mejora que incluyó los primeros estudios citológicos, colección de germoplasma, cruzamientos, evaluación, selección y obtención del único cultivar de *A. macrum*, denominado Cedara Select (Rhind y Goodenough, 1979; Theron y Arnott, 1979). Cedara Select es de propagación vegetativa y fue seleccionado de entre un grupo de 29 ecotipos recolectadas en diferentes localidades africanas, por haber presentado la mejor combinación de rendimiento y calidad con la resistencia a la defoliación y a dos problemáticos patógenos, uno de ellos no identificado que causa manchas en las hojas, pero afecta principalmente hojas viejas y no se manifiesta cuando se mantiene la defoliación constante, y el otro es el hongo *Ustilago syntherismae* (Rhind y Goodenough, 1979; Theron y Arnott, 1979).

Rhind y Goodenough (1979) y Skerman y Riveros (1990) hicieron revisiones a partir de varios autores que estudiaron las características productivas, agronómicas y nutricionales de *A. macrum* en Sudáfrica durante la década de 1970. Las principales fortalezas que destacan en esta especie, al usarla como forraje, son su valor nutritivo, su alta digestibilidad y su excelente palatabilidad, y además que puede ser henificada y/o ensilada manteniendo una buena palatabilidad y valor nutritivo. Los contenidos de proteína varían según la región y la época del año donde se la cultiva; también difieren según la porción de la planta estudiada, pero si bien el mayor contenido está en las hojas, no fue bajo en tallos, en donde se reportó un 7,9 % de proteína total en la materia seca (similar al contenido del heno donde este valor fluctuó entre 8,5 y 9 %) (Rhind y Goodenough, 1979). El contenido mínimo

de proteína en la materia seca reportado fue de 2,84 % (en hojas acartonadas), a un máximo de 22,81 % (en hojas frescas), en la porción consumida como forraje el rango fue de 5,9 a 18 %, y el heno en pie (forraje diferido del período estivo-otoñal al invernal) también contuvo contenidos interesantes de proteína total (14 % de la materia seca) (Rhind y Goodenough, 1979). Estos valores fueron un 125 % a 200 % superiores a los de otras gramíneas evaluadas en igualdad de condiciones (Rhind y Goodenough, 1979). Los contenidos de fósforo, fueron de 0,15 % en materia seca del forraje y de 0,4 % en las hojas verdes. El contenidos de calcio en las hojas o el forraje fue de de 0,43 % y de 0,25 % en el heno. Los contenidos de fibra detergente ácido pasaron de 26 % en el forraje de rebrote a 43,3 % en el forraje maduro y los contenidos proteicos que alcanzaron valores del 18 % en el rebrote descendieron a 11 % en el forraje maduro (Rhind y Goodenough, 1979)

El rendimiento en materia seca reportado en 1953, obtenido a partir de antiguas plantaciones de *A. macrum* en la región centro-este de Sudáfrica (antes llamada Transvaal), fue de 13.200 Kg anuales por hectárea, un rendimiento que resultó bueno al compararlo con otras pasturas en condiciones similares (Skerman y Riveros, 1990). Luego se evaluó el rendimiento en otras regiones de Sudáfrica obteniéndose valores en un rango de 2.010 a 17.940 kg anuales por hectárea, dependiendo mucho de las condiciones ambientales, pero en todos los casos respondiendo bien a la fertilización y la irrigación y siempre integrando el grupo de las forrajeras de mejor producción y valor nutritivo. Varios estudios se llevaron a cabo evaluando el comportamiento de *A. macrum* para diferentes variables agronómicas de interés y siempre comparándola con otros cultivos tradicionales. Rethman y de Witt (1988) llevaron a cabo un estudio en la región de Transvaal, reportando una calidad nutricional que se mantiene más que otras especies (*Cynodon aethiopicus*, el híbrido de *Cynodon* “Coast Cross II” *Pennisetum clandestinum* y *Digitaria scalarum*) para diferentes épocas del año y periodos de descanso. En esa región el cv Cedara Select no fue superior al ecotipo local. Gertenbach y col. (1995) llevan a cabo su estudio comparativo frente a *Digitaria eriantha* en la región de KwaZulu-Natal Sour Sandveld, reportando mayor engorde invernal en novillos de destete con *A. macrum*. En esta última región, se llevó a cabo otro estudio comparativo nuevamente con *D. eriantha* (van Schalkwyk y Gertenbach, 2000), pero evaluando el efecto del periodo de descanso sobre la calidad nutricional de la pastura y la subsecuente ingesta y ganancia de peso en novillos de engorde invernal; los resultados indicaron que *A. macrum* mantuvo más sus atributos nutricionales para las diferentes fechas de clausura testeadas.



Entre sus atributos, Skerman y Riveros (1990) y Rhind y Goodenough (1979) destacaron que es muy buena compitiendo con las malezas, principalmente al ser pastoreada, pero a su vez se ha observado una buena compatibilidad con varias leguminosas (*Lotononis Bainesii*, *Trifolium repens*, entre otras). Por otro lado, Rhind y Goodenough (1979) al igual que Theron y Arnott (1979), indican que hay dificultades en la obtención de semilla fértil, pero de cualquier manera su obtención es posible. Theron y Arnott (1979) consideran que, particularmente en el caso del cultivar Cedara Select, el hecho de que los productores no puedan disponer de semilla fértil, hace impráctica y antieconómica su adopción a pesar de la buena performance del mismo.

### ***Acroceras macrum en Argentina***

Material de *A. macrum* (trozos de rizomas y/o pequeñas cantidades de semillas de polinización abierta), experimentalmente obtenido dentro de un plan de mejoramiento que se llevó a cabo durante la década de 1970 en el Range and Forage Institute dependiente del Agricultural Research Council (ARC-RFI) en la región de Cedara (en el este de Sudáfrica) fue introducido en varios países; incluyendo Argentina, Paraguay, Brasil, México, Estados Unidos de América, Australia, Nueva Zelanda, Inglaterra y Taiwan (Rhind y Goodenough, 1979). Algunos estudios y evaluaciones agronómicas con el fin de promover la adopción del material en las regiones adecuadas, se han llevado a cabo en Taiwan (Yang y col., 2000; Lee y col., 2004; Lee y col., 2005; Hsu y col., 2005; Wen y col., 2007), Brasil (Rethman y de Witt, 1988; Rodrigues y col., 2004; 2005; Detmann y col., 2009; De Souza Siqueira Campos y col., 2010), México (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, 2008) y en Argentina (Altuve y col., 1994; Royo Pallarés y Goldfarb, 2000; Pizzio y col., 2004; Mandagarán y col., 2008).

En Argentina, los primeros materiales de los que se tiene registro ingresaron en la década de 1980 mediante productores de la región nordeste del país (registros del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA). Estos productores plantaron y utilizaron la especie en zonas de bañados y malezales con tan buenos resultados que durante la década de 1990 el INTA decide introducir oficialmente material experimental del ARC-RFI que consistió tanto en trozos de rizomas como en pequeñas cantidades de semillas, las cuales resultaron fértiles (registros del INTA). Se establecieron pequeñas parcelas de introducción que por no disponerse de un proyecto que proveyera de fondos y personal que posibilitara su

evaluación y manutención, se mezclaron haciendo imposible la posterior identificación de las líneas originales (com. pers. de C. Goldfarb). Los lotes abandonados fueron destinados a otros fines, pero las plantas persistieron. Finalmente se recuperó el interés por la especie en la institución y se realizaron evaluaciones de mayor magnitud en campos de productores (Royo Pallarés y Altuve, 2000; Royo Pallarés y Goldfarb, 2000; Pizzio y col., 2004; Mandagarán y col., 2008), pero desconociendo el origen genético del material evaluado (com. pers. de C. Goldfarb y O. Royo Pallares).

De cualquier manera, interesante información surge a partir del material evaluado, que debido a las circunstancias narradas llevaba varios años de adaptación y selección natural en el ambiente del nordeste argentino, especialmente en la porción sur del área de malezales de Corrientes y la región de albardones del Río Paraná, con temperaturas medias anuales entre 20 y 22 °C, inviernos benignos, pero con riesgo de heladas de mayo a septiembre, y lluvias entre 1100 y 1500 mm anuales. Los suelos en estas áreas (heterogéneos, principalmente del orden de vertisoles, molisoles y alfisoles) se caracterizan por ser ácidos, pobres en materia orgánica, fósforo y otros minerales, de baja conductividad eléctrica y en ocasiones con concentraciones de aluminio que superan los 2 cmol Kg<sup>-1</sup>, lo cual puede resultar tóxico para los vegetales (Royo Pallarés y Goldfarb, 2000; Mandagarán y col., 2008). Sin embargo, en un ensayo con pasturas de entre 4 y 5 años de establecimiento en regiones de bañados, donde la humedad está presente todo el año y hay periodos de anegamiento, la producción de *A. macrum* no se vio afectada por la concentración de aluminio, la acidez del suelo ni la falta de fertilización (Mandagarán y col., 2008). En esas condiciones, donde el agua no fue el factor limitante, las variaciones en las tasas de crecimiento estuvieron en función a la época del año, respondiendo al parecer más a la fluctuación térmica que a otros factores; sin embargo, Detmann y col. (2009), en otro tipo de estudio que se llevó a cabo en Brasil, reportaron baja tolerancia a condiciones de déficit hídrico, que se manifestó tanto en la morfología de los órganos vegetativos como en la reducción de la capacidad fotosintética. El crecimiento en esta especie empezó aproximadamente un mes antes que lo que se observó para pasturas C<sub>4</sub>, extendiéndose toda la primavera y verano, desde septiembre a marzo; y su pico estuvo en octubre (Mandagarán y col., 2008). Si bien el rendimiento en biomasa de *A. macrum* (3500 a 6300 kg MS ha<sup>-1</sup> /año<sup>-1</sup>) (Altuve y Bendersky, 2003) no suele ser extraordinario en comparación con los rendimientos que suelen obtenerse (en otros suelos) en el nordeste con otras pasturas comerciales como *Chloris gayana* (6000 a 12000 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), *Digitaria*

*eriantha* (8000 a 10000 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), *Setaria sphacelata* (6000 a 10000 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), *Dicanthium spp.* (6000 a 9000 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), *Panicum coloratum* (6000 a 8000 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) o *Brachiaria brizantha* (4500 a 8000 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) (Altuve y Bendersky, 2003). La ganancia de peso animal que se obtiene para similar carga (1,4 a 1,7 vaq ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) con *A. macrum* (167 kg por vaquilla por año) es similar o superior que la obtenida con las demás especies (entre 131 y 166 kg por vaquilla por año) y ciertamente la producción de carne por superficie (254 Kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) fue muy superior cuando 1,52 animales ha<sup>-1</sup> pastorearon *A. macrum* (Altuve y Bendersky, 2003) que cuando se cargó 1 animal ha<sup>-1</sup> en los pastizales naturales de albardones y malezales (77 y 94 Kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, respectivamente) (Mandagarán y col., 2008).

La longitud del periodo de descanso entre pastoreo afectó el contenido proteico, el rendimiento y la digestibilidad de *A. macrum*, pudiéndose encontrar el descanso óptimo entre seis y nueve semanas (Royo Pallarés y Goldfarb, 2000; Hsu y col., 2005; Rodrigues y col., 2005; Detmann y col., 2009). De cualquier manera, ese efecto no fue demasiado pronunciado y la calidad continuó siendo buena (Royo Pallarés y Goldfarb, 2000; Hsu y col., 2005; Rodrigues y col., 2005; Detmann y col., 2009). *Acroceras macrum* mostró ser adecuada, no sólo para pastoreo rotacional sino también para silaje y pastoreo diferido (heno en pie) ya que la madurez del pasto no afectó dramáticamente su calidad (Rodrigues y col., 2004; 2005).

## EL MODO DE REPRODUCCIÓN EN LAS GRAMÍNEAS

Las gramíneas, como la mayor parte de las angiospermas, se reproducen sexualmente; pero es común también que posean elementos que les permiten la propagación mediante mecanismos clonales. Muchas especies poseen estolones y/o rizomas, tallos que se han modificado de forma de permitir el contacto con el suelo y la humedad para generar raíces a partir de las yemas meristemáticas de los nudos, y así generar nuevas plántulas. Estos mecanismos de reproducción asexual dependen exclusivamente de la división mitótica de células somáticas, y los individuos generados son réplicas exactas (clones) del individuo que los originó, cuya única posibilidad de cambio es que se produzca una mutación en la célula que origina el propágulo. Por lo tanto, no habiendo cambios genéticos, las sucesivas progenies asexuales constituyen una única generación extendida en el tiempo (Mishra, 2005; Mishra, 2009).

Pero las estructuras reproductivas características de las gramíneas consisten en inflorescencias con flores bisexuales o unisexuales que generan cariósides (“semilla”) (Clark, 2004). La semilla puede ser producto de un proceso sexual, con dos orígenes alternativos: la polinización cruzada, donde los gametofitos que intervienen en la fecundación provienen de individuos diferentes (alogamia); o la autopolinización, donde ambos gametofitos pertenecen al mismo individuo (autogamia). Pero además de las vías sexuales, en algunas especies la semilla puede ser el resultado de un proceso clonal: la agamosperma (reproducción asexual mediante semillas) (Richards, 2003).

Las gramíneas tienden a ser oportunistas, colonizando ecosistemas fluctuantes o que se encuentran perturbados por diferentes tipos de estrés climático, la acción del fuego, el pastoreo intenso o la agricultura. Gran parte de su éxito en estos entornos se debe a su versatilidad en el modo de reproducción, mediante sistemas sensibles a los cambios, lo cual es el complemento clave de la diversidad en atributos morfológicos y fisiológicos que pueden contribuir a adaptarse a diferentes condiciones (Watson, 1990).

Las especies que se describen como autógamas obligadas presentan niveles muy bajos de alogamia, esto restringe el flujo génico entre las poblaciones, garantizando la homogeneidad de la especie (Strasburger y col., 2004). En las angiospermas es raro el caso de la autogamia como único mecanismo de propagación y por el contrario la autogamia y alogamia se dan en proporciones que dependen del genotipo, de la variedad, de las condiciones ambientales en las que se desarrolla, de la presencia de polinizadores, entre otros (Barret y col., 1996; Lloyd y Schoen, 1992). Las especies en las que la autogamia es común, pero la alogamia no es rara, se dice que son autógamas facultativas (Strasburger y col., 2004). Las plantas de especies autógamas son, por lo general anuales, con flores pequeñas y sin mecanismos de atracción de agentes polinizadores, éstas son en general bisexuales y homógamas (donde el androceo y gineceo maduran simultáneamente); incluso en algunos casos pueden presentar cleistogamia para favorecer la autopolinización (Barret y col., 1996). Las especies alógamas, por su parte, pueden valerse de la dioecia, monoecia o la dicogamia para favorecer la polinización cruzada (Richards, 1997). La autogamia es una estrategia útil cuando el éxito en la reproducción es más importante que la producción de nuevos genotipos (Barret y col., 1996). Debido a la complejidad de sus cariotipos, la autogamia tiene algunas ventajas sobre la alogamia como mecanismo en la reproducción sexual, cuando se trata de poliploides (Lloyd y Schoen, 1992; Barringer, 2007), pero conduce a la pérdida de diversidad

y reduce la capacidad de superar los mecanismos de selección natural (Richards, 1997; Charlesworth, 2006). La alogamia, por su parte, es más ventajosa que la autogamia o la propagación clonal desde el punto de vista evolutivo y adaptativo, es esencial para seleccionar genotipos superiores y eliminar mutaciones desventajosas (Richards, 1997; Charlesworth, 2006). Por ese motivo, a lo largo de la evolución se han ido desarrollando mecanismos que favorecen la alogamia, con una tendencia evolutiva hacia la autoincompatibilidad. En algunas especies, se favorece la alogamia mediante la monoecia y la dioecia, (pese a que el hermafroditismo sigue siendo una situación extremadamente frecuente) o la maduración asincrónica de los verticilos florales (dicogamia) (Richards, 1997; Strasburger y col., 2004). Otros muchos mecanismos actualmente se estudian en relación a la evolución del sistema reproductivo (Lloyd y Schoen, 1992; Charlesworth, 2006). La propagación clonal, puede considerarse un mecanismo adaptativo que permite la persistencia en tiempo y espacio de genotipos que han sido exitosos en el medio ambiente. Tiene la ventaja de ser relativamente poco costoso, ya que no requiere de los accesorios de la reproducción sexual, necesarios por ejemplo para la atracción de polinizadores o la producción de polen. En contraste, tiene la desventaja de que las plantas pueden tener una dispersión reducida si su multiplicación es por propágulos grandes sin mecanismos desarrollados con ese fin (Richards, 1997; Mishra, 2005; Mishra, 2009). Esta limitación se puede superar produciendo semillas asexualmente como en la apomixis (Mishra, 2005; Mandujano Sánchez, 2007; Mishra, 2009). En algunas taxa, el crecimiento clonal puede expresarse como una opción ecológica; es decir que aunque no sea parte de su programa de desarrollo, ciertas condiciones ambientales pueden favorecer o propiciar la aparición de la clonalidad en una planta (Mandujano Sánchez, 2007).

El proceso de formación de semillas agámicas puede seguir diferentes modelos según la especie, pero en la formación del embrión no se involucra meiosis ni fecundación, resultando en individuos genéticamente idénticos a la planta madre (Crane, 2001). Por el contrario, en el proceso de reproducción sexual, la meiosis es un paso clave, ya que de ello depende la formación de las gametas. En la Profase I, los cromosomas homólogos se emparejan formando complejos de intercambio de información, los cuales se mantienen unidos por el entrecruzamiento que se produce en cada punto de intercambio (quiasma). Los complejos de cromosomas asociados se comportan como un único cromosoma mitótico durante la Anafase I, etapa en la cual la separación no será de cromátidas sino de cromosomas homólogos. Como resultado, la mitad del número de cromosomas, que constituye

(idealmente) un genomio completo, migra a cada polo. El entrecruzamiento resulta en la “recombinación” de la información genética entre el par del quiasma, por lo cual la meiosis no sólo reduce a la mitad la dotación de cromosomas sino que permite formar una enorme variedad de gametos con diferentes combinaciones de la información genética de los cromosomas homólogos en cada progenitor. A su vez, durante la fecundación los gametos se combinan al azar para formar el cigoto, por lo cual las diferentes posibilidades de combinaciones génicas al cabo del proceso sexual son infinitas; con lo cual sólo puede producirse un individuo idéntico al parental si hay homocigosis total para todos los genes (reproducción sexual dentro de una línea pura). Dado que los mecanismos de reproducción asexual no involucran un proceso meiótico para la formación de las gametas, no hay otro mecanismo de reproducción que pueda producir mayor variabilidad que la sexualidad (Cubero, 2003). La variación genética de una población, por lo tanto, depende en gran medida de su frecuencia de reproducción sexual (Richards, 1997; Berthaud, 2001). Las especies clonales presentan niveles altos de heterocigosis y la diversidad genética no difiere entre especies que presentan reproducción sexual con respecto a las que presentan tanto sexual como clonal (Mandujano Sánchez, 2007). El éxito del sexo en la competencia con las alternativas asexuales depende de que en los nuevos genotipos, se hayan logrado combinaciones superiores de atributos adaptativos, lo cual es más probable cuanto mayor sea la diversidad generada (Richards, 1997; Richards, 2003). Por otro lado, la conservación de los cambios adaptativos durante generaciones, que es característica de la apomixis, es ventajosa cuando el ambiente se mantiene estable. Como resultado, es común entre las gramíneas que la producción de semilla apomíctica sea compatible con el desarrollo de procesos sexuales en la misma planta (apomixis facultativa), lo cual permite en las poblaciones lograr un equilibrio entre la adaptación al ambiente y el mantenimiento de los cambios. Sólo en algunas especies el sexo se reduce casi a la nulidad, pero incluso en ese caso persiste un remanente de variabilidad a través de la recombinación somática y la acumulación de mutaciones. Las poblaciones donde se observa reproducción apomíctica pueden ser muy variables, aunque siempre mucho menos que las poblaciones donde la reproducción es netamente sexual (Richards, 2003).

La agamosperma o apomixis gametofítica se da con especial frecuencia en la familia *Poaceae*, donde ha sido reportada en una o más especies dentro de las tribus *Andropogoneae* (incluyendo *Maydeae*), *Agrostideae*, *Aveneae*, *Chlorideae*, *Festuceae*,

*Paniceae* y *Triticeae*. De ellas, *Paniceae* y *Andropogoneae*, son las tribus donde mayor número de especies apomícticas se han encontrado (Brown y Emery, 1958). Entre las paníceas tropicales y subtropicales más importantes donde se ha reportado apomixis se incluyen especies de los géneros *Brachiaria* (Quero Carrillo y col., 2010), *Cenchrus* (Quero Carrillo y col., 2010), *Panicum* (Quero Carrillo y col., 2010), *Paspalum* (Brown y Emery, 1958; Quero Carrillo y col., 2010), *Pennisetum* (Brown y Emery, 1958; Quero Carrillo y col., 2010), *Setaria* (Brown y Emery, 1958) y *Urochloa* (Quero Carrillo y col., 2010).

En los sacos embrionarios apomícticos, la ovocélula es  $2n$  y a partir de ella se desarrolla el embrión por partenogénesis. Así, la característica que define la agamosperma es el desarrollo del embrión sin que ocurra un proceso meiótico reduccional ni de fecundación, lo cual genera descendientes genéticamente idénticos a su madre. Esto determina la importancia práctica de la apomixis, esto es que puede fijar la heterosis, lo cual tiene un impacto potencial en la agricultura (Toenniessen, 2001). Mientras en el mecanismo sexual los procesos de reducción meiótica y fecundación, se combinan para conservar el nivel de ploidía  $2n$ , en la apomixis gametofítica la ausencia de reducción se combina con partenogénesis para mantener el nivel de ploidía en el embrión. Las semillas apomícticas de gramíneas, pueden originarse por dos caminos que difieren en la célula que da origen al saco embrionario y al embrión. Uno de estos mecanismos es la diplosporia y el otro, que es el que más comúnmente se observa en esta familia es la aposporia (Brown y Emery, 1958; Quero Carrillo y col., 2010).

La mayor parte de las gramíneas tropicales requieren de polinización aun cuando estén produciendo semilla por la vía apomíctica. Esto es porque el desarrollo del endospermo, que es independiente del desarrollo del embrión por partenogénesis y sin que se fecunde la ovocélula, requiere de la fecundación de los núcleos polares. Esta característica se denomina pseudogamia, y es muy común en especies apospóricas, en las cuáles justifica mantener la producción de polen fértil. Otra característica muy frecuente en las especies apomícticas, es que la producción de semilla puede ser compatible con el desarrollo de procesos sexuales en la misma planta (apomixis facultativa), siendo posible en algunos casos que la ovocélula en el saco embrionario no reducido sea posteriormente fecundada. Esta sexualidad residual mantiene la diversidad en citotipos con niveles de ploidía predominantemente apomícticos por ejemplo dentro de complejos agámicos de *Panicum*, *Paspalum* y *Tripsacum* (Berthaud, 2001).

La apomixis es un carácter heredable, aunque su control genético no está aun completamente esclarecido. No se ha observado apomixis al nivel de ploidía diploide, esto puede deberse a la falta de expresión de la apomixis a nivel diploide, o a la ausencia de transmisión del carácter mediante gametas haploides (Berthaud, 2001). La evolución propició la transferencia en conjunto de los genes que confieren la capacidad de formar semilla apomítica; pero a su vez, la permanencia de estos grupos de genes generación tras generación en las especies apomíticas los convierte en blancos para la acumulación de mutaciones recesivas desventajosas. De esta manera podría explicarse la falta de éxito de los genes de la agamosperma en diploides y que en consecuencia, las especies que producen semillas apomíticas suelen frecuentemente poliploides, altamente heteróticas e híbridos (Richards, 2003). Todos los complejos agámicos contienen dos grupos de ploidías. Los integrantes de menor ploidía son usualmente diploides y su modo de reproducción es exclusivamente sexual por polinización cruzada, en este grupo es donde se observa con mayor frecuencia eventos de recombinación genética y es por lo tanto también donde se presenta la mayoría de la selección de nuevas combinaciones genéticas. En el grupo de mayor ploidía se incluyen usualmente diversos niveles de ploidía que se reproducen de forma apomítica, con una proporción mayor de tetraploides que cualquier otro nivel de ploidía, pero donde también es común encontrar triploides, pentaploides y hexaploides, hasta niveles aún más altos de ploidía. Entre ambos grupos existe un flujo génico. Los triploides se forman por cruzamientos entre diploides y tetraploides, y tetraploides que heredan genes de los diploides se generan por la fecundación con polen normal (reducido) tetraploide de ovocélulas  $2n$  que ocasionalmente se producen en los diploides, o por la fecundación de sacos embrionarios no reducidos triploides con polen normal diploide (Berthaud, 2001).

### ***La reproducción sexual de las gramíneas***

En la reproducción sexual de las angiospermas intervienen gametofitos reducidos conformados por un bajo número de células en un alto nivel de diferenciación. La formación de los gametofitos femeninos y masculinos transcurre en órganos y por mecanismos diferentes, pero en ambos casos incluye una fase esporogénica, que involucra la meiosis (proceso reduccional) de una célula madre ( $2n$ ) originando los esporofitos ( $n$ ); seguida de una fase gametogénica, donde sucesivas divisiones mitóticas de los esporofitos generan los gametofitos. En los ovarios (órgano sexual femenino), la “Célula Madre de la Megaspóra”



(CMM) origina una megáspora (espora femenina) mediante el proceso de “megaesporogénesis” (fase reduccional); ésta posteriormente origina un saco embrionario (gametófito femenino o megagametófito) mediante la “megagametogénesis”. En los sacos polínicos de las anteras (órgano sexual masculino), la “Célula Madre del grano de Polen” (CMP) da origen a las microsporas (esporas masculinas) mediante el proceso de “microsporogénesis”; éstas posteriormente originan los granos de polen (gametófito masculino o microgametófito) mediante la “microgametogénesis” (Rustishauser, 1982). La fecundación ocurre luego de la polinización y consiste en la fusión de los gametofitos femenino y masculino, generando un cigoto  $2n$ . Sucesivas divisiones mitóticas y diferenciación de células, generan un embrión capaz de dar origen al individuo adulto completo tras los procesos de germinación y crecimiento (Rustishauser, 1982).

### **Desarrollo del gametofito femenino. Macrosporogénesis y megagametogénesis.**

La célula inicial del arquesporio siempre es de origen sub-epidérmico y recibe el nombre de célula madre de las arqueósporas (CMA), puede pasar por algunos ciclos de meiosis antes de que una de las células generadas determine y se diferencie a arqueóspora (Rustishauser, 1982). Una vez determinada como tal, la arqueóspora ya no podrá realizar mitosis, ingresará a la interfase pre-meiótica ya predestinada a comportarse como célula generativa y sólo saldrá de dicha fase si ingresa a la fase de meiosis (Rustishauser, 1982). A partir de que se inicia la división meiótica, la arqueóspora recibe el nombre de célula madre de las megasporas (CMM) y como resultado de dicho proceso se genera una tétrada lineal de megasporas (Rustishauser, 1982). La megaesporogénesis abarca los procesos que conducen a la formación de las megasporas, y es la fase durante la cual transcurre completa la meiosis de las CMP y se producen cuatro núcleos haploides, según la planta, los núcleos pueden estar incluidos en una o hasta en cuatro células (Rustishauser, 1982). Cuando se forman cuatro megasporas, el saco que se origina de ellas se dice que es monospórico y éstas pueden ubicarse en la tétrada en una de las cinco disposiciones posibles: lineal, isolateral, tetraédrica, en forma de T o de T invertida. Si bien en una misma especie pueden encontrarse varias disposiciones comunmente hay preferencia por una (Rustishauser, 1982). Si se forman dos megasporas con dos núcleos cada una, se originarán sacos bispóricos y si el proceso concluye con los cuatro núcleos en una única megaspora porque no se forman paredes o porque éstas se disuelven, el saco que se origine de la cenomegaspora será tetrasporico (Rustishauser, 1982). Cuando se forman sacos monospóricos puede suceder que las cuatro megasporas hayan

desarrollado sacos o que sólo una de ellas desarrolle el saco (megaspóra funcional) mientras las otras tres degeneran. En este último caso la megaspóra funcional es la megaspóra orientada hacia el polo cálazal (o una de las orientadas hacia ese polo si las megasporas no están dispuestas linealmente) en la mayor parte de las especies (Rustishauser, 1982). En la selección de las megasporas intervienen fundamentalmente factores genéticos y también pueden influir los factores ambientales (Rustishauser, 1982). El desarrollo del saco embrionario (megagametofito femenino) a partir de las megasporas se efectúa en dos fases: la somatogénesis y la gametogénesis (Rustishauser, 1982). El número de pasos de división y de núcleos en un saco embrionario depende del número de núcleos de la megaspóra que le dan origen y de su posterior polarización. Es muy común que en las gramíneas el proceso sea monospórico por lo que la descripción de la formación del saco se hará de sacos monospóricos.

La somatogénesis transcurre mientras todavía quedan los restos de las megasporas degeneradas, durante la misma se da el proceso de vacuolización. Este proceso consiste en la formación de dos vacuolas, una encima y una debajo del núcleo de la megaspóra (Rustishauser, 1982). En la gametogénesis se incluye desde la polarización hasta el final de la maduración del saco (Rustishauser, 1982).

El saco embrionario (megagametofito) más común es del tipo *Polygonum*. Está conformado por siete células que se organizan con una clara polaridad, tres de ellas se ubican hacia el polo micropilar y forman el aparato ovular (una ovocélula y dos sinérgidas), una célula que contiene dos núcleos polares y grandes vacuolas se ubica en la región central (Célula Central Binucleada, CCB) y otras tres células denominadas antípodas se ubican hacia el polo cálazal (Rustishauser, 1982).

Durante el desarrollo del saco monospórico la megaspóra pasa por la división mitótica tres veces y produce en total ocho núcleos uniformes. La primera división genera los primeros dos núcleos que quedan separados, uno a cada polo mediante la fusión de las dos vacuolas en una sola vacuola central, de las siguientes divisiones del núcleo micropilar se generará el aparato ovular y del cálazal las antípodas; es decir que el saco pasa por un proceso de polarización (Rustishauser, 1982). Luego de formados los ocho núcleos, éstos se mueven a sus lugares definitivos en el saco y el gametofito, si hasta entonces era cenocítico, genera las paredes y se convierte al estado de siete células, las cuales se empiezan a diferenciar. En el centro de la megaspóra dos núcleos polares se fusionan parcialmente para formar una célula

central grande. El volumen de las células y del saco en sí aumenta, incluso terminada la diferenciación ya que las células sólo así adquieren su forma definitiva; mientras tanto las células de la nucela adyacentes al saco se comprimen y disuelven. Con este proceso descrito se genera un saco del tipo *Polygonum* (Rustishauser, 1982).

Al contrario de lo que ocurre en el polo micropilar, el polo cálazal del saco puede presentar un número final de núcleos variable. En el tipo *Polygonum*, el polo cálazal tiene tres núcleos, uno por cada antípoda; de este tipo de saco hay variantes, donde puede darse una reducción o una multiplicación de núcleos (Rustishauser, 1982). En las poáceas es común encontrar múltiples núcleos, Anton y Cocucci (Rustishauser, 1982), describen que en estas especies las antípodas se dividen dando como resultado un número final de 6 a 300, algunas de las cuales son incluso multinucleadas.

### **Desarrollo del gametofito masculino. Microsporogénesis y microgametogénesis.**

El primer paso en la generación del gametofito masculino es la microsporogénesis, que consiste en la meiosis de las CMPs. Las CMP generalmente se conectan entre sí por puentes citoplasmáticos para que sus meiosis sean sincrónicas; al promediar la meiosis los puentes se rompen y cada CMP queda aislada de las demás por una pared de calosa. El proceso concluye con la generación de cuatro células hijas, una tétrada de cuatro microsporas, también aisladas entre sí mediante una cubierta de calosa (Rustishauser, 1982). Según el momento en que se formen las paredes y como se orienten los husos acromáticos durante la división del citoplasma, las cuatro células resultantes, se dispondrán de distinta manera en la tétrada (Rustishauser, 1982). En las gramíneas tanto la primera como la segunda división meiótica son sucedidas por la división de citoplasma; las microsporas quedan dispuestas en un mismo plano, y la disposición de las tétradas podrá ser tetragonal, romboidal, lineal o en forma de T (Rustishauser, 1982). Mientras los granos de polen están aún dentro del saco polínico, comienza la microgametogénesis, es decir la formación de los gametos masculinos (Rustishauser, 1982). Cada microspora (haploide) o grano de polen unicelular sufre una división mitótica cuyo resultado es la formación de dos células desiguales: una muy grande, la célula vegetativa (o célula del tubo polínico), y una pequeña (la célula generativa o gametogénica) que queda retraída contra la pared de la microspora. Esta última luego se incluye en el citoplasma de la célula vegetativa, donde queda suspendida y rodeada por su membrana plasmática. La célula generativa, luego sufre una segunda división mitótica originando dos gametos masculinos desnudos (sin pared celular), y así,

como un grano de polen tricelular (la célula vegetativa junto a ambos gametos) es como el grano de polen es liberado por las gramíneas. Una vez que un grano de polen llega al estigma de una flor, una de las células que lo componen desarrolla el tubo polínico y los dos núcleos haploides restantes estarán involucrados en la fecundación, que en las plantas consiste en una doble fertilización: uno de los núcleos generativos fecunda la ovocélula en el saco embrionario, (originando un embrión  $2n$ ), y el otro fecunda la célula binucleada del saco embrionario (dando origen al endospermo de la semilla, el cual será  $3n$ ). Así, la fecundación restablece el número diploide de los cromosomas, de modo que al final la semilla poseerá la mitad de la información genética de cada progenitor (Rustishauser, 1982).

### ***La agamospermia de las gramíneas***

Muchas gramíneas, se pueden reproducir asexualmente mediante semillas apomícticas; éstas pueden ser generadas mediante un mecanismo apospórico, diplospórico o reproducción apomíctica combinada (diplosporia coexistente con aposporia).

En la familia de las poáceas, son relativamente pocos los casos de diplosporia reportados; aun así se pueden citar ejemplos en los géneros *Paspalum* (*Panicaceae*) (Honfi y Quarín, 2012), *Eragrostis* (*Eragrostideae*) (Quero Carrillo y col., 2010), *Poa* (*Poeae*) (Naumova y Vielle-Calzada, 2001; Quero Carrillo y col., 2010), *Elymus* (*Triticeae*) (Quero Carrillo y col., 2010) y *Tripsacum* (*Maydeae*) (Leblanc y col., 1995; Quero Carrillo y col., 2010). Las especies diplospóricas, generan un único saco embrionario, el cual es asexual y no reducido; y se origina a partir de la división mitótica de la célula madre de la megáspora. Éste está conformado por ocho núcleos distribuidos en siete células, tal como es típico observar en los sacos embrionarios meióticos. En algunas gramíneas, como especies de *Poa* (Naumova y Vielle-Calzada, 2001) y *Tripsacum* (Leblanc y col., 1995), se omite por completo la meiosis; la célula arqueosporial se diferencia progresivamente en la CMM y ésta genera en un saco embrionario no reducido después de vacuolización gradual y tres divisiones mitóticas consecutivas. En otros casos puede mediar un ciclo meiótico aberrante que evita la reducción de la ovocélula y la recombinación génica (Richards, 2003); como el caso de *Paspalum arundinellum* y *P. mandiocanum*, donde la meiosis incompleta y la restitución de núcleos durante la primera división meiótica, conduce a la generación de gametos  $2n$  tanto femeninos como masculinos (Honfi y Quarín, 2012). Algunas especies diplospóricas, como ciertos

genotipos 4x y 5x de *Paspalum arundinellum* y *P. mandiocanum*, presentan reproducción apomítica combinada y pseudogamia (Honfi y Quarin, 2012).

Los casos de aposporia, por su parte, son más comunes entre las gramíneas, especialmente en las paniceas, donde se ha reportado por ejemplo en especies de los géneros *Bracchiaria* (Quero Carrillo y col., 2010), *Cenchrus* (Quero Carrillo y col., 2010), *Panicum* (Quero Carrillo y col., 2010), *Paspalum* (Brown y Emery, 1958; Quero Carrillo y col., 2010), *Pennisetum* (Brown y Emery, 1958; Quero Carrillo y col., 2010), *Setaria* (Brown y Emery, 1958) y *Urochloa* (Quero Carrillo y col., 2010). En las especies que presentan aposporia, es frecuente observar un proceso sexual paralelo a uno o varios procesos apospóricos. La poliembrionía es común en estas especies, siendo frecuente que en sus semillas, el embrión sexual y varios asexuales se encuentren juntos. Los embriones apospóricos (uno o más) derivan de una célula somática, por lo cual la CMM puede seguir los procesos que llevan a la formación del saco embrionario sexual de forma independiente. En gramíneas tropicales o subtropicales, las células somáticas que se activan mitóticamente para formar sacos embrionarios apospóricos, normalmente pertenecen a la nucela. Estos sacos, en su forma más común, quedan conformados por una ovocélula flanqueada por dos sinérgidas y una célula central uninucleada, o también se puede observar una ovocélula con una sinérgida y una célula central binucleada. La ovocélula es capaz de dividirse por partenogénesis originando los embriones (Brown y Emery, 1958; Crane, 2001).

La división de los óvulos apospóricos genera embriones viables sin fertilización; sin embargo, la mayoría de las especies apospóricas son pseudogamas y requieren la fertilización de los núcleos polares para el desarrollo del endospermo. Los megagametofitos apospóricos de gramíneas de los géneros *Panicum* y *Pennisetum* siguen mecanismos de formación de los gametofitos femeninos muy similares. En *Panicum maximum* y *Pennisetum ciliare* (*Cenchrus ciliaris* L.), los genotipos sexuales desarrollan un megagametofito monospórico; una sola megaspóra originada por meiosis da lugar al saco embrionario sexual que en ambas especies es del tipo *Polygonum*: dos sinérgidas, la célula huevo, una célula central binucleada cuyos núcleos se fusionan antes de la fertilización, y tres antípodas que proliferan para dar un grupo de células en el polo calazal. Después de la fecundación: tanto del óvulo como la célula central desarrollan la semilla. En los genotipos apomíticos obligados, todas las megasporas originadas por meiosis mueren y no se generan gametofitos reducidos; sin embargo, las células nucleares activas generan gametofitos con cuatro núcleos,

los cuales permanecen en un solo polo celular (Crane, 2001) y se distribuyen entre una ovocélula (no reducida), una o dos sinérgidas y una célula central (la cual queda conformada por uno o dos núcleos polares). En las plantas facultativas, tanto los procesos de desarrollo de gametofitos femeninos sexuales como apospóricos son viables y pueden coexistir dentro de un mismo óvulo, o en diferentes óvulos de la misma inflorescencia. En ambos casos, La fertilización del núcleo polar (o los núcleos) es necesaria para la formación del endospermo de las semillas (Naumova y Vielle-Calzada, 2001).

## LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Si se comparan los individuos de una población o incluso un mismo individuo, muchos caracteres (forma de hojas, tamaño de los frutos, etc.) presentarán diferencias y por lo tanto variación (Strasburger y col., 2004). Hay tres tipos principales de variación que se manifiestan en función a diferentes factores: el primero involucra las diferencias sobre un mismo individuo en las diferentes etapas de su desarrollo, el segundo se compone de los cambios que manifiesta un individuo en respuesta a cambios del entorno (suelo, clima, factores bióticos), y el tercero es la variación entre dos individuos (por ejemplo de una misma familia, población o especie) que presentan características diferentes en un mismo ambiente y estado de desarrollo. Esta última es la manifestación de la variación genética y es la que interesa al mejorador por ser la única que puede transmitirse a la descendencia (Mesén, 1998).

La teoría vigente asume que el fenotipo de cualquier organismo es el fruto de su genotipo más los efectos ambientales a los que se enfrenta durante su desarrollo. Cuando se trabaja con un conjunto de individuos, como es el caso de las poblaciones, el objetivo del mejoramiento es aumentar las frecuencias de alelos deseables, debido a su relación con una o más características de interés. Es común que el abordaje de este objetivo se dé mediante una estrategia basada en la selección, de modo de reunir un conjunto de genotipos selectos cuyos valores medios en las características de interés superen los valores medios de la población de partida.

En los primeros estudios sobre diversidad de especies vegetales, hasta mediados de la década de los sesenta, los marcadores usados en genética y mejoramiento estaban controlados por genes asociados a caracteres polimórficos (es decir que presentaban variación entre los individuos), en general fáciles de identificar visualmente, y cuya evaluación era sencilla y económica. Estos rasgos fenotípicos tenían que ver principalmente con la

morfología de las plantas o algunos rasgos relacionados con la fisiología (coloración, rasgos morfológicos, tamaño, diferencias de crecimiento o comportamiento frente a factores ambientales, etc.). Pero como se explicará más adelante, la variación genética correspondiente a la variación fenotípica en este tipo de rasgos no es fácil de determinar, casi siempre se debía esperar al desarrollo completo de la planta para su manifestación, y sólo se conseguía un pequeño número de ellos que presentaban una asociación significativa con características de interés (Jiménez y Collada, 2000; Cubero, 2003).

A partir de la década del sesenta, el desarrollo de técnicas bioquímicas permitió analizar la variación a nivel de las proteínas. Los marcadores más comunes dentro de esta categoría son los isoenzimáticos o basados en proteínas de reserva, los cuales permitieron superar algunas de las limitaciones de los marcadores morfológicos. Las principales virtudes de los marcadores isoenzimáticos son su expresión codominante por lo que los genotipos homocigotos pueden distinguirse de los heterocigotos con precisión, la posibilidad de encontrar loci polimórficos en casi cualquier especie, el bajo costo económico de la técnica en comparación con otras (Alcántara, 2007), su regulación genética sencilla y su baja influencia ambiental (Cubero, 2003). Sin embargo, el bajo número de sistemas isoenzimáticos disponibles representa una muy baja proporción del ADN genómico, por lo cual no se puede detectar gran parte de la variabilidad (Alcántara, 2007); por otro lado, no siempre se los puede relacionar con rasgos de interés para el mejoramiento, ya que están influenciados por el estado fisiológico o de desarrollo o la planta, o dependen del órgano estudiado (Cubero, 2003) y la técnica además de laboriosa es poco reproducible entre laboratorios (Alcántara, 2007).

A partir de la década del 70 fue posible estudiar directamente la variación en la molécula de ADN con el advenimiento de los marcadores moleculares basados en el ADN (Cubero, 2003). Las técnicas basadas en marcadores moleculares poseen muchas ventajas respecto a los estudios de marcadores morfológicos o bioquímicos. El estudio de secuencias nucleotídicas con marcadores moleculares, por lo general involucra varios cientos o miles de caracteres, en contraste con los estudios de marcadores morfológicos o bioquímicos, en los que rara vez es posible incluir más de cien caracteres (Alcántara, 2007). Además, las técnicas moleculares poseen una elevada capacidad para detectar diversidad ya que permiten analizar amplias regiones del genoma (Alcántara, 2007). Además, debido a que los datos moleculares trabajan directamente con la base genética de la variación, mientras que la base genética de la mayoría de los caracteres morfológicos se asume (Alcántara, 2007), son independientes de las

condiciones ambientales y del estado fisiológico o de desarrollo del individuo (por lo cual se pueden estudiar incluso en el estado de plántula) (Cubero, 2003). Otras ventajas importantes son su alta heredabilidad y el hecho de que pueden estar relacionados tanto a la información que se expresa como a la que no se expresa, permitiendo la detección de mutaciones silenciosas y de diversidad neutral (en regiones génicas que no están involucradas en la expresión de ningún carácter) (Cubero, 2003). Por otro lado, suele ser fácil obtenerlos y en general son económicos de detectar, se pueden estudiar en cualquier tipo de célula que contenga núcleo y en la actualidad se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones (Cubero, 2003).

Sin embargo, dado que se ha vuelto cada vez más necesario el conocimiento de las características del germoplasma, la diversificación varietal y la selección del tipo adecuado de planta que se adapten a la heterogeneidad de climas y territorios, más aún en regiones donde los recursos energéticos, fertilizantes y pesticidas son de uso limitado o controversial (Alcántara, 2007); las ventajas y el uso extendido de los marcadores moleculares basados en el ADN no desplazaron el uso de los marcadores fenotípicos sino que ambas técnicas se utilizan como enfoques complementarios en estudios de la diversidad. La variabilidad de los caracteres fenotípicos da indicios de importantes características poblacionales como la amplitud de la base genética, el modo de reproducción, la heterosis y el nivel de ploidía (Pohelman y Sleper, 2003). Una buena correlación entre los métodos moleculares y fenotípicos es el indicador deseado de que las características evaluadas son heredables en un grado aceptable (Pohelman y Sleper, 2003).

### ***Marcadores basados en secuencias de ADN***

La variabilidad genética de una especie no puede ser exhaustivamente medida, ya que es imposible examinar el genoma completo de cada individuo para obtener la variación total de la especie. Sin embargo, si se toma una muestra de una población es posible estimar su variabilidad genética respecto a un grupo de características o marcadores.

De acuerdo con la Teoría Neutral de la evolución en eucariotas propuesta por Motoo Kimura en 1968, la selección natural no afecta de igual modo a todas las regiones del genoma, por lo cual, mientras las frecuencias alélicas de las secuencias “neutrales” dependen principalmente de procesos tales como la migración y la deriva génica, el mantenimiento de nuevos fenotipos surgidos por mutación depende principalmente de su valor selectivo



(Castillo Cobán, 2007). Por lo tanto, se podría hablar de dos tipos de variación genética: una diversidad neutral y una diversidad fenotípica, que es la que está relacionada tanto con los caracteres con valor adaptativo como con los que tienen valor puramente agronómico. Para determinar la cantidad y distribución de la diversidad genética en una especie se requiere el análisis de ambos tipos de variación, pues la acción de distintos procesos sobre cada tipo de caracteres hace que los patrones de variación no se correspondan entre sí (Jiménez y Collada, 2000).

Actualmente se dispone de una amplia variedad de marcadores de ADN, tales como los que involucran Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), Repeticiones de Secuencias Simples (SSR), Repeticiones de Secuencias Simples Interpuestas (ISSR), entre otros. Entre los inconvenientes comunes a las técnicas de marcadores moleculares que se basan en polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados, uno de los principales es la necesidad de asumir que los fragmentos comigrantes son homólogos, lo cual no necesariamente es real (Robinson y Harris, 1999). Estos marcadores se han aplicado ampliamente en estudios genéticos de diferentes especies de gramíneas, principalmente para estudios de diversidad genética, identificación de genotipos, mapeo genómico y análisis de filogenia (Jiménez y Collada, 2000; Cubero, 2003; Alcántara, 2007). Actualmente la técnica de RFLP (la primera de ellas en utilizarse) prácticamente ha sido desplazada por las técnicas basadas en la PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction) como RAPD, AFLP, ISSR; las cuales se utilizan para el análisis de múltiples *loci* al igual que la de RFLP, pero la han superado en diferentes aspectos (Jiménez & Collada, 2000).

Las principales ventajas y desventajas de la aplicación de las técnicas de uso habitual en vegetales, que involucran marcadores moleculares basados en la PCR (Robinson y Harris, 1999; Jiménez y Collada, 2000; Cubero, 2003; Alcántara, 2007), se encuentran en la

Tabla 1.

**Tabla 1. Marcadores moleculares basados en secuencias de ADN comúnmente utilizados en la familia *Poaceae*, sus principales ventajas y desventajas, y citas que ejemplifican su aplicación en diferentes géneros de la misma.**

Marcador	Tipo de polimorfismo detectado	Ventajas del marcador	Desventajas del marcador	Citas en la familia <i>Poaceae</i>
RFLP	Cambio de bases, inserciones, deleciones	<p>Amplia cobertura del genoma, en regiones codificantes y no codificantes.</p> <p>No requiere conocimiento de secuencia.</p> <p>Herencia codominante.</p> <p>Multialélico.</p> <p>Disponibilidad ilimitada de <i>loci</i>.</p> <p>Altamente transferible entre especies.</p>	<p>Técnica laboriosa, lenta y de alto costo.</p> <p>Mayores requerimientos de material genético e inferior capacidad de detección de polimorfismos respecto a las técnicas basadas en PCR.</p>	<p><i>Paspalum</i> (Pupili y col., 1997; Jarret y col., 1998)</p>
AFLP	Cambio de bases, inserciones, deleciones	<p>Amplia cobertura del genoma, en regiones codificantes y no codificantes.</p> <p>No requiere conocimiento de secuencia.</p> <p>Más abundantes que los SSR o ISSR.</p> <p>Disponibilidad de alelos ilimitada.</p> <p>Capacidad de detectar polimorfismo superior a la de RFLP o RAPD.</p> <p>Transferible entre especies.</p> <p>Requiere muy poca cantidad de material genético.</p>	<p>Herencia dominante.</p> <p>Técnica lenta, trabajosa y de alto costo.</p>	<p><i>Triticum</i> (Manifesto y col., 2001); <i>Paspalum</i> (Espinoza y col., 2006; Rebozzio y col., 2012; Sartor y col., 2013); <i>Cynodon</i> (Kang y col., 2008); <i>Brachypodium</i> (Filiz y col., 2009)</p>

<b>RAPD</b>	Cambio de bases, inserciones, deleciones	<p>Amplia cobertura del genoma, (regiones codificantes y no codificantes).</p> <p>Abundancia superior que la de SSR o ISSR.</p> <p>No requiere conocimiento de secuencia.</p> <p>Disponibilidad de alelos ilimitada.</p> <p>Bajo costo.</p> <p>Requiere muy poca cantidad de material genético.</p> <p>Transferible entre especies.</p>	<p>Herencia dominante.</p> <p>Técnica poco transferible (baja repetibilidad).</p> <p>Dificultad media a alta.</p> <p>Su capacidad de detectar polimorfismo es media, menor que otras técnicas.</p>	<p><i>Heteropogon</i> (Carino y Daehler, 1999); <i>Oriza</i> (Qian y col., 2001); <i>Paspalum</i> (Daurelio y col., 2004); <i>Buchloe</i> (Budak y col., 2004); <i>Cynodon</i> (Gulsen y col., 2009); <i>Pennisetum</i> (de Lima y col., 2011); <i>Panicum</i> (Nageswara-Rao y col., 2012)</p>
<b>ISSR</b>	Cambio de bases, inserciones, deleciones	<p>Amplia cobertura del genoma, en regiones hipervariables.</p> <p>No requiere conocimiento de secuencia.</p> <p>Disponibilidad de alelos ilimitada.</p> <p>Capacidad de detectar polimorfismo superior a la de RFLP y RAPD.</p> <p>Transferible entre especies.</p> <p>Técnica altamente repetible.</p> <p>Dificultad, costos y requerimientos de cantidad de material genético bajos.</p>	<p>Herencia dominante.</p>	<p><i>Oriza</i> (Qian y col., 2001); <i>Eragrostis</i> (Assefa y col., 2003); <i>Buchloe</i> (Budak y col., 2004); <i>Paspalum</i> (Cidade y col., 2008; Reyno y col., 2012; Brugnoli y col., 2014); <i>Bracchiaria</i> (Jungmann y col., 2010); <i>Cynodon</i> (Gulsen y col., 2009; Li y col., 2011; Farsani y col., 2012; Wang y col., 2013) <i>Pennisetum</i> (de Lima y col., 2011);</p>

<b>SSR</b>	Cambio en la longitud de unidades de repetición	Amplia cobertura del genoma, en regiones hipervariables. Herencia codominante. Altamente heteróticos. Disponibilidad alélica ilimitada. Capacidad de detectar polimorfismo superior a la de RFLP y RAPD. Transferibles entre especies emparentadas. Técnica altamente repetible. Requiere de poca cantidad de material genético.	Requieren conocimiento de secuencia. Menos transferible entre especies poco emparentadas que ISSR o RAPD. Dificultad y costos medianos a altos	<i>Triticum</i> (Manifesto y col., 2001; Fufa y col., 2005) <i>Buchloe</i> (Budak y col., 2004); <i>Bracchiaria</i> (Jungmann y col., 2010); <i>Paspalum</i> (Cidade y col., 2010; Cidade y col., 2013); <i>Saccharum</i> (Pandey y col., 2011); <i>Cynodon</i> (Wang y col., 2013)
------------	---	---	--	---

Entre los marcadores más utilizados para evaluar la diversidad genética, se destacan los que amplifican secuencias de ADN nuclear en regiones microsátélites. Las regiones microsátélites consisten en secuencias cortas que se repiten en tándem y se encuentran distribuidas por todo el genoma (más o menos homogéneamente, cada 10 a 20 Kb) flanqueadas por regiones de copia única, variando en secuencias y ubicación según la especie o el cromosoma del cual se trate. Tanto la secuencia de repetición como las secuencias que la flanquean suelen ser bastante conservadas (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004). La tasa de cambio evolutivo dentro de los microsátélites es considerablemente más alta ( $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ) que en la mayoría de los otros tipos de secuencias de ADN, por lo que la probabilidad de polimorfismo en estas secuencias es mayor. Consisten en repeticiones, generalmente de 2 a 6 nucleótidos, dispuestas en tándem. Dado que el número de repeticiones es hipervariable, muestran a menudo decenas de alelos en un *locus*. Las secuencias repetitivas más abundantes entre las plantas son  $(AT)_n$  y  $(GT)_n$ , pero los cebadores basados en  $(AT)$  se autohibridan y suelen no amplificar. En general, los cebadores con repeticiones  $(AG)_n$ ,  $(GA)_n$ ,  $(CT)_n$ ,  $(TC)_n$ ,  $(CA)_n$ ,  $(AC)_n$  muestran mayor polimorfismo que los cebadores con repeticiones de otros di, tri o tetra-nucleótidos, aunque también hay repeticiones mucho más específicas de ciertos grupos de plantas como CCG/GCC que son mucho más comunes en arroz que en otros grupos de cereales o en dicotiledóneas (Pradeep Reddy y col., 2002). Los microsátélites se localizan principalmente en regiones no codificantes, aunque también es posible encontrarlas en regiones codificantes, pero cualquiera sea el caso en general el efecto ante la selección es neutro es decir que el poseer uno u otro alelo no beneficia ni perjudica al individuo.

Actualmente se han adoptado en muchas aplicaciones biológicas, entre ellas, el estudio de la diversidad genética y la estructura genética de las poblaciones mediante marcadores moleculares que involucran diferentes estrategias de amplificación por PCR y diseño de cebadores (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004). La hipervariabilidad y su distribución cubriendo todo el genoma, convierten a los marcadores capaces de amplificar las regiones de microsatélites, en una herramienta especialmente útil para la estimación de niveles bajos de variabilidad genética (por ejemplo, la existente dentro y entre variedades, incluso si están estrechamente emparentadas) así como también, para estudiar la mezcla genética entre ellas, análisis de parentesco y para el mapeo de *Loci* de Caracteres Cuantitativos (QTL, del inglés Quantitative Trait *Loci*) (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004).

Dentro de las técnicas de marcadores basadas en la amplificación de secuencias en la zona de microsatélites, la técnica de elección suele ser la de SSRs (del inglés Single Sequence Repeats). La técnica de SSRs utiliza cebadores que hibridan en las regiones flanqueantes a las repeticiones y son de naturaleza codominante, esto implica que cada cebador será específico para un único *locus* y las diferentes bandas amplificadas con cada cebador estarían representando un alelo diferente (Robinson y Harris, 1999). Se han utilizado para estudiar diversidad, heterosis y mapeo de características de rendimiento en varias especies (

Tabla 1), pero hay dos principales limitantes para su aplicación: la necesidad de identificación del *loci* de microsatélites en el organismo a estudiar y la secuenciación de las regiones flanqueantes para diseñar los cebadores. Identificar estos *loci* involucra metodologías complejas y de elevado costo; y si bien es posible transferir los cebadores entre especies emparentadas, el tiempo y el costo que implica su diseño limitan las especies vegetales en las que están disponibles (Robinson y Harris, 1999; Jiménez y Collada, 2000; Cubero, 2003; Alcántara, 2007). Además, la necesidad de usar geles de alta resolución (en general de poliacrilamida) para separar los fragmentos, ya que éstos usualmente difieren muy poco en tamaño, también eleva los costos y dificulta la aplicación de la técnica (Rakoczy-Trojanowska y Bolibok, 2004). Por otro lado, la interpretación puede dificultarse debido a resbalones

(“slippage”) de la enzima *Taq* polimerasa durante el proceso de amplificación, esto provoca que los productos de amplificación de un mismo alelo para un *locus* difieran en tamaño y generen bandas poco intensas que acompañan a la banda principal o chorreados (Robinson y Harris, 1999).

La técnica de ISSR se ha introducido en la metodología experimental por haber demostrado ser eficiente, reproducible, fácil de realizar, y relativamente de bajo costo. El método involucra PCR, donde los cebadores ISSR reconocen e hibridan ya sea en extremos 5' o 3' de repeticiones simples de di, tri, tetra o pentanucleótidos, con una orientación opuesta de una con respecto a la otra, con lo cual se amplifica la región contenida entre dichas repeticiones. Los cebadores anclados en el extremo 3' dan patrones de bandas más claros en comparación con los anclados en extremo 5' (Pradeep Reddy y col., 2002). Los ISSR son marcadores de naturaleza dominante, son más simples de usar que los SSR, dado que no requieren el conocimiento de las secuencias flanqueantes para el diseño de los cebadores, son fácilmente transferibles entre especies y generan un alto número de marcadores sobre *loci* microsatélites distribuidos más o menos homogéneamente por todo el genoma (Robinson y Harris, 1999). Estos marcadores se han convertido en una muy útil herramienta alternativa en la detección de polimorfismos. Trabajos actuales los han aplicado con resultados satisfactorios para el análisis de diversidad tanto en especies forrajeras (cultivadas y nativas) como *Cynodon dactylon* (Farsani y col., 2012; Wang y Ruan, 2012; Gulsen y col., 2009), *Paspalum notatum* (Cidade y col., 2008; Reyno y col., 2012), *Paspalum simplex* (Brugnoli y col., 2013; 2014), *Pennisetum purpureum* (de Lima y col., 2011), *Saccharum* ssp. (da Costa y col., 2011), como en cultivos arbóreos, por ejemplo *Prunus avium* (Ganopoulos y col., 2011), *Cydonia oblonga* (Ganopoulos y col., 2011), *Corylus avellana* (Ferreira y col., 2010), entre otras. En cuanto a su comparación con otros métodos de análisis de la diversidad, Fu y col. (2008) detectaron mayor diversidad con ISSR que con SRAP (del inglés, Sequence Related Amplified Polymorphism), técnica que detecta polimorfismos en secuencias codificantes, al trabajar con especies ornamentales herbáceas del género *Dianthus*. Dentro de las técnicas que detectan polimorfismos que se encuentran por todo el genoma, mayormente en regiones no codificantes, varios trabajos compararon resultados entre ISSR y RAPD, sobre todo en especies cuyo genoma no está secuenciado; Se obtuvieron mejores resultados en cuanto a diversidad intrapoblacional detectada y separación de grupos de poblaciones con la técnica basada en ISSR respecto a la técnica que utiliza RAPD en el trabajo de Sarwat y col. (2008)

con la maleza herbácea *Tribulus terrestris* y en el de Qian y col. (2001) con el arroz silvestre *Oriza granulata*. Por su parte, Goulão y col. (2001) reportaron, en *Castanea sativa*, mayor número de bandas por cebador y mejor reproducibilidad trabajando con la técnica basada en ISSR que con la de RAPD; mientras que Muthusamy y col. (2008) analizaron la diversidad de la leguminosa *Vigna umbellata* y debieron trabajar con el doble de cebadores RAPD que de ISSR para que las diversidades detectadas con la primer técnica supere a la de los ISSR. Al comparar la técnica con otras basadas en polimorfismo en la zona de secuencias de microsátélites, pero que involucra marcadores codominantes, se ha reportado mejor poder de resolución con la técnica de ISSR respecto a SSR en la especie cultivada arbórea *Prunus avium* (Ganopoulos y col., 2011), y una resolución similar de los ISSR respecto a SSR en la hierba fabácea *Phaseolus vulgaris* (Sicard y col., 2005). También fue similar la resolución de la técnica de SAMPL (del inglés, Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Locus) en el trabajo de Sarwat y col. (2008). Todo esto estaría indicando que pese a ser marcadores dominantes, trabajando con ISSR y un adecuado número de *loci*, es posible tener una buena determinación de diversidad con la ventaja de la simpleza de la técnica y que no es necesario el conocimiento previo de las secuencias génicas.

### ***Marcadores de rasgos fenotípicos observables***

Los vegetales cuentan con características cuyas variantes se pueden distinguir por observación directa o mediante procedimientos sencillos; que presentan ventajas como su fácil determinación, la sencillez de sus sistemas de medición, y la posibilidad de llevar registros directos de las observaciones a campo. La selección fenotípica es sencilla, y su utilización no acarrearía problemas si a cada fenotipo le correspondiera un único genotipo y viceversa, pero en general no ocurre de esa manera (Cubero, 2003). Este tipo de rasgos presentan una serie de inconvenientes por los cuales estas características no suelen considerarse marcadores “ideales” para ser usados en la determinación de la diversidad genética. Entre sus desventajas más comunes se suelen incluir las siguientes: normalmente no son de herencia monogénica, sino que suelen estar controladas por varios genes, que comúnmente presentan interacción entre ellos o pleiotropía; no suelen ser codominantes; su diversidad no refleja únicamente las diferencias genómicas, sino que es producto también de la regulación biológica y medioambiental a la que está expuesta la expresión genética, por lo cual su manifestación suele depender del ambiente, las características nutricionales, los

organismos patógenos y predadores, y el estado del desarrollo de la planta. Como generalmente no se cuenta con un conocimiento completo de la diversidad molecular funcional, ni las complejas regulaciones que determinan las variedades morfológicas y fisiológicas, todo lo anterior representa una complicación para el análisis de la relación entre la diversidad observada y la diversidad genética. Esto no implica que las caracterizaciones morfológicas, fisiológicas y agronómicas de las especies hayan perdido importancia con el desarrollo tecnológico y científico en las ciencias agrarias; ya que éstas ofrecen importante información que habitualmente complementa a la que se puede obtener a partir de los datos moleculares (Rojas, 2003). Por el contrario, estos estudios fortalecieron su relevancia, porque generalmente son la base de la diferenciación de variedades, de la caracterización fisiológica y del mejoramiento.

## ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE ESPECIES VEGETALES POLIPLÓIDES

Una propiedad importante de los organismos vivos es el hecho de que casi siempre el número de cromosomas en las células es constante a nivel de individuo, siendo además, constante el número básico de cromosomas entre todos los individuos de la misma especie (Strasburger y col., 2004). En las células somáticas de un gran número de especies se encuentran dos juegos de cromosomas homólogos, uno de los cuales proviene de su progenitor masculino y el otro del femenino, esta condición se conoce como diploide (Strasburger y col., 2004). En algunas especies, sin embargo, las células somáticas presentan más de dos juegos de cromosomas, en ese caso la condición es poliploide (Strasburger y col., 2004). Se considera poliploidía cuando ha ocurrido una multiplicación homogénea sobre todos los cromosomas, es decir en el genoma (Darlington, 1937; Strasburger y col., 2004). La poliploidía es un fenómeno muy común en el reino vegetal; incluso las especies diploides de angiospermas a menudo se describen como paleopoliploides; ya que se estima que entre el 47 y el 70 % de las especies de plantas con flores descienden de ancestros poliploides (Aversano y col., 2012; Soltis y Soltis, 2009).

Especies estrechamente relacionadas e incluso poblaciones dentro de una misma especie, pueden presentar diferencias en la ploidía (Soltis y Soltis, 2009). La poliploidización es un proceso clave en la evolución de las plantas, que se va desarrollando en forma continua y no como un cambio eventual (Soltis y Soltis, 2009; Ramsey y Schemske, 1998). Es uno de los principales mecanismos de especiación ya que conduce a un inmediato aislamiento



reproductivo entre los poliploides recientes y sus padres, y como paso posterior a la hibridación interespecífica es un mecanismo que permite superar la esterilidad de los híbridos (Ramsey y Schemske, 1998; Soltis y Soltis, 2009).

La condición poliploide puede otorgar ventajas respecto al estado diploide (Aversano y col., 2012). En numerosos estudios sobre sistemas agrícolas y naturales se ha visto que, si bien en algunos casos ocurre que los distintos niveles de ploidía sólo se distinguen por su distribución (Darlington, 1937); los poliploides a menudo presentan cambios en la morfología, la fisiología y el metabolismo secundario respecto de sus padres y estas diferencias se relacionan principalmente al efecto de la heterosis (relacionada a la herencia no aditiva) y la redundancia génica (neofuncionalización de genes duplicados) (Aversano y col., 2012). Entre los cambios se incluyen características nuevas que no están presentes en el citotipo diploide progenitor y pueden ser adaptativos habilitándolos para entrar en nuevos nichos ecológicos, por ejemplo una mayor tolerancia a la sequía o resistencia a patógenos; como también (aunque no siempre) características que exceden el rango de los padres, por ejemplo órganos vegetativos y reproductivos más grandes (Aversano y col., 2012). Estos rasgos pueden representar importantes objetivos para el mejoramiento de plantas y por lo tanto, aumentar el uso potencial de poliploides en la agricultura (Aversano y col., 2012).

A pesar de la prevalencia y la importancia de la poliploidía, aún no se comprenden bien todos los factores involucrados en la poliploidización (Aversano y col., 2012). Se sabe que varios mecanismos citológicos conducen a la poliploidía en las plantas. Si bien varios de estos mecanismos son somáticos, por ejemplo duplicaciones cromosómicas en un cigoto o en un embrión joven que resultan en esporofitos completamente poliploides, una de las principales vías de la formación de poliploides es la que implica la no reducción meiótica de los gametos (Aversano y col., 2012). La formación de gametos  $2n$  es generalmente el resultado de la expresión de mutaciones que afectan a la microgametogénesis o megasporogénesis (Aversano y col., 2012). Tales mutaciones se han estudiado ampliamente en numerosos géneros, incluyendo *Solanum*, *Medicago*, *Manihot*, *Malus*, *Arachis*, *Lolium*, y *Agropyrum*, y generalmente se atribuyen a la acción de genes recesivos individuales. (Aversano y col., 2012).

La meiosis es un proceso que debe ocurrir durante la formación de los gametos para que se produzca la compensación en el número de cromosomas durante la reproducción

sexual. Si la meiosis transcurre normalmente, los cromosomas homólogos parentales se separarán reduciendo el contenido genómico  $2n$  al nivel gamético  $n$ ; luego, la condición  $2n$  será restaurada mediante la fecundación. Si la gametogénesis concluye sin reducción meiótica, el resultado serán gametos no reducidos ( $2n$ ), que contienen el número completo de cromosomas somáticos. La aparición de gametos  $2n$  se asocia a aberraciones meióticas que afectan ya sea a la microesporogénesis y/o a la megasporogénesis (Aversano y col., 2012; Ramsey y Schemske, 2002); aunque la producción de polen y de ovocélulas  $2n$  presentan entre sí una baja correlación, pudiendo existir para estos procesos diferentes mecanismos en una misma especie o una misma planta (Ramsey y Schemske, 1998). Si durante la fecundación, un gameto  $2n$  se une, ya sea a un gameto reducido como a otro gameto  $2n$ , se generaran embriones poliploides (Aversano y col., 2012).

La precondition para que ocurra la reducción meiótica de los cromosomas es que éstos puedan segregarse correctamente. El emparejamiento de los cromosomas homólogos durante la profase meiótica requiere del reconocimiento de homología a nivel de ADN, este emparejamiento es necesario para su segregación ordenada y se da mediante la formación de un complejo proteico: el Complejo Sinaptonémico (SC) (Loidl, 1995).

En las especies poliploides, la sinapsis se puede producir de más de una manera. En triploides o trisómicos hay tres cromosomas homólogos, se pueden conectar dos de ellos mediante un SC dejando excluido el tercero (sinapsis II + I) o se puede formar un triple SC conectando los tres cromosomas. En tetraploides o tetrasómicos, hay cuatro cromosomas homólogos que, por lo general, se asocian en pares de bivalentes o en cuadrivalentes con sólo dos cromosomas por sinapsis. En las plantas donde se investigaron mayores grados de ploidía, tampoco se ha encontrado sinapsis entre más de dos cromosomas. El SC también puede conectar un par no homólogo en ciertos casos. Las sinapsis suelen ir acompañadas de intercambios entre los cromosomas del apareamiento, cuando se producen dobles entrecruzamientos los multivalentes formados en el paquiteno persisten hasta la metafase I. Dado que los multivalentes son propensos a la no disyunción o a la distribución desigual de cromosomas homólogos en la primera división meiótica, se pueden generar aneuploides lo cual trae efectos adversos sobre la fertilidad (Loidl, 1995).

Darlington (1937), considera conveniente clasificar los diferentes tipos de especies poliploides en tres grupos. En el primero (alopoliploides), incluye las especies en las que la autosindesis (apareamiento de los cromosomas homólogos de un mismo padre durante

la meiosis en los poliploides) no ocurre en el poliploide normal, ni en haploides, triploides o híbridos. Entre este tipo de poliploides es más probable encontrar especies anuales de propagación sexual ya establecidas hace muchos años. En el segundo tipo (autopoliploides), considera las especies en las que no hay una clara diferenciación de los juegos de cromosomas correspondientes. Incluye triploides resultantes de la duplicación de uno de los gametos parentales, tetraploides resultantes de la duplicación somática o de duplicar los dos gametos parentales, o pentaploides (el resultado de duplicar un gameto en dos ocasiones). En el tercer grupo (intermedio entre alopoliploide y autopoliploide), incluye las especies descritas luego por Stebbins (1947) como alopoliploides segmentarios; en las cuáles es de esperar cierto grado de autosíndesis en los haploides e híbridos. En estas especies predominan los apareamientos “legítimos” (el tipo en que se dan en los diploides), pero ocasionalmente se forman multivalentes “ilegítimamente”; y también se pueden observar univalentes probablemente debido a la interferencia mecánica en el apareamiento cromosómico durante el zigoteno.

Darlington (1937) indica que los autotetraploides tienen reducida de alguna manera su fertilidad, mientras que los autotriploides y autopentaploides son casi totalmente estériles. Este autor también describe los tipos de asociaciones de los autopoliploides. Los triploides tienen la mayoría de sus cromosomas agrupados como trivalentes, los tetraploides tienen una mayoría de cuadrivalentes. Como las configuraciones posibles son más altas en los pentaploides, los tipos de asociaciones son necesariamente más variables, pero característicamente son diferentes de las de los alopentaploides. Así, en una especie alopentaploide se asocian cuatro juegos de cromosomas en pares, y el quinto queda principalmente no apareado, o en ocasiones puede formar parte de trivalentes; en cambio en una especie autopentaploide, el comportamiento de los cromosomas es totalmente diferente, aunque ambas forman una alta proporción de multivalentes (Darlington, 1937).

En las especies alopoliploides, cuando se reproducen sexualmente, es característico observar variabilidad en el número de cromosomas. Esto puede explicarse por la segregación irregular durante la meiosis de los cromosomas que conforman agrupaciones multivalentes, pudiéndose generar desequilibrio gamético (la formación de gametas aneuploides no implica la gravedad que tiene en ploidías más bajas, y tienen la probabilidad de no ser eliminadas). La otra causa importante de variabilidad en el número cromosómico es la distribución desequilibrada de los cromosomas más pequeños (que pueden generarse por

mutaciones estructurales de los cromosomas) durante la mitosis, la presencia de éstos, suele ser indiferente en un nivel alto de ploidía y a menudo se pierden (de modo que en las especies tetraploides y pentaploides los cromosomas cortos faltan en un grado variable) (Darlington, 1937).

## ESTUDIOS BÁSICOS PARA INICIAR UN PLAN DE MEJORAMIENTO

El primer paso para el mejoramiento vegetal es recopilar información básica sobre el material que se desea mejorar, incluyendo la diversidad presente en el germoplasma disponible, niveles de ploidía, modo de reproducción y fertilidad. (Pohelman y Sleper, 2003).

El mayor o menor éxito de los diferentes individuos en un medio determinado dependerá de su constitución genética (Strasburger y col., 2004). El aprovechamiento del potencial genético de un recurso vegetal depende, en gran medida, de la base genética disponible. Los genes disponibles para ser manipulados, por las técnicas convencionales de mejoramiento, son aquellos que las especies han acumulado durante su historia evolutiva (Vogel y Burson, 2004). Dado que la selección no es posible si no existen diversas alternativas para un determinado carácter de interés, la existencia de variabilidad genética es un requisito necesario para que la especie evolucione y se adapte a nuevas condiciones (Jiménez y Collada, 2000). Así también, en un programa de mejoramiento es esencial una correcta recolección de germoplasma que asegure la diversidad necesaria, como la que generalmente existe entre diferentes ecotipos de una especie y entre individuos de una misma población.

Muchas especies de gramíneas son complejas citológicamente mostrando variaciones en números básicos de cromosomas o niveles de ploidía (Vogel y Burson, 2004). Por otro lado, gran parte las características reproductivas y evolutivas de las especies se explican mediante sus rasgos citológicos, por un lado ayudan a entender cómo se relaciona el germoplasma dentro de un determinado género o familia, y por otro lado da indicios del origen de los híbridos naturales o variedades cultivadas (Stebbins, 1947). El nivel de ploidía y el comportamiento meiótico dan información acerca del tipo de poliploide con que se está trabajando, lo cual debe ser determinado en las etapas iniciales de un programa de mejoramiento, porque influyen en la herencia y la expresión de los rasgos genéticos (Vogel y Burson, 2004). En los poliploides con asociaciones cromosómicas multivalentes frecuentemente se presentan irregularidades en la meiosis. La segregación anormal de los

cromosomas en anafase I suele generar gametos con número cromosómico desbalanceado que normalmente son menos competitivos que los balanceados, o pueden no ser viables e incluso causa de esterilidad. En el caso de que llegaran a generar descendientes aneuploides, la inestabilidad genética de los mismos puede reducir la eficiencia de los programas de mejoramiento en plantas sexuales, por lo cual conviene eliminarlos (Vogel y Burson, 2004).

Los sistemas de mejoramiento que pueden usarse para un eficiente aprovechamiento de los atributos positivos de una especie o para modificar características indeseables, dependen principalmente de su modo de reproducción. La mayor parte de las gramíneas forrajeras perennes de áreas templadas a subtropicales se reproducen sexualmente mediante polinización cruzada, o asexualmente por semillas (apomixis) o esquejes (principalmente estolones y/o rizomas). Para el mejoramiento de cada una de estas formas de reproducción se han desarrollado técnicas específicas, que generalmente no resultan útiles para las demás y por lo tanto el mejorador necesitará conocer el modo de reproducción para un correcto diseño del plan de mejoramiento (Vogel y Burson, 2004).

La información básica existente en *A. macrum* es escasa y fue generada hace más de cuatro décadas cuando no existían muchas de las técnicas modernas de análisis genético. Si bien en algunos trabajos publicados se incluye información sobre la variabilidad en la expresión de algunos caracteres con valor agronómico, los cuales han sido estudiados sobre colecciones de *A. macrum* (Rhind y Goodenough, 1976; Rhind y Goodenough, 1979), estos datos no fueron analizados estadísticamente o sólo se refieren a las líneas que presentaron mejor o peor comportamiento. En cuanto a los estudios citológicos, los únicos estudios informados son recuentos cromosómicos que permitieron conocer el número básico de cromosomas y los diferentes niveles de ploidía encontrados. Los primeros recuentos cromosómicos fueron realizados por Moffet y Hurcombe (1949), quienes reportaron un número cromosómico de 36, con un número básico de 9 cromosomas ( $2n=4x=36$ ); luego Rhind y Goodenough (1976) también reportaron citotipos tetraploides con 36 cromosomas, pentaploides ( $2n=5x=45$ ) y hexaploides ( $2n=6x=54$ ) para esta especie.

El principal modo de multiplicación de la especie se sabe que es vegetativo, por medio de estolones y rizomas. Si bien se ha logrado obtener pequeñas cantidades de semilla fértil mediante cruzamientos entre distintos genotipos (Rhind y Goodenough, 1976; Rhind y Goodenough, 1979), no se ha determinado el modo de reproducción mediante estudios

citoembriológicos clásicos, excepto inferencias sobre los posibles modos reproductivos y la clásica suposición de la infertilidad de la especie (Rhind y Goodenough, 1979).

### ***Caracterización y estudio de la diversidad en colecciones de germoplasma***

La caracterización de una colección de material vegetal típicamente ofrece información útil para conocer el número real de genotipos con los que se cuenta, estudiar su estructura genética y otros atributos importantes para un determinado objetivo; con lo cual es posible estimar la diversidad genética, evitar la conservación de material duplicado, y definir si se trata de una colección representativa para lograr los objetivos propuestos. Los estudios típicos suelen incluir caracterizaciones morfológicas, agronómicas, fisiológicas y/o geográficas; y/o la caracterización molecular (mediante marcadores basados en proteínas y/o en fragmentos de ADN) (Pohelman y Sleper, 2003).

### **Marcadores moleculares**

Cuando no se conocen las variantes polimórficas de secuencias asociadas a un carácter fenotípico de interés, o cuando se desea complementar la información existente, el modo más rápido y rentable de medir la diversidad genética es utilizando marcadores moleculares, que si bien en general están más relacionados a la diversidad en caracteres neutros no codificantes, pueden también aportar información indirecta sobre genes funcionales importantes (Jiménez y Collada, 2000).

Los marcadores moleculares tienen diferentes características, por lo tanto, la elección de los mismos debe hacerse pensando en la información que se quiere obtener. En ese sentido, al elegir la técnica a utilizar se debería tener en cuenta si proporciona un marcador dominante o codominante, si maneja ADN nuclear (generalmente de origen biparental) o ADN mitocondrial o de cloroplasto de origen materno, también será necesario tener en cuenta los costos y la dificultad de la técnica, así como la necesidad de información previa sobre la secuencia de ADN (Robinson y Harris, 1999; Jiménez y Collada, 2000).

Los pasos para realizar el análisis de la diversidad genética utilizando marcadores moleculares basados en ADN consisten básicamente en extraer el material genético de cada planta a evaluar, y amplificar los marcadores que estén asociados a la secuencia del cebador utilizado mediante la técnica de PCR. El producto de amplificación se somete a una corrida electroforética (en geles de agarosa o poliacrilamida, preparados en concentraciones acorde al tamaño de los fragmentos amplificados) para obtener bandas que agrupen los productos de la

amplificación, de acuerdo a su tamaño. Las bandas podrán ser observadas al ser teñidas con alguna de las metodologías disponibles para ello (por ejemplo nitrato de plata, o reactivos que fluorescen al intercalarse entre las bases de ADN como el bromuro de etidio).

El patrón de bandas electroforético es registrado y a partir de esto se debe tomar una decisión acerca de cómo determinar las distancias genéticas que se desean estudiar. Una manera ampliamente adoptada para el cálculo de las distancias genéticas es el análisis estadístico de los datos de presencia o ausencia de bandas en el patrón electroforético a partir de una matriz de datos binarios. La elección apropiada de una medida de la distancia genética, en base al tipo de variable y las características de la población, es un componente importante del análisis de diversidad. Las medidas de similitud o distancia genética más utilizadas, basadas en datos binarios, son el Coeficiente de Jaccard, el Coeficiente de Dice (Nei y Li, 1979), y el coeficiente de coincidencia simple (SMC, del inglés Simple Matching Coefficient). Estos coeficientes calculan distancias (o similitudes) entre pares de muestras. Las principales diferencias entre ellos tienen que ver con la consideración y el peso que se les da a las ausencias compartidas de bandas, a las presencias compartidas de bandas, y a las bandas no compartidas (Mohammadi y Prasanna, 2003). El uso de uno u otro coeficiente en el análisis de distancia genética sobre un determinado conjunto de individuos, podrá no ser equivalente dependiendo de que los datos provengan de marcadores dominantes o codominantes, de líneas puras o híbridos, y de individuos haploides, diploides o poliploides (Kosman y Leonard, 2005). El coeficiente de Jaccard considera sólo los datos positivos (compartidos y no compartidos), el SMC considera todos los datos con igual peso y el coeficiente de Dice da mayor peso a los datos compartidos (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Con marcadores codominantes, como aloenzimas, RFLP y SSR, cada alelo reconocible en un *locus* dado es normalmente asociado a una banda en una posición única en el gel. Por lo tanto, en el caso de organismos poliploides, un homocigoto para un *locus* dado tendrá una banda y un heterocigoto tendrá dos o más. Cuando estos marcadores son hipervariables (como los SSR), la presencia de un alto número de alelos por *locus* hace esperable que el número total de bandas expresadas por un conjunto de individuos supere ampliamente al de *loci* implicados. En esos casos, la similitud entre un par de individuos se debe caracterizar mediante los patrones alélicos que éstos presenten en el conjunto de *loci* estudiados, es decir, a partir del número de alelos compartidos en cada *locus*; y no basándose

en bandas compartidas, ni ausencias compartidas para el conjunto de bandas (Kosman y Leonard, 2005).

Para los marcadores dominantes como RAPDs, AFLP e ISSR, generalmente se asume que cada banda representa un *locus* diferente y que la alternativa es la ausencia de bandas en esa posición. Por lo tanto, el número total de bandas observadas se corresponde con el número total de *loci* para la muestra de individuos (Kosman y Leonard, 2005). Dado que hay muchas razones para la falta de amplificación o ausencia de bandas, las coincidencias 1-1 en ciertas situaciones podrían indicar más similitud que las 0-0. (Mohammadi y Prasanna, 2003). De cualquier manera, estableciendo las posiciones informativas, el grado de similitud genética entre un par de individuos de la muestra con este tipo de marcadores, se debe interpretar a partir del número de posiciones informativas donde los perfiles de ambos comparten cualquiera de las dos situaciones: la presencia o la ausencia de una banda. En los organismos poliploides, los marcadores dominantes producen patrones de segregación que pueden coincidir para estados heterocigotos (y por lo tanto genotipos) diferentes. Éstos patrones de segregación, tras una autofecundación, no permiten distinguir la condición de homocigoto o heterocigoto para un determinado *locus*, por lo cual es más correcto considerarlos fenotipos (Kosman y Leonard, 2005). Cuando es posible aplicar un enfoque basado en el Equilibrio Hardy-Weinberg al grupo de individuos analizados, se puede suponer la existencia de sólo dos alelos por *locus*: uno que da una banda en la posición observada y uno que no da ninguna banda. De esta manera se consiguen mejores estimaciones de los parámetros integrales del conjunto de individuos como la disimilitud promedio y la diversidad poblacional, pero no de la similitud entre dos individuos específicos (Lynch y Milligan, 1994).

Si bien no existe un método adecuado para determinar, mediante marcadores dominantes, la distancia genética exacta que separa dos individuos poliploides, se puede calcular un valor aproximado (distancia fenotípica). Mientras se considere los perfiles electroforéticos como fenotipos más que como genotipos, cualquier coeficiente de similitud puede ser utilizado para la comparación entre de dos individuos, aunque es posible que los resultados obtenidos con un coeficiente no sean comparables a los obtenidos con otro (Kosman y Leonard, 2005).



## **Marcadores morfológicos fisiológicos y agronómicos de gramíneas**

Dado que la caracterización fenotípica sólo ofrece una estimación grosera de las variantes génicas funcionales; y que las características fenotípicas son indicadores de la variabilidad que pueden portar errores sistemáticos, éstos se deben contrarrestar mediante la adecuada selección y análisis de las variables a incluir (Ligarreto, 2003). De este modo, un análisis de la similitud (o disimilitud) dentro de un determinado grupo de características expresadas puede resultar de gran utilidad en los estudios de la variabilidad genética contenida en una colección (Souza y Sorrells, 1991). Debido a que la evaluación de muchas variables, principalmente cuando se trabaja con un alto número de accesiones y/o plantas por accesión, puede tornar muy costosa la toma de datos y complicar el análisis de los mismos; es recomendable utilizar pocos descriptores con una heredabilidad lo suficientemente elevada, para obtener suficiente discriminación en la estimación de la variabilidad (Ligarreto, 2003). Se recomienda: que los caracteres cualitativos presenten en lo posible pocas variantes y que sean exclusivos y distinguibles sin ambigüedad, para aproximarse a marcadores monogénicos; que las variables no estén sometidas a fuerte presión selectiva, natural o agronómica, para evitar que se produzca una respuesta adaptativa idéntica en todo el material en estudio; que las variables cuantitativas sufran poca influencia de las condiciones del medio; y que las condiciones de observación estén estandarizadas (Segura, 2003).

Dependiendo del tipo de cultivo, y los objetivos del estudio, las características a evaluar pueden ser diferentes. Para la caracterización de gramíneas forrajeras con fines de mejoramiento son muy relevantes las características relacionadas con los diferentes aspectos de la producción agropecuaria; como el rendimiento, las características nutricionales y que favorecen el consumo por parte del animal, su adaptación a ambientes que resultan poco aptos para los cultivos tradicionales y otros aspectos relacionados con el manejo y el aprovechamiento de los recursos (Rana y Kumar, 2014). En esos aspectos, cabe describir algunas de ellas, así como también ejemplos de especies forrajeras en que se han evaluado:

Biomasa seca. Se utiliza como índice de crecimiento global de la planta y es el principal índice de rendimiento de las especies forrajeras. Dependiendo del diseño de la experiencia, se puede expresar como peso de planta entera o en m<sup>2</sup> (Rana y Kumar, 2014). Ejemplos: *Paspalum simplex* (Brugnolli y col., 2014), *Panicum coloratum* (Armando y col., 2013), *Bouteloua curtipendula* (Morales Nieto y col., 2008), *Cynodon dactylon* (Kang y col., 2008).

Panículas por planta, longitud de la panícula, longitud del racimo basal, espiguillas por panícula, largo y ancho de la espiguilla. Estas variables son de interés cuando el mejoramiento apunta a la producción de semillas, lo cual en especies forrajeras es importante desde el punto de vista de la comercialización del cultivo. El número de panículas por planta o m<sup>2</sup>, las dimensiones de las panículas (dado por su longitud y por la longitud del racimo basal) y el número de espiguillas por panícula tienen que ver con la cantidad de granos que puede obtenerse de la planta; mientras que las dimensiones de las espiguillas (dado por su longitud y ancho), se relacionan con la calidad de la semilla (su probable fertilidad) (Rana y Kumar, 2014). Ejemplos: *Panicum coloratum* (Armando y col., 2013), *Brachiaria humidicola* (Jungmann y col., 2010), *Bouteloua curtipendula* (Morales Nieto y col., 2008), *Oryza sativa* (Montoya Aramburu y col., 2008).

Altura de planta y diámetro de la corona. Tienen que ver con el porte y tamaño de la planta y por lo tanto suelen guardar estrecha relación con la producción de biomasa, además, la altura se puede relacionar con la persistencia en pastoreo (Rana y Kumar, 2014). Ejemplos: *Paspalum simplex* (Brugnoli y col., 2014), *Panicum coloratum* (Armando y col., 2013), *Bouteloua curtipendula* (Morales Nieto y col., 2008).

Longitud de entrenudos. Se relaciona con la velocidad de expansión sobre el terreno. Ejemplo: *Arachis pintoi* (Carbalho y Quesenberry, 2009).

Largo y ancho de hojas. Se relaciona con el área foliar, el cual es un indicador de eficiencia fotosintética, según: Área foliar = longitud x ancho x número de hojas x Constante de área foliar. Si se desconoce el valor de la constante, el área foliar se puede calcular por el método gráfico (Rana y Kumar, 2014). Dado que la determinación del área foliar puede resultar engorrosa (Rana y Kumar, 2014) y la constante de área foliar no varía dentro de una misma especie, las determinaciones de ancho y largo de hoja, si bien no reflejan realmente la eficiencia fotosintética, se pueden considerar como variables interesantes de comparación dentro de una colección de plantas de una misma especie. Ejemplos: *Panicum coloratum* (Armando y col., 2013), *Brachiaria humidicola* (Jungmann y col., 2010), *Bouteloua curtipendula* (Morales Nieto y col., 2008), *Cynodon dactylon* (Kang y col., 2007).

Covertura del suelo. Es otro parámetro que se relaciona con la capacidad fotosintética de la planta y puede estar reflejando la producción de biomasa, pero además se relaciona con la capacidad de protección del suelo. Ejemplo: *Brassica napus* (Ferrari y col., 2009).

Crecimiento Inicial. Se relaciona con la velocidad de establecimiento de la planta (Rana y Kumar, 2014). Ejemplo: *Paspalum simplex* (Brugnolli y col., 2014).

Extensión del periodo vegetativo y extensión del periodo hasta alcanzar la máxima floración. Son importantes desde el punto de vista de la adaptación a ciertas formas de estrés, principalmente los relacionados a la humedad del suelo, y además la emergencia de las panículas en un corto periodo de tiempo es una característica deseable desde el punto de vista de la producción de semillas (Rana y Kumar, 2014). Ejemplos: *Paspalum simplex* (Brugnolli y col., 2014), *Triticum aestivum* (Fufa y col., 2005), *Oryza sativa* (Montoya Aramburu y col., 2008).

Para la caracterización y la evaluación morfológica, fisiológica y agronómica se debe establecer un modelo sistemático para estudiar el material genético; en ensayos experimentales con un diseño adecuado o en campos de agricultores. El sistema racional a partir del cual se obtienen los datos, constituye el diseño experimental. La utilidad del diseño experimental dependerá de cuánta información confiable permita obtener a partir de un ensayo, con el mínimo posible de complejidad y recursos (tiempo, dinero, material experimental, infraestructura, herramientas especiales, recursos humanos) (Chávez, 2003).

Es esperable que exista variación entre los datos, debido a la aplicación de diferentes tratamientos (factores controlables), pero también por otros factores que no pueden controlarse (por ejemplo factores ambientales). Mediante un modelo estadístico apropiado de ésta información, se arriba a estimaciones de la diversidad y del error experimental (Rana y Kumar, 2014). El análisis estadístico involucra métodos multivariados de descripción, ordenación o clasificación; y análisis de varianza clásicos, ya que éstos son los de mayor utilidad para separar los efectos genéticos de los ambientales (es decir, para evaluar la variabilidad en función de los caracteres morfológicos altamente heredables) (Chávez, 2003). Para el análisis existe un alto número de distancias y coeficientes de similitud, entre los cuales, la distancia Euclidea es de fácil análisis e interpretación y resulta muy útil sobre todo cuando se trabaja con variables cuantitativas (Ligarreto, 2003).

El análisis estadístico de los datos sólo es válido si el experimento estuvo bien planificado. En muy pocas ocasiones es aplicable a observaciones recogidas de forma aleatoria y no planificada o a datos históricos, ya que éstos pueden presentar diferentes inconvenientes que invalidan la estimación del error, los más comunes son (Rana y Kumar, 2014):

Inconsistencia de los datos: cuando a través del tiempo se producen cambios en factores que influyen en la expresión de la variable estudiada (ambiente, fenología) o en la precisión con que se toman los datos ya sea por el operador (recambio de personal, aprendizaje, motivación), o las herramientas para la toma de datos (reposiciones, reparaciones, envejecimiento). Esto hace que los datos históricos sean poco fiables, sobre todo si se han recogido en un amplio espacio de tiempo.

Confusión de los efectos: No poder separar las respuestas de variables fuertemente correlacionadas, o sólo haber evaluado la respuesta a diferentes niveles de un tratamiento, desconociendo los niveles en que actúan otras variables ocultas fuertemente influyentes.

Limitaciones por el rango del tratamiento: Si el tratamiento se aplicó en un único nivel o dentro de un rango pequeño, queda oculta la respuesta fuera del mismo, mientras que la variable estudiada podría tener un comportamiento diferente si se presentaran situaciones nuevas.

La fiabilidad de la información obtenida depende de la magnitud del error experimental. La validez del error depende del uso de repeticiones, de la consistencia de los datos y de la aleatoriedad del muestreo y del diseño. A su vez, el componente sistemático del error se puede disminuir mediante el aumento del número de repeticiones, el uso de controles locales y mediante una mayor precisión durante la toma de datos (Rana y Kumar, 2014). Además, para estimar el efecto ambiental, es conveniente realizar caracterizaciones y evaluaciones en varias localidades y/o estaciones de crecimiento (Chávez, 2003).

En los experimentos a campo, el objetivo es medir el efecto de uno o más tratamientos sobre las características que interesan analizar en el material vegetal. Como es de esperar que no toda la variación observada sea consecuencia de la aplicación de un determinado tratamiento, conviene contar previamente con información del clima, del suelo y de las posibles interacciones o correlaciones entre tratamientos, de manera de seleccionar un diseño experimental adecuado que permita estimar el error experimental y el efecto del tratamiento, mediante la metodología estadística más apropiada (Rana y Kumar, 2014).

El diseño experimental apropiado dependerá de la homogeneidad de las condiciones en el sitio de experimentación de modo de determinar los factores no controlables que influyen en las variables a estudiar (pudiendo presentarse gradientes de variación en una o varias direcciones), de las variables a evaluar (ya que la influencia de los factores no controlables no afecta de igual manera a todas las variables), de las características del material

vegetal (homogeneidad fenológica, genética y fisiológica), de la posibilidad de establecer repeticiones por ejemplo en sitios con diferentes características climáticas, del número de repeticiones, de los tratamientos que se aplicarán (uno o varios, si presentan interacciones o se pueden analizar por separado y el rango de niveles analizado), y de la disponibilidad de recursos (Jiménez y Collada, 2000). Hay numerosos diseños experimentales, los más comúnmente utilizados en los estudios de diversidad son: el diseño completamente aleatorizado, diseño bloques completos al azar, diseño cuadrado latino, diseño de bloques incompletos y diseño de parcelas divididas (Rana y Kumar, 2014). Para los estudios simples, con un solo tratamiento, o las diferentes combinaciones de niveles de tratamientos en diferentes experimentos (siempre que las interacciones sean de igual intensidad), comúnmente se usa el diseño completamente aleatorizado, el de bloques completos al azar, o el diseño cuadrado latino. Para estudios complejos, se pueden analizar en conjunto tratamientos que presentan interacciones de igual o diferente intensidad, utilizando el diseño de bloques incompletos y el diseño de parcelas divididas.

### ***Estudio de los gametófitos femeninos***

La observación citológica de la génesis y estructura de los sacos embrionarios es una metodología útil en el estudio del modo de reproducción, particularmente cuando se trata de detectar aposporia (Brown y Emery, 1958; Ozias-Akins, 2006). El estudio citológico puede implicar la observación microscópica de secciones de material embebido en resina o parafina, o la observación de órganos clarificados. La alternativa que resulta técnicamente más sencilla es la clarificación de órganos, pero requiere una búsqueda previa de un protocolo que pueda ajustarse adecuadamente a las particularidades que presenten en la especie los tejidos del órgano que se va a observar. Actualmente se dispone de numerosos protocolos para el clarificado de óvulos. Los óvulos de gramíneas típicamente se clarifican en salicilato de metilo después de ser fijados durante 24 h en una solución de formaldehído: ácido acético: alcohol etílico (FAA) y almacenados en 70 % de etanol (Crane, 2001; Ozias-Akins, 2006). Los sacos embrionarios apospóricos característicos contienen sólo cuatro núcleos (el de la ovocélula, los correspondientes a una o dos sinérgidas y uno o dos núcleos polares) en su estado maduro, esto es porque no se forman antípodas y es una característica que permite diferenciarlos fácilmente de los sacos sexuales en su forma más típica (ocho núcleos, incluyendo el de la ovocélula, dos de las antípodas, dos núcleos polares y tres de las

antípodas) (Brown y Emery, 1958). La observación citológica de aposporia sólo prueba la ocurrencia apomixis cuando está seguida de apogamia o partenogénesis, pero si todos los sacos embrionarios maduros en los óvulos de una planta tienen sólo cuatro núcleos, y especialmente si se observan pro-embriones y endospermo en estos óvulos carentes de antípodas, se tiene una fuerte evidencia de apomixis. Algunas especies nunca o sólo ocasionalmente desarrollan sacos sexuales reducidos maduros y funcionales, mientras que en otras el desarrollo de sacos apospóricos maduros y funcionales es un evento ocasional (Brown y Emery, 1958). Por el contrario, la diplosporia es más difícil de detectar mediante la observación citológica, pero en los casos en que la sexualidad es dudosa se puede corroborar testeando el origen híbrido de la progenie.

### ***Estudio de la fertilidad del polen***

La calidad del polen constituye un factor crítico en el éxito de los programas de obtención de híbridos. Las condiciones ambientales (principalmente la humedad y temperatura) y factores genéticos (como la depresión por endogamia o la interacción entre factores genéticos nucleares y citoplasmáticos) pueden afectar funcionalmente al polen, lo cual va a ser limitante en relación a la fecundación y la producción de semilla. Estos factores pueden afectar la meiosis en las anteras o la diferenciación y crecimiento del esporofito. Existen distintos métodos para evaluar la viabilidad del polen. Entre los más utilizados se destacan la tinción con colorantes vitales y la germinación en medios artificiales. Las pruebas de tinción son más rápidas y fáciles que la germinación del polen; aunque, tienden a sobreestimar la viabilidad y el poder germinativo real de los granos de polen (Trognitz, 1991). Los granos de polen funcionales (viables o fértiles) se observan claramente redondos con el citoplasma teñido uniformemente, y con morfología normal; mientras los granos abortivos, no viables o estériles no se tiñen (o son poco coloreados), su contenido citoplasmático es granular y/o permanecen encogidos o deformes y con el citoplasma retraído (Orrillo y Bonierbale, 2009). La germinación *in vitro* depende del genotipo, las condiciones ambientales, la madurez del polen, y la composición y el pH del medio. Dado que las condiciones óptimas para su aplicación pueden variar incluso mientras se utilice una misma especie (Ordoñez, 2014), utilizar esta técnica no contando con dicha información, como es el caso de *A. macrum*, requerirá de una exhaustiva puesta a punto de la metodología.

### ***Determinación del sistema de polinización***

Los sistemas reproductivos resultan de las diferentes combinaciones entre factores como la compatibilidad genética, la variación temporal en la maduración de los sexos o la existencia de barreras morfológicas florales. Lo más frecuente entre las gramíneas es que los casos no sean absolutos y dentro de una misma especie o incluso de una misma planta las características que habilitan para la utilización de más de uno de estos mecanismos estén presentes (Strasburger y col., 2004). Como ya se explicó, el proceso reproductivo sexual puede darse por autofecundación y/o por fecundación cruzada. La consecución de muchas generaciones de autofecundación conduce a la homocigosis y a la generación de líneas puras. La fecundación cruzada, por el contrario favorece el intercambio génico y la generación de nuevos genotipos, es decir a la hibridación y a la diversidad genética. Si bien algunas especies son autógamas obligadas y algunas alógamas son autoincompatibles, lo más frecuente en gramíneas es que existan porcentajes variables de alogamia y autogamia. También se explicó previamente que la semilla puede tener un origen apomíctico; y si bien algunas especies pueden generar estas semillas sin requerir polinización, lo más frecuente en gramíneas es la pseudogamia. La apomixis, por otro lado frecuentemente se presenta como una característica facultativa. Resumiendo: la semilla de origen sexual puede ser fruto de un mecanismo alógamo o autógeno; alternativamente, la semilla puede ser de origen apomíctico; y a su vez la semilla apomíctica puede tener un origen apospórico o diplospórico.

Para determinar el modo de reproducción y el sistema de polinización, es recomendable hacer observaciones citogenéticas y de los procesos de desarrollo de los gametofitos pero también de la producción de semillas en diferentes condiciones (Vogel y Burson, 2004; Ozias-Akins, 2006). Si una planta aislada produce muy bajos porcentajes de semilla, se puede estar frente a una especie con polinización cruzada y autoincompatibilidad; o simplemente una especie estéril o casi estéril cuyo principal modo de reproducción sea vegetativo (Vogel y Burson, 2004). Si por el contrario, la planta produce cantidades apreciables de semillas, éstas pueden ser fruto de la autofecundación o de apomixis, en ambos casos es esperable que toda la progenie sea muy similar a la madre, pero la apomixis involucra clonalidad (progenie idéntica a la madre) y la autofecundación sexualidad (hay entrecruzamiento y por lo tanto también algo de variación genética) (Vogel y Burson, 2004). Se puede distinguir entre autofecundación y apomixis si es posible emascular la planta antes de someterla al aislamiento y si el proceso apomíctico involucrado no requiere de la

polinización para la formación del endospermo; en ese caso sólo si la semilla es apomíctica su producción no se verá afectada por la emasculación (Vogel y Burson, 2004).

### ***Estudio de las asociaciones cromosómicas y el comportamiento meiótico***

La mayoría de las angiospermas pueden tolerar una amplia variedad de mutaciones cromosómicas, diferentes niveles de ploidía e hibridación, todo ello está en estrecha relación con su fertilidad y su modo de reproducción. Como ya se explicó, las dificultades meióticas tienen relación con los niveles de ploidía y los tipos de poliploidía; afectan la fertilidad e indirectamente se relacionan con el modo de reproducción. A su vez, las asociaciones cromosómicas están relacionadas a la homología genotípica de los cromosomas, por lo cual dan importante información sobre los niveles de ploidía, el grado de heterosis y el origen de los genotipos estudiados, e indirectamente dan información sobre el modo de reproducción de las especies que les dieron origen. Como se explicó en el apartado anterior; los "autopoliploides", generados por la duplicación de genomas homólogos, y los "alopoliploides", que combinan dos o más genomas diferentes y son el resultado de la hibridación entre especies; pueden distinguirse a partir del tipo de asociaciones cromosómicas; del mismo modo las asociaciones cromosómicas pueden asociarse a la homocigosis ligada a la sucesión de generaciones por autogamia o a heterosis que se relaciona tanto a la alogamia como la apomixis. Por otro lado, verificar el nivel de ploidía mediante las asociaciones cromosómicas y estudiar las complejidades de los sistemas genéticos, se relaciona con el modo de reproducción, ya que la reproducción asexual no suele estar favorecida evolutivamente en las especies diploides, y por el contrario, la complejidad de los sistemas genéticos de muchos poliploides favorece la reproducción por las vías asexuales o por la sexual autogámica. Dado que *Acroceras macrum* es una especie poliploide, en la cual se han reportado tres niveles de ploidía: tetraploides ( $2n= 4x= 36$ ), pentaploides ( $2n= 5x= 45$ ) y hexaploides ( $2n= 6x= 54$ ) (Rhind y Goodenough, 1979), y que el germoplasma en estudio tiene su origen en líneas de cruzamiento; el estudio de los apareamientos cromosómicos y el comportamiento meiótico de este material puede proporcionar información muy importante de los aspectos reproductivos.

Las CMP se encuentran de a cientos en las anteras y suelen ser la elección habitual para estudiar el comportamiento meiótico y el apareamiento de los cromosomas. Los apareamientos cromosómicos se pueden observar en microscopio de luz en la mayoría de las



plantas; empiezan en el Zigoteno y se completan en el Paquiteno, permaneciendo hasta la Anafase I. La mejor etapa para observar asociaciones cromosómicas es la Metafase I. Por otra parte, las principales aberraciones meióticas que conducen a gametos  $2n$ , aneuploides o no viables involucran defectos en la disyunción cromosómica y de la formación o el comportamiento del huso meiótico durante la Anafase I. La existencia de gradientes meióticos en paralelo al eje de las inflorescencias de las gramíneas facilita obtener CMPs en el estado meiótico de interés (Goicoechea y Giraldez, 1996).

Ramsey y Schemske (1998) denominan Los autoploiploides pueden (y suelen) formar asociaciones cromosómicas multivalentes en la meiosis y tienen herencia polisómica; por el contrario, los aloploiploides, suelen mostrar asociaciones bivalentes y tienen herencia disómica (Ramsey y Schemske, 1998).

### ***Determinación del origen híbrido de la progenie***

Si la polinización es un requerimiento, o la emasculación no es posible, el modo más seguro de testear es mediante marcadores moleculares. Esto mismo es válido para distinguir entre la progenie producida por autofecundación o por polinización cruzada cuando se realizan cruzamientos sin previa emasculación y se desconoce si la progenie es producto de polinización cruzada, autopolinización o apomixis. Ésta es la base de los test de progenies, donde lo que se chequea es la presencia de variabilidad genética en la progenie para distinguir sexualidad de apomixis, y si se han heredado marcadores específicos del progenitor masculino para distinguir alogamia de autogamia (Ozias-Akins, 2006). El tipo de apomixis se determina con otros tipos de estudios, principalmente mediante la observación de los tipos y orígenes de los sacos embrionarios que se generan (Brown y Emery, 1958; Crane, 2001).

De todo lo anterior se deduce que el trabajo de mejoramiento genético en una especie con las interesantes características de *Acroceras macrum* representa una herramienta de gran interés para obtener cultivares superiores a partir de la manipulación de la diversidad genética existente en el germoplasma. Pero el planeamiento de una estrategia de mejoramiento requiere previamente establecer la base de conocimientos e información necesaria para orientar al mejorador hacia la estrategia más adecuada a seguir, diseñando un plan que resulte exitoso para el mejoramiento genético de esta especie en particular. Por lo tanto, será un pre requisito contar con información acerca de los sistemas genéticos, e

identificar el modo de reproducción y el sistema de polinización característico de los diferentes citotipos. Igualmente indispensable es asegurarse una variabilidad genética que se adecue a los objetivos del plan propuesto.

## ***HIPOTESIS***

- *Acroceras macrum* es una especie de reproducción sexual y sus características reproductivas son constantes entre los distintos citotipos.
- El germoplasma de *Acroceras macrum* introducido a Argentina contiene una diversidad genética reducida, pero suficiente para iniciar tareas de mejoramiento genético.
- Es posible generar híbridos en forma eficiente en *Acroceras macrum* con un porcentaje menor de plantas resultantes de autopolinización.

## ***OBJETIVO GENERAL***

Esta Tesis tiene como objetivo general la obtención de información básica sobre *Acroceras macrum* que contribuya a alcanzar los pre-requisitos necesarios para el inicio de un plan de mejoramiento genético de la especie. La información que se pretende obtener está en relación a los sistemas reproductivos, lo cual es un requisito para definir las metodologías de mejoramiento más apropiadas, y también a la diversidad contenida en el germoplasma que se ha introducido al país, para evaluar la necesidad de importar germoplasma complementario. En adición, se plantea estudiar la posibilidad de hibridación y la producción de semillas en relación a las características genéticas de los progenitores involucrados.

## ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

1. Estudiar los sistemas genéticos en *Acroceras macrum* incluyendo niveles de ploidía, megasporogénesis y megagametogénesis, microsporogénesis y viabilidad del polen.
2. Estimar la diversidad en *Acroceras macrum* en base a caracteres morfofisiológicos y moleculares.
3. Determinar la posibilidad de hibridación en *Acroceras macrum* a través del estudio de la producción de semillas en autopolinización y polinización cruzada, y evaluación del origen híbrido de las progenies obtenidas a partir de cruzamientos controlados.

Esta tesis se presenta dividida en dos capítulos. En el Capítulo 1 se aborda el primer objetivo, es decir la diversidad genética del germoplasma bajo estudio, desde el punto de vista molecular y desde el enfoque morfológico y agronómico. En ese mismo capítulo, se ha incluido además el estudio de los niveles de ploidía. El Capítulo 2 está abocado a los objetivos restantes, de modo que comprende estudios enfocados a determinar el modo de reproducción (estudiando la formación de los gametófitos y su fertilidad y sustentando los resultados con la producción de semillas por cruzamiento cuya condición de híbridos es testada por marcadores moleculares), el sistema de polinización (mediante la producción de semillas con diferentes metodologías: polinización abierta, autopolinización forzada, cruzamientos controlados con emasculación previa del progenitor femenino y sin emasculación) y el tipo de poliploidía que presenta el germoplasma por su origen (estudiado a partir del tipo de asociaciones cromosómicas presentes en la meiosis masculina).

# Capítulo 1

---

*Niveles de ploidía y diversidad en una colección de *Acroceras macrum**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener una colección de germoplasma de *Acroceras macrum*, a partir de materiales introducidos de Sudáfrica.
- Determinar el número de genotipos contenidos en la colección de germoplasma.
- Determinar los niveles de ploidía de los genotipos que componen la colección.
- Determinar las distancias genéticas entre los genotipos, mediante marcadores moleculares ISSR.
- Estudiar la diversidad de la colección en relación a caracteres morfológicos y agronómicos.

## ***INTRODUCCIÓN***

---

En las especies forrajeras perennes, los objetivos más comunes del mejoramiento genético son incrementar y estabilizar mayores niveles productivos de biomasa y/o semillas cosechables, mejorar el vigor de las plántulas, los atributos nutricionales y la persistencia en una región determinada (Pohelman y Sleper, 2003). Las técnicas empleadas para el mejoramiento dependerán del tipo de reproducción del cultivo, es decir si es autógeno, alógamo o de reproducción asexual. No obstante, se pueden definir una serie de pasos generales a seguir incluyendo la recolección y caracterización genética y reproductiva del germoplasma, la evaluación y selección directa del germoplasma o la utilización de hibridación y posterior selección, y la libración de un nuevo cultivar (Vogel y Burson, 2004). La evaluación de especies forrajeras consiste en una serie de etapas que incluyen la evaluación inicial de variantes naturales, poblaciones o híbridos a nivel de planta individual para observar su adaptación, tolerancia a enfermedades y plagas, su fenología y vigor general, la evaluación en pequeñas parcelas, que a menudo se replican en varios lugares, y los ensayos de pastoreo para la evaluación en primer término de la respuesta del vegetal al estrés causado por la defoliación y en segundo término, utilizando parcelas más grandes, se determina la producción animal al consumir las líneas en evaluación (Sollenberger y Cherney, 1995).

Uno de los requisitos más importantes al inicio de cualquier programa de mejoramiento es conocer la magnitud y estructura genética de la variación en el material de trabajo, ya que el tiempo necesario para la fase de evaluación del germoplasma depende de la información disponible para la especie en particular (Pohelman y Sleper, 2003). De no existir suficiente variación disponible en características de interés, será necesario crearla en forma artificial, ya sea mediante hibridación intra o interespecífica, mutación, inducción de poliploidía, o inclusive mediante el uso de técnicas tales como la hibridación somática o la ingeniería genética. No es posible el mejoramiento si no hay variación genética (Mesén, 1998).

Para estimar la variación genética dentro de las poblaciones, es común utilizar tanto datos obtenidos por observación directa, como también datos moleculares. Dado que tanto los estudios directamente del genotipo como los basados en características fenotípicas tienen ventajas y desventajas, y funcionan muy bien como estudios complementarios, hasta nuestros días la diversidad en las especies se describe con enfoques basados en ambas clases de datos (Segura, 2003; Alcántara, 2007).

Los marcadores morfológicos, utilizados en los vegetales para obtener datos relacionados a la diversidad genética, en general no cumplen con todos los requisitos deseables para considerar a un marcador como bueno (suelen estar afectados por el desarrollo y cualquier otro factor que afecte las funciones vitales de la planta, son escasos en número, en general hay que esperar hasta que la planta se desarrolle completamente para evaluarlos, no suelen ser codominantes y con frecuencia son pleiotrópicos), pero son fácilmente detectables, su medición resulta poco costosa desde el punto de vista económico y se puede dirigir el estudio de la diversidad hacia las características relacionadas con los objetivos experimentales (Cubero, 2003; Rojas, 2003). Las gramíneas forrajeras presentan diferentes características que pueden variar dentro de una misma especie y son de interés agronómico, por lo tanto, la determinación de su variabilidad tiene importancia para el mejoramiento. Otras variables tienen que ver con la morfología de las plantas, son marcadores fáciles de medir y también pueden tener interés agronómico desde el punto de vista del manejo y la utilización del cultivo o porque reflejan características fisiológicas de interés. Algunas variables son interesantes desde el punto de vista del uso eficiente de los recursos disponibles en un entorno determinado, tienen que ver con la adaptación a determinadas condiciones biológicas o ambientales, y a la rapidez de establecimiento de las plantas (Rana y Kumar, 2014).

Hoy en día los marcadores moleculares más utilizados en estudios de diversidad genética de plantas son los basados directamente en secuencias del ADN. Para estudiar la diversidad de una especie es deseable detectar una gran cantidad de polimorfismos y esto es en general característico de los marcadores de *loci* múltiples como por ejemplo los RAPDs, los microsatélites, los AFLP y los ISSR (Alcántara, 2007). Si bien los ISSR no son marcadores codominantes, tienen múltiples ventajas como que no requieren el conocimiento de secuencias para ser aplicados en una especie, son relativamente económicos y fáciles de aplicar, presentan elevado polimorfismo y a la vez sus resultados son altamente reproducibles (González y Aguirre, 2007).

*Acroceras macrum* se destaca entre las gramíneas forrajeras adaptadas al subtrópico porque posee cualidades interesantes como una mayor calidad nutricional respecto a otras especies de gramíneas de ciclo estival (Rhind y Goodenough, 1979), lo cual está en relación a su sistema fotosintético el cual es de tipo C<sub>3</sub> (Oliveira y col., 1973; Zuloaga y col., 1987), a lo cual se suma su excelente adaptación a ambientes anegadizos, donde la calidad de las pasturas naturales es muy pobre, limitando el potencial de la producción animal. De hecho,

sus atributos nutricionales se mantienen durante los diferentes estadios de crecimiento e incluso cuando es conservada como heno (Rhind y Goodenough, 1979).

En cuanto a la tolerancia a factores abióticos, se considera que el factor edafológico que más afecta el crecimiento de *A. macrum* es la humedad del suelo, presentando alta sensibilidad a la sequía y una fuerte tendencia a destacarse en presencia de elevados porcentajes de retención de humedad, incluso tras largos periodos de anegamiento (Rhind y Goodenough, 1979; Yang et al, 2007). Entre los factores relacionados a los cambios estacionales, la variación térmica parece ser el que más significativamente afecta a la especie, y no así la longitud del fotoperiodo (Rhind y Goodenough, 1979). Sin embargo, a pesar de que las bajas temperaturas invernales de algunas áreas pueden causar su desaparición completa (cómo fue observado en Maseru, Sudáfrica, con rango de temperaturas diarias de -3°C durante la noche a un máximo de 17°C), esta gramínea persiste, con productividad reducida, en inviernos relativamente suaves (cómo se observó en el área de Hosback, Sudáfrica donde la mínima diaria invernal es de 3,5°C) manteniendo una alta capacidad de rebrote en condiciones propicias (temperaturas subtropicales y humedad adecuada, como ocurre en el en el área de Hosback, Sudáfrica durante el verano, que se caracteriza por ser lluvioso y con temperaturas que alcanzan los 25°C) (Rhind y Goodenough, 1979).

La adopción de la especie no se ha extendido a los niveles esperables, considerando sus características agronómicas positivas. Esto, en general se atribuye a los bajos porcentajes de germinación de las semillas (Rhind y Goodenough, 1979); a pesar de que se trata de una pastura perenne que, con la capacidad invasiva de sus rizomas y estolones, cubre rápidamente el terreno (Skerman y Riveros, 1994); porque la plantación de esquejes en grandes extensiones resulta muy laboriosa.

Pese a la necesidad de disponer de medios más simples para la adopción de *A. macrum*, hasta el momento no se cuenta con la base de conocimientos suficiente para iniciar un programa de mejoramiento genético de esta especie. Poca información ha sido generada acerca de la estructura genética y el modo de reproducción de *A. macrum*. Si bien se distribuye ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales del territorio africano, y se han hecho estudios con poblaciones recolectadas en el sur y el este de África (Rhind y Goodenough, 1976), poco se conoce de la diversidad existente entre las diferentes poblaciones, tanto a nivel genético como morfológico. Así mismo, hay muy poca información



disponible acerca de su modo de reproducción y las causas potenciales para los bajos niveles de producción y germinación de semilla observados (Rhind y Goodenough, 1979).

Las principales investigaciones sobre esta gramínea se condujeron en Sudáfrica durante la década de los setenta (Rhind y Goodenough, 1976; Rhind y Goodenough, 1979). Los primeros estudios se iniciaron en la década del cuarenta, e incluyeron algunos análisis citológicos, de cruzamientos y del comportamiento agronómico de la especie. Moffet y Hurcombe (1949) reportaron un número cromosómico de 36 en *A. macrum*, con un número básico de nueve cromosomas. Rhind y Goodenough (1976) reportaron citotipos tetraploides ( $2n=4x=36$ ), pentaploides ( $2n=5x=45$ ) y hexaploides ( $2n=6x=54$ ) para la especie. Si bien no hay estudios concluyentes sobre el modo de reproducción, se llevaron a cabo cruzamientos entre distintos individuos provenientes de las colecciones realizadas (Rhind y Goodenough, 1976; 1979). La progenie resultante de algunas combinaciones parentales produjo cantidades interesantes de semilla fértil (Rhind y Goodenough, 1976). Además, la diversidad observada dentro de la progenie en caracteres como el rendimiento en biomasa, vigor, porte (cespitoso o erecto), resistencia al patógeno *Ustilago syntherismae*, y hasta la capacidad de desarrollarse a escasa distancia del mar; y además, las diferencias entre la progenie y sus padres, dieron indicios de reproducción sexual (Rhind y Goodenough, 1979). También se sugirió que la especie sería autoestéril, e incluso la posibilidad de que se presentaran casos de apomixis (Rhind y Goodenough, 1979).

Germoplasma de *Acroceras macrum* procedente de África, incluyendo el material evaluado en Sudáfrica y las líneas híbridas obtenidas por cruzamiento, fue introducido en la Argentina entre 1970 y 1997 tanto por el INTA como por productores, para evaluar su rendimiento en las condiciones locales. A partir de esto, se llevaron a cabo prolongados estudios de la adaptación de la especie a las condiciones climáticas y edafológicas de diferentes zonas, su rendimiento en forraje con diferentes técnicas de manejo y fertilización, y ensayos de engorde de ganado. La información reportada en su mayoría en boletines informativos, indica que su adaptación fue excelente, especialmente en la región nordeste en regiones de malezales con suelos del orden de los alfisoles y en el albardón del Río Paraná con suelos del orden de los molisoles. En el área de malezal se registraron rendimientos entre 3500 a 5000 kg de MS/ha/año, los contenidos de proteína bruta y fósforo durante abril, época en que alcanza su máximo de disponibilidad, fue de 9 y 0,17 % respectivamente, y esto traducido a producción de carne resultó en 256 kg/ha/año con una carga de 1.52 vaq/ha/año.

Los índices de rendimiento disminuyeron en el periodo invernal pero continuaron siendo altos para la época, característica poco frecuente en otras gramíneas subtropicales o tropicales.

Sin embargo, la falta de información sobre la diversidad genética de las plantas introducidas al país, los niveles de ploidía, y el modo de reproducción no han permitido iniciar un programa de mejora genética de esta especie en Argentina y éste desconocimiento también limita las posibilidades de avance a nivel global. Teniendo en cuenta toda esta falta de información, se hace necesaria una primera caracterización del germoplasma introducido considerando los niveles de diversidad y de ploidía, su constitución genética y posible origen (auto o alopoliploidía), y posteriormente definir el modo de reproducción y fertilidad de la especie; todo esto antes de que se pueda iniciar un programa de mejoramiento. En la actualidad, es posible utilizar una serie de técnicas moleculares y citoembriológicas que facilitan el trabajo de fitomejoramiento. Dado el material y el tipo de información que urge obtener, se postulan los objetivos específicos para el presente capítulo de identificar los genotipos y citotipos presentes en una colección de *A. macrum*, y determinar parámetros de diversidad genética utilizando marcadores ISSR y un grupo de rasgos morfológicos y agronómicos.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

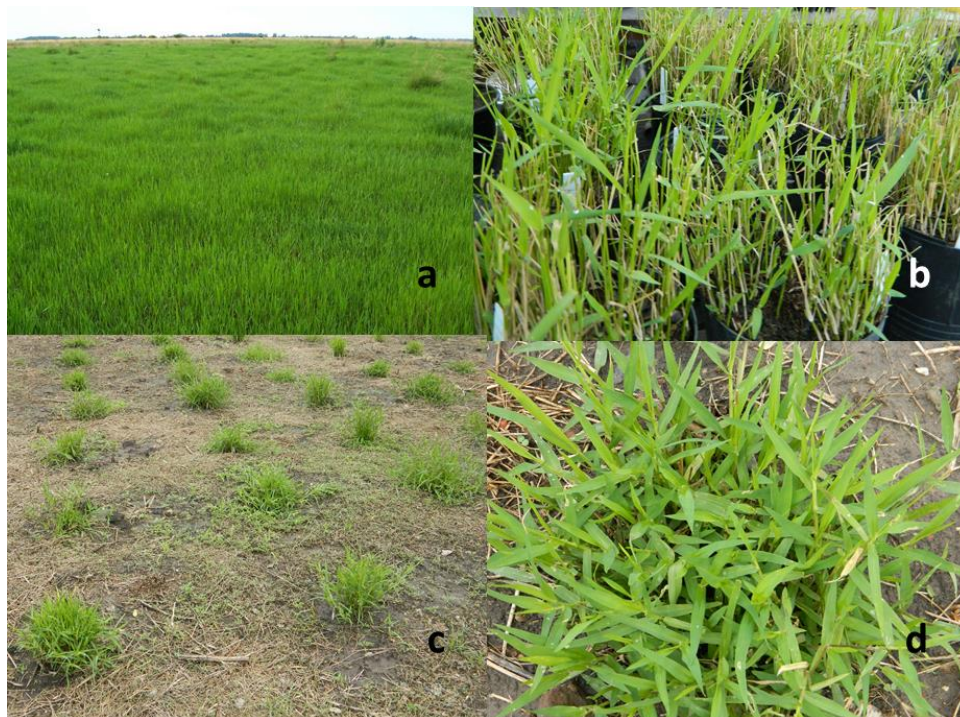
---

### ***Material vegetal***

El germoplasma de *Acroceras macrum* utilizado para esta investigación fue recolectado en la estación experimental agropecuaria Corrientes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA Corrientes) (S27 ° 40 ', W58 ° 45'), en las cercanías de la localidad de Riachuelo, Prov. de Corrientes, Argentina. En esa área, el volumen de precipitación anual es del orden de los 1300 mm, siendo las lluvias tres veces más abundantes durante el verano que durante el invierno. El suelo es del tipo Argiudol con una capa superficial rica en materia orgánica y alto contenido de arcilla fina por debajo de ésta, siendo su drenaje lento, lo cual promueve el anegamiento en la temporada lluviosa.

Una superficie de aproximadamente 150 m<sup>2</sup> fue plantada en la EEA-INTA Corrientes en 1995, con 53 líneas genéticas importadas de Sudáfrica, del Range and Forage Institute (RFI) dependiente del Agricultural Research Council (ARC) (Figura 1. 1.a). De éstas 53 líneas, 44 eran supuestos híbridos provenientes de distintos cruzamientos y 9 eran variantes naturales. En el registro del germoplasma introducido figura que líneas tetraploides y hexaploides formaban parte del grupo que ingresó al país. Ese germoplasma representaba una colección mantenida en Sudáfrica para un programa de mejoramiento ahora extinto, donde el material se seleccionó en base a sus características agronómicas (caracteres como producción de biomasa como pastura y heno, vigor primaveral, porte, resistencia al patógeno *Ustilago syntherismae*, y hasta la capacidad de desarrollarse a escasa distancia del mar). Otras líneas llegaron a diferentes estaciones experimentales de INTA en las décadas de los 70' y 80' como contribución de productores que habían importado el material por cuenta propia, y se incorporaron al germoplasma proveniente del RFI. Se presumía que el material importado por productores consistía en el cultivar "Cedara Select" cuyo número cromosómico fue informado por Rhind y Goodenough (1976 y 1979) como hexaploide. El área donde se mantuvieron en cultivo las introducciones en la provincia de Corrientes fue abandonada pocos años después de plantada, y se utiliza para el pastoreo desde entonces (Figura 1. 1a). En 2011, se realizó un muestreo del lugar, donde se mantuvieron cultivadas las introducciones, tomando material del centro de cada área donde se identificó la especie, cubriendo toda la superficie inicialmente plantada. Con el objetivo de recuperar este germoplasma, 47 esquejes fueron recogidos y plantados en un invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Argentina (Figura

1.1b). Las 47 plantas recibieron una identificación numérica de 1 a 47 y fueron tipificadas genéticamente mediante marcadores moleculares para descartar posibles réplicas o clones. Los diferentes genotipos identificados fueron luego analizados para determinar su nivel de ploidía, modo de reproducción, sistema de polinización, fertilidad y diversidad morfológica, agronómica y molecular.



**Figura 1. 1. Colección de germoplasma de *Acroceras macrum*. a. Antiguo lote experimental *A. macrum*, cultivado en EEA-INTA Corrientes, a partir del cual se recuperó el material de estudio. b. Plantas obtenidas del lote de INTA y cultivadas en macetas bajo invernadero. c. Ensayo experimental ubicado en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. d. Planta individual de *A. macrum* cultivada en el campo.**

### ***Tipificación genética***

Las 47 plantas de *A. macrum* recuperadas del lote experimental de la EEA-INTA Corrientes fueron tipificadas genéticamente para identificar genotipos repetidos (clones). Esto fue necesario realizar debido a que las plantas obtenidas del lote experimental del INTA no se encontraban individualizadas sino formando parte de una única parcela en la cual todas las líneas cultivadas originalmente se entremezclaron. El análisis se realizó mediante la identificación de huellas de ADN (DNA fingerprints) a partir del empleo de marcadores de ISSR.

### Obtención del ADN genómico

El ADN genómico se obtuvo de cada una de las 47 plantas recuperadas. Se utilizó la metodología de micro-extracción de ADN siguiendo las instrucciones descritas en Brugnoli y col. (2013). El procedimiento consistió en el macerado en un tubo de polipropileno de 1,5 ml de una pequeña (aprox. 50 m) porción basal de hojas jóvenes frescas, con la ayuda de un taladro con mecha plástica, y el agregado de 700  $\mu$ l de buffer de extracción (CTAB 2 %; Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; EDTA 50 mM, pH 8; NaCl 700 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 140 mM). Las muestras se incubaron a 65 °C durante 30 min. Luego, se añadió 500  $\mu$ l de cloroformo, se agitó la mezcla durante 5 min y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. Del sistema bifásico obtenido, se recuperó la fase acuosa, la cual se transfirió a otro tubo. Los ácidos nucleicos se precipitaron en dicha fase con 500  $\mu$ l de 2-propanol frío. Las muestras se mantuvieron en un freezer a -20 °C durante aproximadamente 30 min, luego se centrifugaron a 4 °C durante 20 min y el sobrenadante fue desechado. Luego, los pellets de cada muestra fueron lavados con 500  $\mu$ l de una solución de lavado (EtOH 70° + 0,2 M de NaOAc) y a continuación se descartó el sobrenadante previo centrifugado a 13.000 rpm durante 10 min. El pellet limpio fue secado en estufa a 37 °C durante 20 min, para finalmente disolverlo agregando 25  $\mu$ l de buffer TE estéril (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8). El ADN en solución así obtenido se mantuvo en un freezer a -20 °C. Las muestras de ADN fueron cuantificadas utilizando patrones de ADN de concentración conocida, mediante comparación visual, y a partir de la separación electroforética en geles de agarosa al 1 %, a 40 V durante 1 h, y utilizando buffer TAE 1X (Tris-HCl 40 mM; NaOAc 5 mM; EDTA 0,77 mM, pH 8,0). La comparación se hizo bajo luz UV, después de la tinción con bromuro de etidio (10 mg ml<sup>-1</sup>) y se documentó fotografiando con GelDoc-It Imaging System®. A partir de las cuantificaciones realizadas se hicieron, por separado, diluciones de cada una de las muestras de ADN para llevarlas a una concentración de 10 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>, las cuales fueron utilizadas para realizar las amplificaciones por PCR.

### Obtención de los perfiles moleculares

Las huellas genéticas, basadas en el ADN, de cada una de las plantas fueron generadas a partir del empleo de marcadores de ISSR. Los iniciadores (en inglés, “primers”) usados fueron seleccionados de un set de 20 iniciadores al azar, los cuales contenían secuencias repetitivas de 8 dinucleótidos, 5 trinucleótidos o 4 tetranucleótidos, y previamente varios de ellos habían sido empleados en un estudio de diversidad en *Paspalum notatum*

(Cidade y col., 2008). En una primera etapa, se evaluaron 10 iniciadores para seleccionar aquellos más informativos, es decir los que amplificaban varios loci y mostraban bandas nítidas y reproducibles. A partir de ello, se seleccionaron cinco iniciadores los cuales fueron evaluados con la totalidad de las plantas (Tabla 1. 1). Las reacciones de amplificación por PCR fueron realizadas en un termociclador marca Bio-Rad ® modelo MyCycler con placa para 96 tubos de 0,2 µl. La mezcla de la reacción se realizó en un volumen de 25 µl conteniendo: 10 ng de ADN genómico, buffer de PCR 1X (Promega ®), 0,25 mM de cada dNTP, 0,2 mM de iniciador, y 1U de *Taq* polimerasa (Promega ®). La programación utilizada para la amplificación consistió de los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, 40 ciclos con un paso de desnaturalización a 94 °C por 1 min, un paso de hibridación (annealing) a 42-52 °C (dependiendo del iniciador, Tabla 1. 1) y un paso de elongación a 72 °C durante 1 min. Finalmente, un paso de elongación final a 72 °C durante 5 min. Los productos de la amplificación fueron suplementados con 5 µl de buffer de carga (40 % p/v de sacarosa, 0,25 % de azul de bromofenol, 0,25 % p/v de xylencianol). La separación electroforética de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 2 %, corriendo a 55 V durante 4 horas en buffer TAE 1X y el teñido se realizó con bromuro de etidio. Los perfiles moleculares se visualizaron bajo luz UV y se fotografiaron para su posterior análisis con GelDoc-It Imaging System ®.

### ***Determinación del nivel de ploidía***

Una vez identificados los diferentes genotipos se realizaron recuentos cromosómicos para determinar el nivel de ploidía de los materiales en estudio. La metodología utilizada fue la técnica clásica de conteo de cromosomas mitóticos en células meristemáticas de raíz por medio de aplastado de ápices meristemáticos, tinción con reactivo de Fuelgen y observación mediante microscopio óptico con contraste de fases. Las raíces se obtuvieron de plantas jóvenes creciendo en macetas en invernáculo.

Como el medio ambiente influye en la duración del ciclo celular, el mejor horario de extracción de raíces (para aplicar el pre-tratamiento) varía de acuerdo a la especie, la época del año y la localidad en donde se realice. Para determinar la hora más apropiada para el pre-tratamiento de las raíces, se extrajeron y se fijaron las raíces a diferentes horas del día y con ellas se siguió la secuencia de pasos de la metodología de “squash” hasta poder observar las células meristemáticas bajo el microscopio y se compararon las proporciones de células en

prometafase y metafase presentes para los diferentes horarios de extracción. Se estableció como la mejor hora de colección (aquella donde se encuentre un mayor número de células en pro-metafase o metafase) el horario comprendido entre las 8 y 9 de la mañana, para jornadas donde los dos días previos hayan sido soleados y en la época de primavera-verano.

Se recogieron entre 5 y 10 puntas de raíces por cada genotipo. Las raíces se lavaron y se las incluyó en una solución saturada del agente antimitótico utilizado para el pre-tratamiento. En este caso, el agente para el pre-tratamiento seleccionado fue  $\alpha$ -bromonaftaleno, puesto que ya había sido utilizado para pre-tratar especies de gramíneas con buenos resultados en el mismo ambiente y laboratorio en que se llevó a cabo esta tesis. Un paso importante fue determinar el tiempo de exposición óptimo al agente de pre-tratamiento, lo cual se hizo de forma similar a la determinación del horario de colección de raíces: mediante la observación del resultado final al aplicar la técnica con diferentes tiempos de pre-tratamiento con  $\alpha$ -bromonaftaleno, variables entre 2 y 4 horas y media. A las 4 horas y media se observó una buena condensación cromosómica, la cual no se conseguía con menores tiempos de exposición, quedando ese tiempo establecido como la duración del pre-tratamiento. Luego de cuatro horas y media, la solución de pretratamiento fue inmediatamente descartada y se procedió a la hidrólisis de las paredes celulares de las raíces que se utilizarían en el día, en fresco o al fijado de las que se utilizarían en jornadas subsiguientes. Como agente fijador se utilizó una mezcla de Etanol absoluto: Ácido Acético 3:1. Las raíces pretratadas se fijaron durante 24 horas en la solución de fijado y luego se las conservó en freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$  en solución fijadora fresca. La hidrólisis se realizó agregando una solución de HCl 1 N en la cual se las incubó a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Si las raíces habían sido fijadas, debieron ser sometidas a 3 lavados en agua destilada por 10 minutos, previamente a la hidrólisis; este tratamiento no solo eliminaba el fijador sino que contribuía a rehidratar los tejidos. Finalmente, las raíces fueron transferidas a un tubo conteniendo la solución de tinción de Feulgen por un lapso de tiempo de entre 30 minutos a 1 hora, hasta observar coloración rosada intensa en el ápice de las raíces. A cada punta de raíz se le quitó la caliptra, con la ayuda de un bisturí y bajo una lupa estereoscópica EZ4 (Leica ®), aislando la porción meristemática. Se colocó una gota de acetocarmín sobre un portaobjetos de vidrio limpio y la parte de la raíz diseccionado fue transferida a este y macerada. Se eliminaron restos de tejido, se colocó un cubreobjetos sobre el tejido macerado y se esparcieron las células presionando firmemente con el dedo pulgar. La preparación se observó bajo microscopio óptico (Leica

DM 2500 ®) y el número de cromosomas se contó en la prometafase mitótica de las células meristemáticas a 100 X de aumento.

### *Análisis de la diversidad molecular*

La diversidad a nivel molecular fue evaluada en base a los polimorfismos detectados en el ADN por parte de los marcadores de ISSR. La metodología empleada para la obtención de los perfiles moleculares es la misma descrita previamente para la tipificación genética de los individuos. Los iniciadores empleados en el análisis de diversidad fueron en total 10 y se seleccionaron en base al número de loci detectados y el nivel de polimorfismo observado (Tabla 1. 1).

**Tabla 1. 1. Información de los iniciadores involucrados en la identificación de genotipos y el análisis de la diversidad molecular.**

IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS		DIVERSIDAD MOLECULAR					
Iniciadores probados	Ta	Iniciadores seleccionados/ utilizados	Iniciadores probados	Ta	Iniciadores seleccionados	Iniciadores utilizados	Ta
(ATG) <sub>5</sub> GA	42	(ATG) <sub>5</sub> GA	(GA) <sub>8</sub> T	46	(GA) <sub>8</sub> T	(ATG) <sub>5</sub> GA	42
(AG) <sub>8</sub> T	46	(AG) <sub>8</sub> T	(CA) <sub>8</sub> T	46		(AG) <sub>8</sub> T	46
(CA) <sub>8</sub> T	46		(AC) <sub>8</sub> T	46		(GA) <sub>8</sub> T	46
(TC) <sub>8</sub> A	46		(GA) <sub>8</sub> G	48		(CA) <sub>8</sub> G	48
(AG) <sub>8</sub> C	48		(AC) <sub>8</sub> G	48		(GA) <sub>8</sub> C	48
(GT) <sub>8</sub> C	48	(GT) <sub>8</sub> C	(GA) <sub>8</sub> C	48	(GA) <sub>8</sub> C	(GT) <sub>8</sub> C	48
(CA) <sub>8</sub> G	48	(CA) <sub>8</sub> G	(AC) <sub>7</sub> GAG	48		(GA) <sub>8</sub> TC	50
(CT) <sub>8</sub> G	48		(GA) <sub>8</sub> TC	50	(GA) <sub>8</sub> TC	(AG) <sub>8</sub> GC	52
(GT) <sub>8</sub> TC	50		(AGAC) <sub>4</sub> GC	52	(AGAC) <sub>4</sub> GC	(AGAC) <sub>4</sub> GC	52
(AG) <sub>8</sub> GC	52	(AG) <sub>8</sub> GC	(CTC) <sub>6</sub> AC	60	(CTC) <sub>6</sub> AC	(CTC) <sub>6</sub> AC	60

**Ta: Temperatura de anhealing.**

### **Análisis estadístico**

Para analizar los resultados obtenidos de los patrones de amplificación de los marcadores moleculares, se tomaron en cuenta sólo las bandas claramente identificables y nítidas. Los patrones electroforéticos y los datos de los mismos se transformaron en datos binarios clasificándolos como presente (1) o ausente (0). Los datos dudosos (casos de posibles fallas en la amplificación de la muestra o presencia poco clara de la banda), no fueron registrados y quedaron vacíos. Mediante el software estadístico InfoGen® (Balzarini y Di Rienzo, 2004; Balzarini y col., 2008 ), se obtuvieron las distancias genéticas promedio de pares entre las accesiones y entre los genotipos. La fórmula de distancia seleccionada para el análisis fue la disimilitud de Jaccard (1-J) que toma valores entre 0 y 1 y está definida como  $(1 - J) (i1, i2) = 1 - [a / (a + b + c)]$ ; donde J es el coeficiente de similitud de Jaccard entre el par



conformado por el individuo  $i1$  y el individuo  $i2$ ,  $a$  es el número de posiciones con bandas compartidas para ambos individuos;  $b$  es el número de posiciones en las que el individuo  $i1$  tiene una banda pero  $i2$  no, y  $c$  es el número de posiciones en las que el individuo  $i2$  tiene una banda, pero  $i1$  no (Kosman y Leonard, 2005). Mediante el software estadístico InfoGen® (Balzarini y Di Renzo, 2004; Balzarini y col., 2008), se construyeron dendrogramas utilizando el método de agrupamiento de pares no ponderado por media aritmética (UPGMA) (del inglés, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Mediante este análisis es posible dividir una población de individuos en un número determinado de subgrupos, optimizando el grado de homogeneidad interna de cada uno y el método minimiza la distancia entre grupos, al tomar la distancia promedio de todos los pares entre los individuos de la muestra (Balzarini y col., 2008).

El número de diferentes genotipos se determinó utilizando los software estadísticos GenoDive® y GenoType® (Meirmans y Van Tienderen, 2004) con los cuales se aplica un sistema de simulación basado en el número de diferencias genotípicas a partir de un ancestro común para asignar a cada individuo una identidad genética a partir de la información proporcionada por la mayoría de los diferentes tipos de marcadores moleculares, incluyendo marcadores codominantes como ISSR. GenoType está diseñado para analizar información proveniente de organismos que se reproducen clonalmente y puede trabajar con poliploides. Con esa información el programa puede determinar el número de individuos que se diferencian por su origen y no debido a posibles eventos mutacionales. GenoDive puede calcular y probar índices de diversidad clonal (como el número de genotipos) en una población cuyos genotipos fueron analizados con GenoType. Del análisis de los datos analizados con estos programas se obtuvo la distancia genética mínima que debe separar cada par de genotipos analizados para poder considerarlos diferentes.

También se calculó el coeficiente de correlación cofenética para corroborar la existencia de una buena correlación entre las distancias definidas por la métrica de árbol binario con las distancias originales entre los individuos.

El concepto de polimorfismo se utiliza para definir la variación genética en una población. La capacidad informativa de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese *locus* y de sus frecuencias relativas, puede medirse por su contenido de información polimórfica (PIC, del inglés polymorphic information content). El PIC es actualmente la fórmula más ampliamente aplicada en estudios genéticos, en los últimos 20

años más de un millar de artículos publicados la utilizaron (Nagy y col., 2012). Los iniciadores más útiles para diferenciar entre materiales se determinaron a partir de su PIC y su porcentaje de polimorfismo, calculados utilizando el software estadístico InfoGen® (Balzarini y Di Renzo, 2004). El PIC toma valores de 0 a 1, indicando un mayor nivel de polimorfismo o variación cuando el valor es más cercano a 1.

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 = 1 - p^2 - q^2$$

$f_i$ : frecuencia de banda del i-ésimo alelo.  $p$ : frecuencia de presencia de banda.  $q$ : frecuencia de ausencia de banda.

### ***Análisis de la diversidad morfológica, agronómica y fenológica***

Las plantas identificadas previamente como genotipos distintos fueron multiplicadas en macetas y bajo invernadero y luego fueron plantadas a campo, a una distancia  $2 \times 2$  m, siguiendo un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones (Figura 1. 2).

El ensayo se plantó el 1 de noviembre de 2012 en la EEA-INTA Corrientes (ver ubicación en material vegetal), en un sitio donde el suelo se clasificó como Argiudol. En el ensayo sólo estuvieron representados 26 genotipos, dado que las réplicas del genotipo 21 sufrieron una contaminación y no hubo material suficiente al momento de establecer la parcela experimental. Las plantas fueron regadas cada dos días después de la siembra, durante las dos primeras semanas.



**Figura 1. 2. Ensayo experimental de *Acroceras macrum* en EEA-INTA Corrientes. La imagen corresponde a los distintos genotipos luego de nueve semanas de implantados. Se puede observar diferentes portes en las plantas.**

Una vez que las plantas se establecieron en el campo, se eligieron las características morfológicas y agronómicas a evaluar siguiendo el criterio de variación morfológica que posee la especie, según lo descrito por Zuloaga y col. (1987), además de ciertos caracteres agronómicos y fenológicos frecuentemente evaluados en otras especies de gramíneas y forrajeras. En total se seleccionaron 16 caracteres entre morfológicos, agronómicos y fenológicos. La recolección de datos se realizó entre diciembre de 2012 y mayo de 2013, incluyendo observaciones cualitativas y medidas cuantitativas, con la siguiente metodología:

#### ***Variables morfológicas.***

**Planta entera:** se midió la altura y el diámetro de la planta, a las 9 semanas de la implantación. **Altura de la planta (A):** fue medida desde la superficie del suelo hasta el ápice de las hojas superiores. **Diámetro de la corona (DC):** se determinó como el promedio entre el diámetro menor y el mayor, considerando la extensión hasta el ápice de los estolones, sobre la base de cada planta.

**Partes vegetativas:** Longitud del primer entrenudo visible (LEn): se midió utilizando una regla graduada. La medición se repitió 3 veces por planta, sobre diferentes macollos. Longitud de la lámina foliar (LL) y ancho de lámina foliar (AL): se midieron 3 hojas al azar por planta, con una escala graduada. El largo se midió partiendo desde la base y hasta el ápice de la lámina de la primera hoja totalmente expandida. El ancho se midió como el promedio entre el ancho en la base y el ancho en la mitad de la lámina.

**Partes reproductivas:** se extrajeron por planta 3 panículas completamente expandidas en las que la antesis había ocurrido tanto en el ápice como al final del racimo basal y que a su vez retuviera aún todas las espiguillas. Las observaciones se realizaron en gabinete y se promediaron los valores obtenidos a partir de las 3 panículas. Longitud de la panícula (LP) y longitud del racimo basal (LRB): se midieron con una regla graduada en milímetros, en el primer caso, se midió la distancia desde el nudo de inserción del pedicelo hasta el ápice del racimo superior; en el caso del racimo basal fue la distancia desde la inserción en el eje de la inflorescencia, a la base de la espiguilla más extrema en la punta del racimo. Largo (LEs) y ancho de la espiguilla (AEs): estas variables fueron medidas en 3 espiguillas por racimo y 3 racimos por panícula. Se utilizó una escala graduada cada 0,5 mm y una lupa electrónica para una correcta visualización. El largo fue medido desde la base de la espiguilla hasta la punta de la lemma y el ancho fue medido en la parte más ancha de la espiguilla.

#### ***Variables agronómicas.***

Número de espiguillas (NEs) y porcentaje de espiguillas abiertas (EsA): se extrajeron por planta 3 panículas completamente expandidas en las que la antesis había ocurrido tanto en el ápice como al final del racimo basal y que a su vez retuviera aún todas las espiguillas. Las observaciones se realizaron en gabinete y se promediaron los valores obtenidos a partir de las 3 panículas. Las mediciones se realizaron por conteo manual, tanto de las espiguillas totales de todos los racimos de la panícula, como de la cantidad de espiguillas que presentaron antesis y la cantidad de espiguillas que se encontraban cerradas.

Crecimiento inicial (CI): las plantas se consideraron establecidas a los 45 días de su plantación. Se estableció una escala visual del 1 al 5, siendo 1 el menor y 5 el máximo valor de crecimiento inicial.

Cobertura de suelo (CS): a los 60 días posteriores a la plantación se tomaron fotografías digitales a 1 m de altura sobre cada individuo. Esas imágenes fueron analizadas

mediante el software CobCal® con los mismos parámetros para todas las plantas, el cual permite estimar el porcentaje de superficie de suelo cubierto (Ferrari y col., 2009).

**Biomasa (B):** a los 180 días de la implantación, se cortaron las plantas a una altura de 10 cm de la superficie del suelo y se determinó el peso fresco ( $P$ ) de cada una de ellas. Por cada genotipo se confeccionó una muestra compuesta con aproximadamente 150 g de material proveniente de cada repetición (bloque). Se tomó el peso fresco de cada muestra compuesta ( $P_{mc}$ ) y luego de secarlas hasta alcanzar peso constante a 60 °C en estufa, se determinaron los pesos secos ( $PS$ ). La biomasa por planta se calculó como:

$$B = P \times PS / P_{mc}$$

### ***Variables fenológicas.***

**Período vegetativo (PV):** se contabilizaron los días a partir de la plantación (día cero) hasta la aparición de la primera panícula. **Pico de floración (PF):** se contabilizó la cantidad de días transcurridos desde la emisión de la primera panícula hasta llegar al pico de floración para cada genotipo.

### **Análisis estadístico**

El análisis se realizó con el software estadístico InfoGen® (Balzarini y Di Renzo, 2004; Balzarini y col., 2008). Se llevó a cabo el análisis de la varianza (ANOVA) para identificar las variables informativas de la diversidad entre los genotipos como entre los citotipos, se calcularon las medias y se analizó su separación por la prueba de Tukey. Se obtuvieron los coeficientes de variación total para cada variable entre genotipos y dentro de genotipos, y los coeficientes de correlación de Pearson entre cada uno de ellos con cada uno de los otros y con el nivel de ploidía. Utilizando el mismo software, se realizó el análisis de componentes principales (PCA, del inglés Principal Component Analysis) estimándose la contribución de cada variable a la diversidad. A fines de estudiar la diversidad genética contenida en la colección, se utilizó InfoGen® para analizar los datos de las 16 variables fenotípicas (morfológicas, agronómicas y fenológicas) estudiadas, y estimar las distancias genética entre los genotipos. La distancia estadística seleccionada para este análisis fue la euclídea promedio. A partir de la matriz conformada con las distancias euclídeas promedio, calculadas entre todos los posibles pares de datos multivariantes, se obtuvo una matriz de distancias ultramétricas. Por el método UPGMA, se construyó el dendrograma correspondiente a la matriz de distancias ultramétricas.

Como criterio de proximidad entre la matriz de distancias euclideas promedio y la matriz ultramétrica, se utilizó la correlación cofenética expresada según el coeficiente de Pearson. Este coeficiente toma valores entre -1 (matrices inversamente proporcionales) y 1 (cuando ambas matrices son proporcionales, es decir cuando la matriz de distancias cumple la condición ultramétrica). El valor cero indica que no existe correlación entre las matrices.

La significancia y magnitud de la relación entre la matriz de datos datos moleculares y la matriz de datos morfológicos, agronómicos y fenológicos, se evaluó mediante el test de Mantel, también con InfoGen® (Balzarini y Di Rienzo, 2004; Balzarini y col., 2008). Similarmente a lo explicado para las matrices ultramétricas y las de distancias entre pares de datos, el test de Mantel explicó la correlación entre las matrices mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

## RESULTADOS

### Tipificación genética

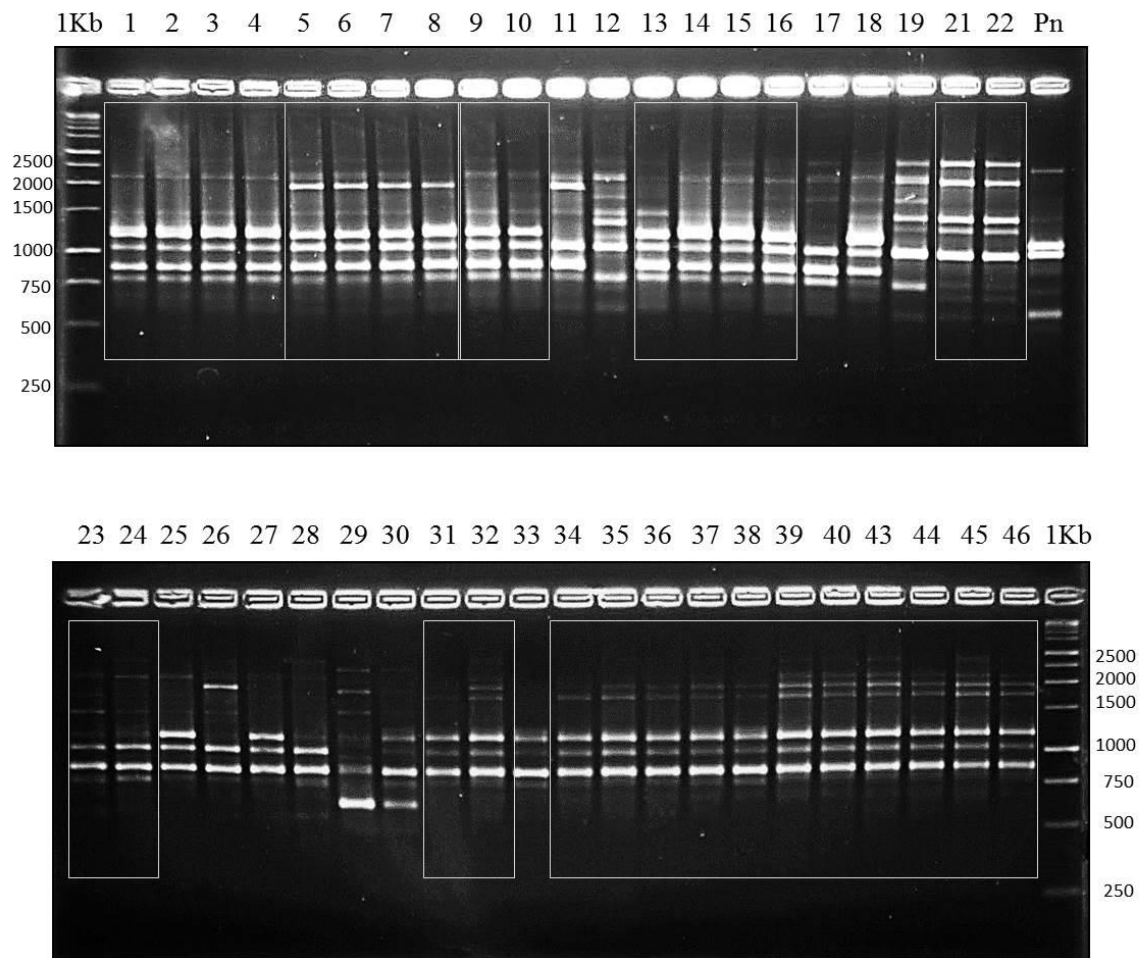
Los 5 iniciadores evaluados identificaron un total de 98 marcadores, de los cuales 97 resultaron ser polimórficos (Tabla 1. 2). El rango de marcadores detectados por iniciador varió entre 13 y 24, con un promedio de 19 marcadores por iniciador. El índice promedio de polimorfismo detectado fue de 99 % ya que sólo un marcador resultó ser amplificado por todos los individuos evaluados (Tabla 1. 2). La capacidad de los marcadores iniciadores para distinguir entre los genotipos, evaluada mediante sus valores de PIC, varió entre 0,23 y 0,28.

**Tabla 1. 2. Información molecular obtenida con 5 iniciadores de ISSR en la tipificación genética de una colección de 47 accesiones de *Acroceras macrum*.**

INICIADOR	MARCADORES POLI- MÓRFICOS	MARCADORES MONO- MÓRFICOS	MARCADORES TOTALES	ÍNDICE DE POLIMORFISMO (%)	PIC±EE*
(AG) <sub>8</sub> GC	14	0	14	100	0,25± 0,02
(CA) <sub>8</sub> G	23	0	23	83	0,23± 0,02
(AG) <sub>8</sub> T	24	0	24	92	0,28± 0,01
(ATG) <sub>5</sub> GA	23	1	24	79	0,25± 0,02
(GT) <sub>8</sub> C	13	0	13	77	0,25± 0,01
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>1</b>	<b>98</b>	<b>99</b>	

\*PIC: contenido de información polimórfica; EE: error estándar.

En la Figura 1. 3, se puede observar un ejemplo ilustrativo de la amplificación de patrones monomórficos y polimórficos, generados a partir de iniciadores de ISSR. Las accesiones repetidas presentaron patrones monomórficos con la mayor parte de los iniciadores, en la Figura 1. 3 se recuadraron para facilitar la comparación de los mismos.



**Figura 1. 3. Patrones electroforéticos obtenidos en accesiones de *Acroceras macrum* con el iniciador para amplificación en regiones génicas ISSR (GT)<sub>8</sub> C. Se recuadran los patrones monomórficos observados para algunos genotipos. 1 Kb: marcador de peso molecular. Pn: *Paspalum notatum*.**

A partir del análisis de los datos genéticos con los programas estadísticos GenoType y GenoDive, se estableció una distancia genética mínima de 0,2 unidades para considerar diferentes dos genotipos (línea de corte en la

Figura 1. 4). En la

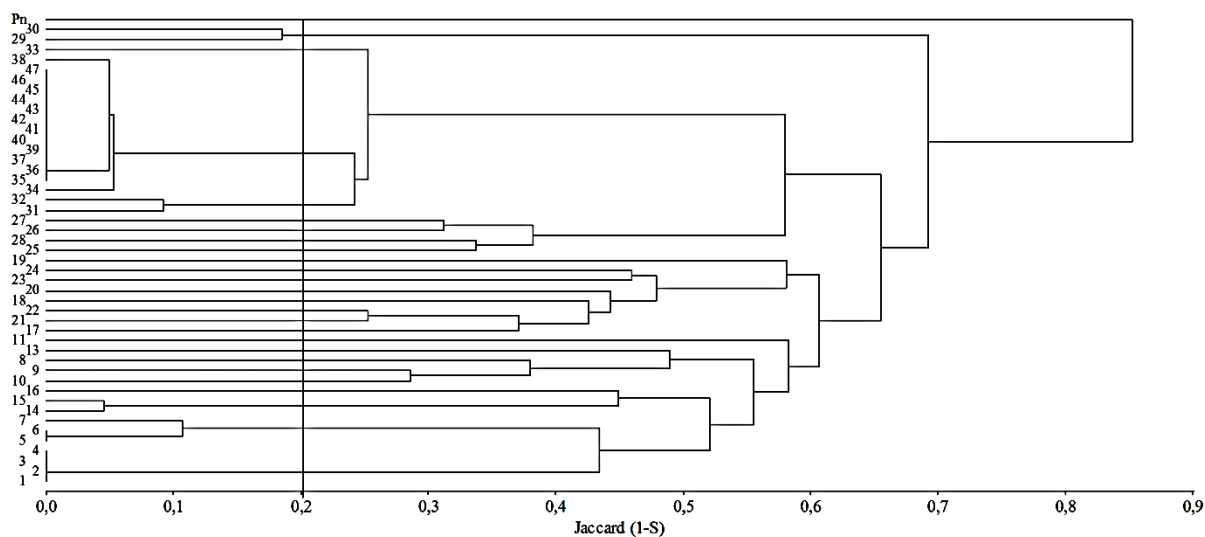
Figura 1. 4 se muestra el dendrograma en función de las distancias Jaccard (1-S), a partir del análisis por UPGMA. En el mismo, 18 individuos se distribuyeron en tres grupos donde los individuos agrupados estaban separados a una distancia igual a cero uno de otro, por lo cual se consideraron esos individuos como repeticiones de sólo 3 genotipos (Tabla 1. 3). El primero de esos genotipos correspondió a los individuos 1, 2, 3 y 4, el segundo al 5 y 6 y el tercero fue el genotipo de los individuos 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47. Todo el material importado por productores, se agrupó como repeticiones de ese último



genotipo (Tabla 1. 3). Los individuos que presentaron distancias genéticas en un rango de 0,5 a 0,11 unidades, también se consideraron repeticiones de un mismo genotipo. Con ese criterio, el individuo 7 correspondió al genotipo del grupo integrado por 5 y 6; 14 y 15 fueron las repeticiones de otro genotipo; y lo mismo sucedió con los individuos 31 y 32; el individuo 34 por su parte fue una repetición más del genotipo correspondiente al grupo de individuos 35-36-37-39-40-41-42-43-44-45-46-47 (Tabla 1. 3). Los individuos 29 y 30 estuvieron separados por 0,19 unidades de distancia y hasta un cálculo más ajustado de sus distancias (enriqueciendo el análisis con un mayor número de marcadores) se consideraron posibles genotipos diferentes. Los 20 individuos restantes resultaron separados por una distancia genética mayor a 0,2 unidades de distancia y se consideraron cada uno de ellos un genotipo diferente. Los 20 genotipos representados por los individuos separados por una distancia mayor a 0,2 unidades, los dos genotipos representados por los individuos 29 y 30 y los cinco genotipos integrados por individuos separados por una distancia entre cero y 0,11; recibieron una nueva identidad numérica, quedando identificados con la numeración 1 a 27, nomenclatura que se utilizó en los análisis posteriores (Tabla 1. 3).

**Tabla 1. 3. Repeticiones de genotipos, determinadas a partir de las distancias genéticas Jaccard (1-S) obtenidas en la tipificación genética de una colección de *Acroceras macrum*.**

<b>GENOTIPO</b>	<b>REPETICIONES</b>	<b>RANGO DE DISTANCIAS GENÉTICAS</b>
<b>1</b>	1, 2, 3, 4	0
<b>2</b>	5, 6, 7	(0 - 0,11)
<b>3</b>	8	
<b>4</b>	9	
<b>5</b>	10	
<b>6</b>	11	
<b>7</b>	12	
<b>8</b>	13	
<b>9</b>	14, 15	0,5
<b>10</b>	16	
<b>11</b>	17	
<b>12</b>	18	
<b>13</b>	19	
<b>14</b>	20	
<b>15</b>	21	
<b>16</b>	22	
<b>17</b>	23	
<b>18</b>	24	
<b>19</b>	25	
<b>20</b>	26	
<b>21</b>	27	
<b>22</b>	28	
<b>23</b>	29	
<b>24</b>	30	
<b>25</b>	31, 32	0,09
<b>26</b>	33	

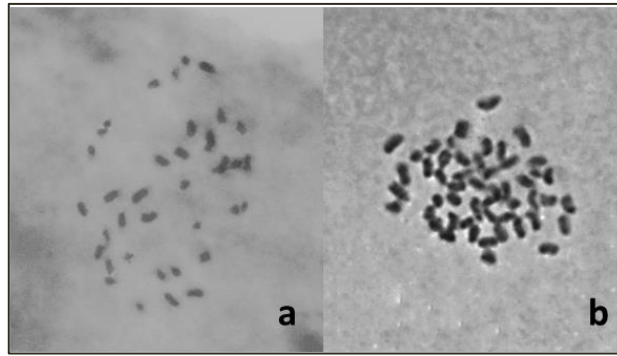


**Figura 1. 4. Dendrograma en base a perfiles moleculares ISSR de 47 accesiones de *Acroceras macrum*, utilizando el método UPGMA y los coeficientes de disimilitud de Jaccard (1-S). Las accesiones separadas por 0,2 (o más) unidades de distancia (se señala en la figura con una línea vertical) se consideraron genéticamente diferentes.**

Si bien el iniciador  $(GT)_8 C$ , cuyo patrón de amplificación se observa en la Figura 1. 3, fue el que menor polimorfismo total presentó (77 %) (Tabla 1. 2); fue un iniciador útil para discriminar entre accesiones separadas por distancias cercanas a 0,2 unidades (distancia límite para la separación de genotipos) como la 29 y 30, o la 33 de un grupo de accesiones para el cual el iniciador resultó monomórfico como la 31-32-34-35-36-37-38-39-40-43-44-45-46-47.

#### ***Determinación de los niveles de ploidía***

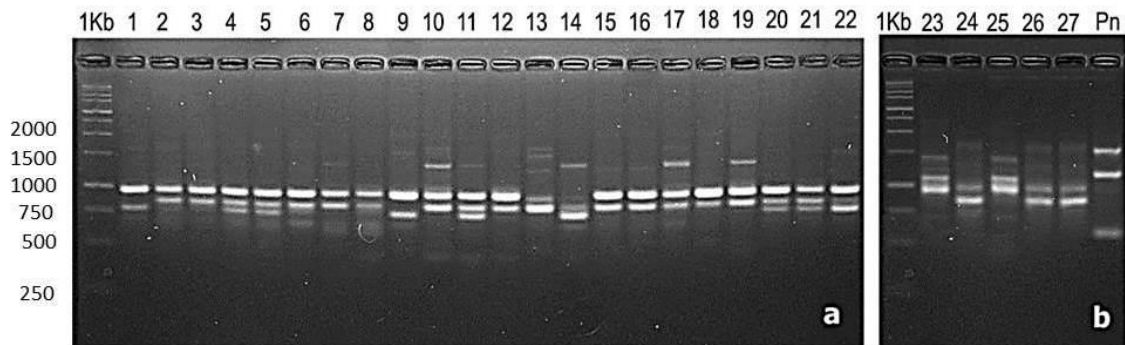
El conteo de cromosomas de células meristemáticas de raíz de los 27 genotipos identificados, reveló sus niveles de ploidía. El 81,25 % de los genotipos fueron identificados como tetraploides ( $2n=4x=36$ ) (Figura 1. 5 a) y el resto fueron hexaploides ( $2n=6x=54$ ) (Figura 1. 5 b). El citotipo tetraploide quedó integrado por los genotipos que recibieron la nueva numeración de #1 a #22, mientras que los otros cinco (numerados de #23 a #27), integraron el citotipo hexaploide.



**Figura 1. 5.** Células meristemáticas de *Acroceras macrum* en prometafase tratadas con el método de Squash y la tinción de Feulgen. a. Célula de una línea tetraploide, con 36 cromosomas. b. Célula con 54 cromosomas de una línea hexaploide.

### *Análisis de la diversidad molecular*

La diversidad genética contenida entre los 27 genotipos identificados se estudió mediante el polimorfismo de bandas generadas por PCR utilizando 10 iniciadores ISSR. La Figura 1. 6 muestra el patrón electroforético obtenido con el iniciador (GA)<sub>8</sub> G. En la misma puede observarse como la mayor parte de las bandas polimórficas obtenidas se distribuyen dentro del citotipo tetraploide (Figura 1. 6 a) y cómo en el citotipo hexaploide (Figura 1. 6 b) los patrones de amplificación son comunes a dos o más genotipos.



**Figura 1. 6.** Patrón electroforético de 27 genotipos de *Acroceras macrum* obtenido con el iniciador de ISSR (GA)<sub>8</sub> G. a. Genotipos tetraploides ( $2n=4x=36$ ). b. Genotipos hexaploides ( $2n=6x=54$ ) y *Paspalum notatum* (Pn). 1 Kb: marcador de peso molecular.

Un total de 206 marcadores fueron detectados con los 10 primers de ISSR utilizados (entre 13 y 33 por iniciador), de los cuales el 98,5 % fueron polimórficos considerando todos los genotipos (4x y 6x). Los tamaños de los fragmentos amplificados variaron entre 317 pb y 3918 pb.

**Tabla 1. 4. Información molecular obtenida a partir de 10 iniciadores de ISSR en una colección de 27 genotipos de *Acroceras macrum*, para los citotipos tetraploide (4x) y hexaploide (6x). Secuencia repetitiva de los primers, número de loci detectados, índice de polimorfismo y contenido de información polimórfica (PIC) para cada iniciador.**

INICIADOR	NÚMERO DE <i>LOCI</i>			ÍNDICE DE POLIMORFISMO (%)			PIC±EE		
	total	4x	6x	total	4x	6x	total	4x	6x
(GA) <sub>8</sub> T	13	10	11	92	90	73	0,28±0,03	0,30±0,03	0,35±0,01
(GA) <sub>8</sub> C	13	12	11	100	92	64	0,27±0,03	0,30±0,03	0,34±0,02
(GA) <sub>8</sub> TC	17	17	14	88	88	57	0,26±0,03	0,28±0,03	0,33±0,02
(AG) <sub>8</sub> GC	32	31	21	94	100	86	0,27±0,02	0,26±0,02	0,31±0,01
(CTC) <sub>6</sub> AC	28	26	20	100	100	85	0,25±0,01	0,25±0,01	0,34±0,01
(AGAC) <sub>4</sub> GC	19	19	15	79	100	53	0,23±0,01	0,20±0,01	0,36±0,002
(CA) <sub>8</sub> G	23	22	11	83	100	82	0,23±0,01	0,23±0,01	0,36±0,001
(AG) <sub>8</sub> T	24	24	18	96	100	56	0,27±0,01	0,27±0,01	0,30±0,01
(ATG) <sub>5</sub> GA	24	24	16	83	92	81	0,28±0,02	0,25±0,01	0,34±0,01
(GT) <sub>8</sub> C	13	12	7	92	100	57	0,25±0,01	0,25±0,01	0,34±0,004
<b>Total</b>	<b>206</b>	<b>197</b>	<b>144</b>	<b>98,5</b>	<b>97</b>	<b>71</b>			

Si consideramos por separado los resultados según el nivel de ploidía de los genotipos (4x y 6x) observamos que en el grupo de genotipos 4x se detectaron 197 marcadores, de los cuales el 97 % resultaron ser polimórficos; mientras que en el grupo de genotipos 6x se detectaron 144 marcadores y el 71 % fueron polimórficos (Tabla 1. 4). El número de *loci* por iniciador varió entre 10 y 31 para el citotipo 4x y entre 7 y 21 para el 6x; con un promedio de 19,7 y 14,4 marcadores por iniciador, respectivamente. El índice de polimorfismo total por primer varió entre 83 y 100 %; a su vez al discriminar por nivel de ploidía, este porcentaje varió entre 88 y 100 % en el citotipo 4x y entre 53 y 86 % en el 6x (Tabla 1. 4). El PIC fue utilizado para evaluar la capacidad discriminadora de los iniciadores estudiados. El valor más alto de 0,28 fue alcanzado por los iniciadores (GA)<sub>8</sub>T y (ATG)<sub>5</sub>GA. A nivel de citotipo, los primers (GA)<sub>8</sub>T y (GA)<sub>8</sub>C mostraron el valor de PIC más alto (0,30); mientras que para los citotipos 6x el valor más alto (0,36) fue alcanzado por los primers (CA)<sub>8</sub>G y (AGAC)<sub>4</sub>GC (Tabla 1. 5).

La Tabla 1. 5 corresponde a la matriz de distancias Jaccard (1-S) para los genotipos estudiados en el análisis de la diversidad molecular. La distancia Jaccard mínima entre pares de genotipos 4x (0,27) se observó entre los genotipos #4 y 5, la máxima (0,70) se dió en el par #10 – #22 (Tabla 1. 5). El máximo valor de distancia Jaccard entre pares de hexaploides (0,67) fue observado entre los genotipos #23 y 27 (Tabla 1. 5). La menor

distancia Jaccard (0,22) se observó en el par de genotipos hexaploides #26 y 27 (Tabla 1. 5). Las distancias Jaccard a una especie diferente, en este caso *Paspalum notatum*, variaron de 0,79 a 0,87 (Tabla 1. 5).

**Tabla 1. 5. Matriz de distancias Jaccard (1-S) obtenida mediante marcadores de ISSR, para una colección de 27 genotipos de *Acroceras macrum*, y una accesión de *Paspalum notatum* (Pn).**

	1	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	2	20	21	22	23	24	25	26	27	3	4	5	6	7	8	9	Pn		
<b>1</b>	0,00																													
<b>10</b>	0,63	0,00																												
<b>11</b>	0,63	0,53	0,00																											
<b>12</b>	0,60	0,53	0,50	0,00																										
<b>13</b>	0,67	0,58	0,55	0,61	0,00																									
<b>14</b>	0,69	0,61	0,53	0,53	0,51	0,00																								
<b>15</b>	0,64	0,51	0,44	0,52	0,57	0,51	0,00																							
<b>16</b>	0,63	0,52	0,44	0,55	0,59	0,56	0,33	0,00																						
<b>17</b>	0,67	0,58	0,55	0,60	0,60	0,59	0,55	0,53	0,00																					
<b>18</b>	0,64	0,55	0,48	0,53	0,59	0,60	0,48	0,46	0,55	0,00																				
<b>19</b>	0,64	0,62	0,60	0,63	0,64	0,64	0,55	0,55	0,63	0,54	0,00																			
<b>2</b>	0,48	0,59	0,64	0,61	0,73	0,67	0,64	0,63	0,67	0,68	0,67	0,00																		
<b>20</b>	0,63	0,69	0,62	0,67	0,69	0,66	0,63	0,63	0,64	0,56	0,47	0,68	0,00																	
<b>21</b>	0,61	0,68	0,55	0,65	0,68	0,66	0,60	0,59	0,64	0,56	0,45	0,70	0,37	0,00																
<b>22</b>	0,65	0,70	0,62	0,63	0,60	0,65	0,62	0,63	0,65	0,61	0,49	0,68	0,50	0,48	0,00															
<b>23</b>	0,71	0,70	0,72	0,71	0,74	0,68	0,72	0,71	0,70	0,74	0,68	0,76	0,73	0,78	0,72	0,00														
<b>24</b>	0,73	0,74	0,74	0,75	0,79	0,78	0,74	0,75	0,74	0,73	0,73	0,75	0,72	0,72	0,73	0,63	0,00													
<b>25</b>	0,74	0,76	0,71	0,72	0,80	0,64	0,71	0,70	0,68	0,74	0,70	0,74	0,70	0,71	0,71	0,47	0,67	0,00												
<b>26</b>	0,67	0,67	0,67	0,66	0,69	0,67	0,68	0,68	0,64	0,65	0,64	0,67	0,66	0,65	0,60	0,61	0,62	0,54	0,00											
<b>27</b>	0,68	0,69	0,66	0,66	0,70	0,67	0,68	0,68	0,62	0,65	0,65	0,69	0,66	0,66	0,59	0,67	0,64	0,53	0,22	0,00										
<b>3</b>	0,55	0,61	0,62	0,56	0,65	0,63	0,65	0,62	0,67	0,67	0,64	0,54	0,63	0,67	0,67	0,77	0,75	0,76	0,70	0,72	0,00									
<b>4</b>	0,58	0,56	0,58	0,56	0,66	0,63	0,67	0,68	0,67	0,67	0,62	0,57	0,61	0,65	0,65	0,77	0,74	0,75	0,69	0,65	0,42	0,00								
<b>5</b>	0,64	0,56	0,60	0,56	0,67	0,64	0,66	0,69	0,68	0,70	0,62	0,61	0,61	0,70	0,67	0,78	0,75	0,77	0,71	0,70	0,47	0,27	0,00							
<b>6</b>	0,58	0,61	0,61	0,58	0,64	0,62	0,62	0,61	0,68	0,65	0,64	0,60	0,67	0,64	0,65	0,71	0,71	0,70	0,65	0,66	0,56	0,54	0,53	0,00						
<b>7</b>	0,66	0,61	0,57	0,61	0,65	0,62	0,64	0,64	0,70	0,67	0,62	0,60	0,68	0,68	0,68	0,75	0,70	0,69	0,65	0,65	0,59	0,56	0,56	0,42	0,00					
<b>8</b>	0,63	0,54	0,62	0,54	0,68	0,62	0,63	0,62	0,68	0,64	0,64	0,64	0,64	0,65	0,63	0,70	0,69	0,69	0,61	0,60	0,52	0,49	0,51	0,48	0,47	0,00				
<b>9</b>	0,59	0,50	0,56	0,50	0,68	0,61	0,55	0,56	0,68	0,56	0,66	0,59	0,66	0,65	0,71	0,74	0,68	0,74	0,70	0,71	0,60	0,60	0,60	0,60	0,64	0,56	0,00			
<b>Pn</b>	0,84	0,84	0,84	0,83	0,85	0,85	0,85	0,84	0,84	0,87	0,83	0,83	0,87	0,86	0,82	0,85	0,86	0,84	0,85	0,84	0,83	0,83	0,84	0,80	0,79	0,82	0,83	0,00		

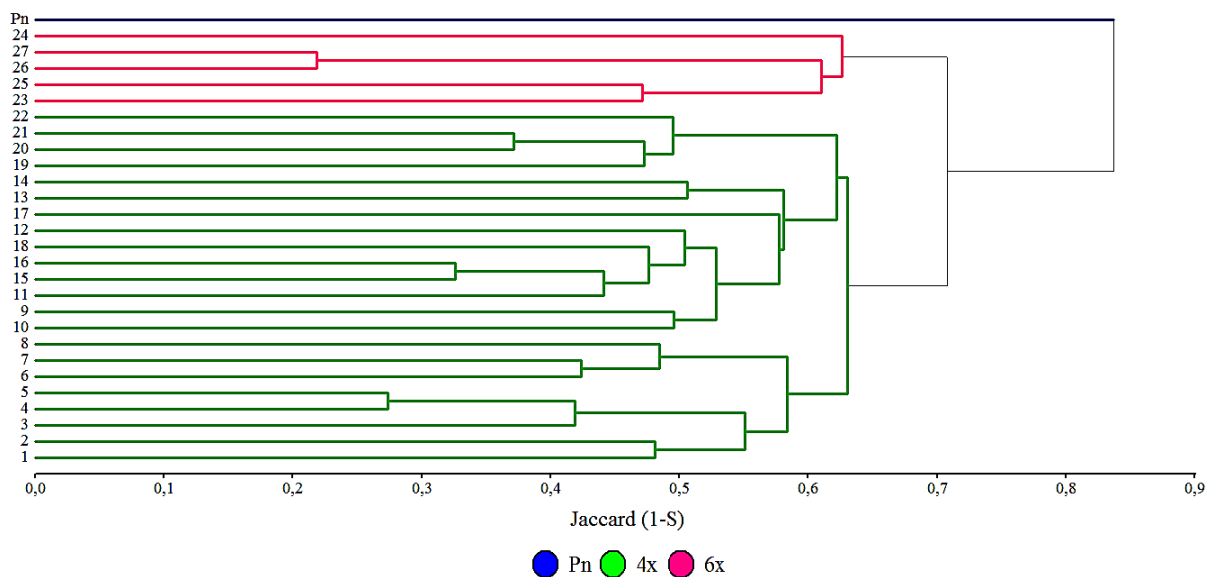
Las distancias genéticas obtenidas de los datos (distancias jaccard) (Tabla 1. 5) permitieron obtener las distancias ultramétricas (Tabla 1. 6) con las que se construyó el dendrograma de la Figura 1. 7. Las distancias genéticas ultramétricas entre los genotipos variaron entre 0,22 y 0,71. Los genotipos aparecieron formando dos grupos en función de su nivel de ploidía, es decir, un clúster para tetraploides y otro para hexaploides (Figura 1. 7). Dicha distancia varió entre 0,28 y 0,64 dentro del clúster tetraploide y entre 0,22 y 0,63 en el hexaploide. La distancia mínima observada entre pares de genotipos 6x (0,22), confirmó que las dos accesiones menos distantes (genotipos #26 y 27) se mantuvieron a una distancia superior a 0,20 que fue el límite considerado en la genotipificación para establecer que dos individuos

pertenecen a distintos genotipos (Tabla 1. 6). La máxima distancia genética entre pares de genotipos fue de 0,80 y correspondió al par de genotipos #13 (4x) - #25 (6x) (Tabla 1. 6).

**Tabla 1. 6. Matriz de distancias ultramétricas obtenida mediante marcadores de ISSR, para una colección de 27 genotipos de *Acroceras macrum*, y una accesión de *Paspalum notatum* (Pn).**

	1	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	2	20	21	22	23	24	25	26	27	3	4	5	6	7	8	9	Pn	
<b>1</b>	0,00																												
<b>10</b>	0,63	0,00																											
<b>11</b>	0,63	0,53	0,00																										
<b>12</b>	0,63	0,53	0,50	0,00																									
<b>13</b>	0,63	0,58	0,58	0,58	0,00																								
<b>14</b>	0,63	0,58	0,58	0,58	0,51	0,00																							
<b>15</b>	0,63	0,53	0,44	0,50	0,58	0,58	0,00																						
<b>16</b>	0,63	0,53	0,44	0,50	0,58	0,58	0,33	0,00																					
<b>17</b>	0,63	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,00																				
<b>18</b>	0,63	0,53	0,48	0,50	0,58	0,58	0,48	0,48	0,58	0,00																			
<b>19</b>	0,63	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,00																		
<b>2</b>	0,48	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,00																	
<b>20</b>	0,63	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,47	0,63	0,00																
<b>21</b>	0,63	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,47	0,63	0,37	0,00															
<b>22</b>	0,63	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,49	0,63	0,49	0,49	0,00														
<b>23</b>	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,00													
<b>24</b>	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,63	0,00												
<b>25</b>	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,47	0,63	0,00											
<b>26</b>	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,61	0,63	0,61	0,00										
<b>27</b>	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,61	0,63	0,61	0,22	0,00									
<b>3</b>	0,55	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,55	0,63	0,63	0,63	0,71	0,71	0,71	0,71	0,00									
<b>4</b>	0,55	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,55	0,63	0,63	0,63	0,71	0,71	0,71	0,71	0,42	0,00								
<b>5</b>	0,55	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,55	0,63	0,63	0,63	0,71	0,71	0,71	0,71	0,42	0,27	0,00							
<b>6</b>	0,58	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,58	0,63	0,63	0,63	0,71	0,71	0,71	0,71	0,58	0,58	0,58	0,00						
<b>7</b>	0,58	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,58	0,63	0,63	0,63	0,71	0,71	0,71	0,71	0,58	0,58	0,58	0,42	0,00					
<b>8</b>	0,58	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,58	0,63	0,63	0,63	0,71	0,71	0,71	0,71	0,58	0,58	0,58	0,48	0,48	0,00				
<b>9</b>	0,63	0,50	0,53	0,53	0,58	0,58	0,53	0,53	0,58	0,53	0,62	0,63	0,62	0,62	0,62	0,71	0,71	0,71	0,71	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,00			
<b>Pn</b>	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,00

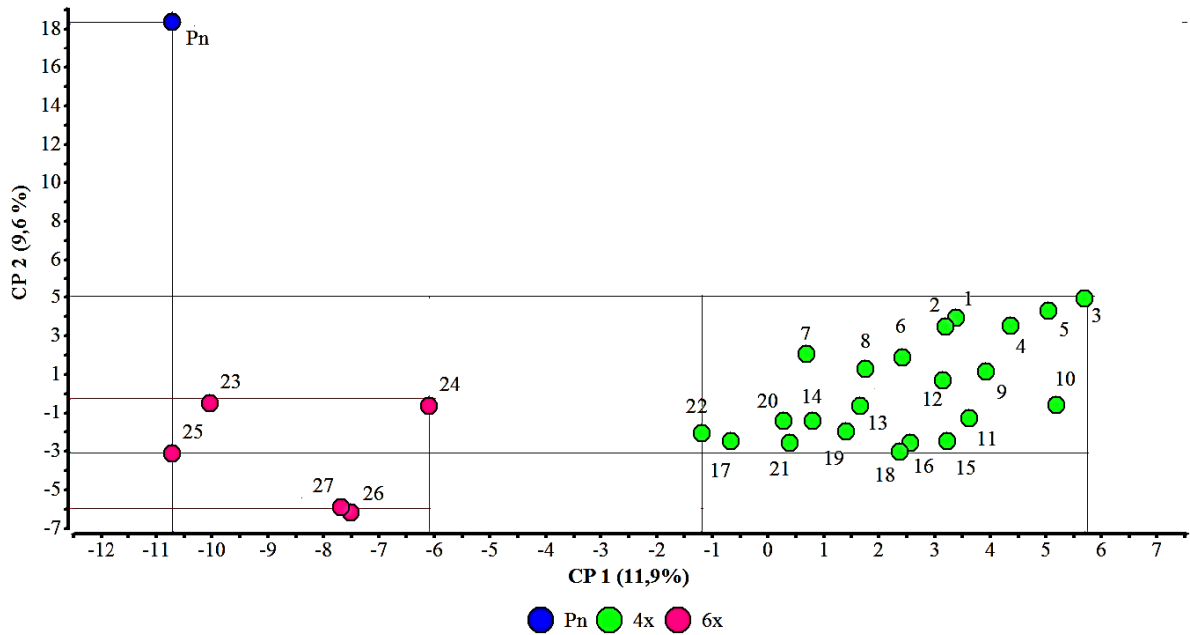
Las distancias Jaccard entre pares de genotipos y las distancias ultramétricas presentaron una correlación cofenética de 0,913. Esto indica que el dendograma utilizado para analizar la diversidad molecular se ajusta correctamente a las distancias genéticas obtenidas a partir de las regiones de ISSR estudiadas en la colección.



**Figura 1. 7. Dendrograma en base a perfiles moleculares ISSR de 27 genotipos de *Acroceras macrum*, utilizando el método UPGMA y los coeficientes de disimilitud de Jaccard (1-S). En color verde y rosado se representan los dos niveles de ploidía obtenidos por conteo cromosómico para cada genotipo. Pn: *Paspalum notatum*.**

La magnitud de las distancias intra y entre citotipos se pueden analizar cualitativamente a partir de un gráfico de componentes principales (Figura 1. 8). Los dos primeros componentes principales explican en conjunto el 21,5 % de la distribución de las distancias moleculares, resultando en el gráfico que se observa en la Figura 1. 8. Si bien el porcentaje explicado no es alto, es capaz de representar varias características de la variabilidad del conjunto de genotipos. Los genotipos que constituyen el citotipo tetraploide se agrupan en la región comprendida entre -1,2 y 5,7 del primer componente principal (CP-1) y entre -3 y 4,5 del segundo componente principal (CP-2); mientras que los genotipos que constituyen el citotipo hexaploide se agrupan en la región comprendida entre -10,7 y -6,1 del CP-1 y entre -6 y -0,5 del CP-2; mostrando una clara separación entre ambos conjuntos de genotipos; a su vez la accesión de *P. notatum* se ubica alejada de los genotipos de *A. macrum*, en la posición -10,7 del CP-1 y 18,5 del CP-2. En la Figura 1. 8, los genotipos que mayor distancia genética presentaron en el UPGMA (10 y 22), se encuentran entre los los que mayor separación dentro del citotipo tetraploide presentan en la Figura 1. 8; lo mismo puede decirse de los genotipos 4 y 5 que presentaron el menor valor de distancia genética en el UPGMA y se ubican conservando una distancia de las más estrechas en la Figura 1. 8. En el citotipo hexaploide, los genotipos más cercanos en la Figura 1. 8 son el #26 y el #27, los cuales son también los más cercanos de todo el conjunto de genotipos; lo que a su vez es coincidente con

el resultado obtenido a partir del análisis de los valores de las distancias genéticas. Los genotipos #23 y 27, presentaron el mayor valor de distancia genética dentro del citotipo 6x y similarmente mostraron una de las mayores separaciones dentro del grupo de genotipos 6x de la Figura 1. 8. La mayor distancia genética en el conjunto de genotipos se presenta entre el genotipo #3 (4x) y el #25 (6x), mientras que la menor distancia genética entre genotipos de diferente ploidía se presenta entre el genotipo #22 (4x) y el #24 (6x).



**Figura 1. 8. Gráfico de componentes principales correspondiente al análisis de la diversidad genética en regiones ISSR de 27 genotipos de *Acroceras macrum*. Los círculos de color verde indican los genotipos tetraploides (4x) y los rosados los hexaploides (6x). El círculo azul corresponde a *Paspalum notatum*, especie usada como control.**

Las contribuciones más importantes a la distribución de genotipos observada en la Figura 1. 8 se pueden deducir de los coeficientes de correlación que figuran en la Tabla 1. 7. En dicha tabla, las tres primeras columnas corresponden a los marcadores que presentaron correlaciones importantes (coeficientes  $\geq |0,5|$ ) con el CP-1, las tres siguientes corresponden a los que lo hicieron respecto al CP-2, y las tres últimas a los que tuvieron una correlación media a alta (coeficientes  $> |0,3|$ ) tanto para CP-1 como para CP-2. Los marcadores que presentaron una fuerte correlación negativa con el CP-1 contribuyeron a agrupar los genotipos (principalmente hexaploides y la accesión de *P. notatum*) hacia valores negativos sobre el eje de las abscisas, y los que presentaron una fuerte correlación positiva con el CP-1 contribuyeron a agrupar los genotipos (principalmente tetraploides) hacia valores positivos sobre el eje de las abscisas. Es decir que los marcadores de la primera columna



contribuyeron a separar los citotipos tetraploide y hexaploide, pero también a la distribución intracitotipo de los genotipos. Los marcadores que presentaron una fuerte correlación negativa con el CP-2 contribuyeron a agrupar los genotipos hacia valores negativos sobre el eje de las ordenadas, y los que presentaron una fuerte correlación positiva con el CP-2 contribuyeron a agrupar los genotipos (principalmente tetraploides y la accesión de *P. notatum*) hacia valores positivos sobre el eje de las ordenadas. Es decir que los marcadores de la cuarta columna contribuyeron a la distribución intracitotipo de los genotipos y a agrupar en la región de valores bajos o negativos los genotipos de *A. macrum*, separándolos claramente de la accesión de la especie *P. notatum*. Los marcadores de la séptima columna contribuyen a la distribución sobre ambos ejes, de la magnitud y el signo de sus coeficientes depende su grado de contribución a la separación intercitotipo y a la distribución intracitotipo.

**Tabla 1. 7. Correlaciones entre marcadores de ISSR y los dos primeros componentes principales (CP-1 y CP-2) derivados del análisis de la diversidad molecular de una colección de *Acroceras macrum*.**

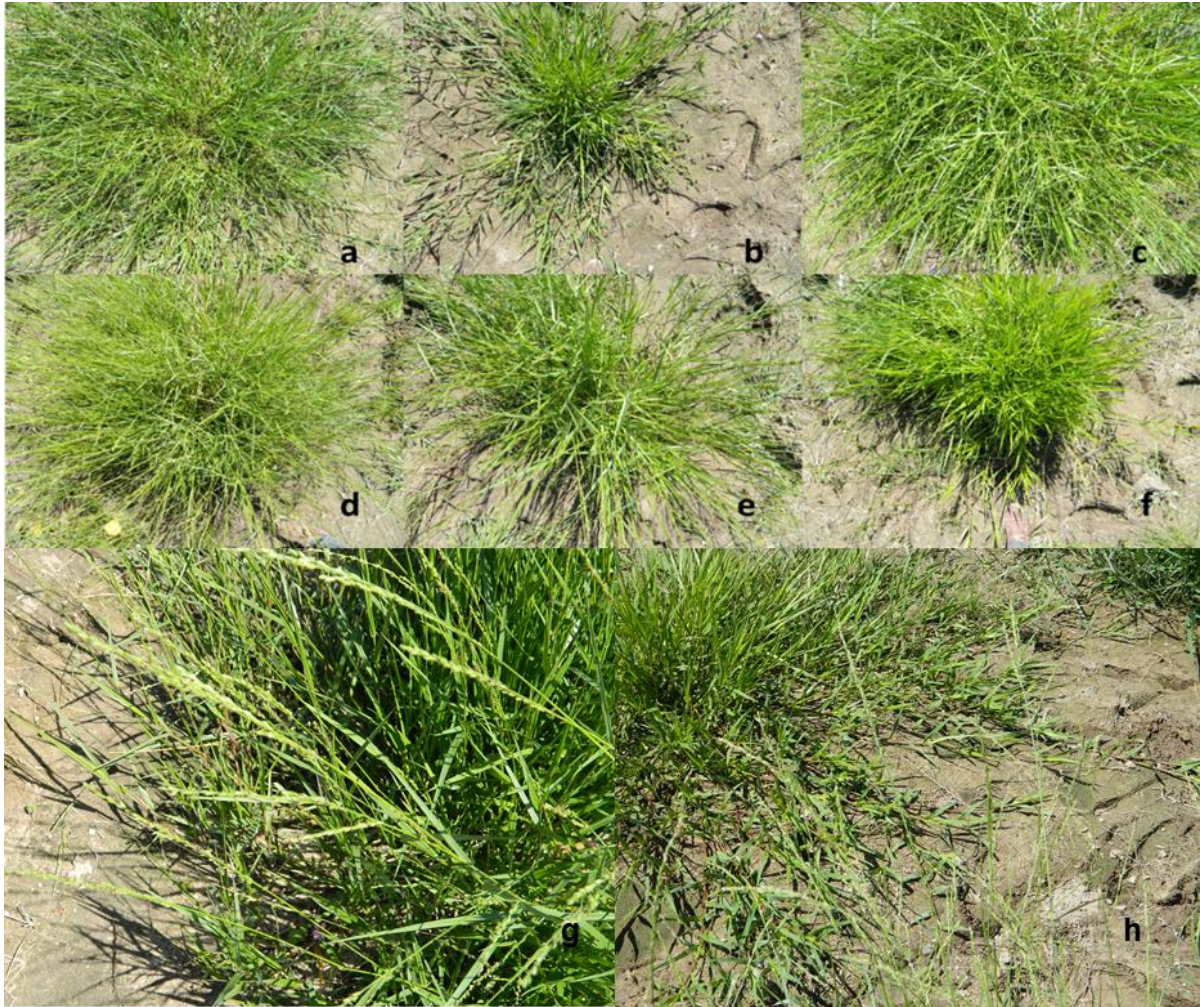
ALTA CORRELACIÓN/ CP-1			ALTA CORRELACIÓN/ CP-2			CORRELACIÓN/ CP-1 Y CP-2		
MARCADOR	CP-1	CP-2	MARCADOR	CP-1	CP-2	MARCADOR	CP-1	CP-2
GT <sub>8</sub> C#793	0,59	0,25	GA <sub>8</sub> C#950	0,26	0,58	GT <sub>8</sub> C#953	-0,41	-0,64
AG <sub>8</sub> GC#623	0,72	-0,07	AGAC <sub>4</sub> GC#412	-0,21	0,68	GT <sub>8</sub> C#1558	-0,57	-0,35
AG <sub>8</sub> T#504	0,58	-0,22	AGAC <sub>4</sub> GC#727	-0,10	0,56	GT <sub>8</sub> C#1772	-0,61	-0,40
CA <sub>8</sub> G#950	-0,50	0,18	AG <sub>8</sub> GC#317	-0,02	-0,58	GT <sub>8</sub> C#1948	-0,56	-0,41
CA <sub>8</sub> G#2236	0,50	0,15	AG <sub>8</sub> GC#1100	-0,24	-0,65	GA <sub>8</sub> TC#600	-0,42	0,79
GA <sub>8</sub> TC#2750	0,74	0,12	CA <sub>8</sub> G#501	-0,05	0,57	GA <sub>8</sub> TC#940	-0,42	0,79
GA <sub>8</sub> C#1370	0,64	0,14	CA <sub>8</sub> G#854	-0,01	-0,50	GA <sub>8</sub> TC#1200	-0,42	0,79
GA <sub>8</sub> T#608	-0,62	-0,28	ATG <sub>5</sub> GA#1050	-0,01	-0,54	GA <sub>8</sub> TC#1600	0,74	-0,37
GA <sub>8</sub> T#1427	-0,58	-0,12	AG <sub>8</sub> T#600	-0,04	-0,55	CA <sub>8</sub> G#1810	-0,61	-0,40
CTC <sub>6</sub> AC#3037	-0,58	-0,12	AG <sub>8</sub> T#2042	-0,15	0,53	GA <sub>8</sub> T#527	-0,42	0,79
ATG <sub>5</sub> GA#966	0,65	-0,01				GA <sub>8</sub> T#940	0,42	-0,79
ATG <sub>5</sub> GA#1373	-0,57	-0,27				GA <sub>8</sub> T#1215	-0,50	-0,34
ATG <sub>5</sub> GA#1810	0,54	-3,6E-03				GA <sub>8</sub> T#1902	-0,74	0,37
ATG <sub>5</sub> GA#2347	0,60	0,09				ATG <sub>5</sub> GA#845	0,42	-0,79
ATG <sub>5</sub> GA#2895	0,56	0,02				ATG <sub>5</sub> GA#1214	0,52	-0,36
ATG <sub>5</sub> GA#3362	0,59	-0,02				ATG <sub>5</sub> GA#1574	0,42	-0,79
AGAC <sub>4</sub> GC#2330	-0,57	0,11				ATG <sub>5</sub> GA#1750	-0,55	-0,41
						GA <sub>8</sub> C#1546	0,64	-0,37
						GA <sub>8</sub> C#1649	-0,42	0,79
						GA <sub>8</sub> C#1750	-0,74	0,37
						AG <sub>8</sub> GC#975	-0,42	0,79
						AG <sub>8</sub> GC#480	-0,59	-0,52
						AG <sub>8</sub> GC#1726	-0,60	0,36
						AGAC <sub>4</sub> GC#2180	-0,42	0,79
						AGAC <sub>4</sub> GC#598	0,44	0,54
						AGAC <sub>4</sub> GC#2836	-0,62	-0,43

Los iniciadores que presentaron mayor número de marcadores con una importante influencia sobre la distribución observada en la Figura 1. 8 fueron (ATG)<sub>5</sub> GA y (AG)<sub>8</sub> GC

(once y nueve marcadores, respectivamente) (Tabla 1. 7). (GA)<sub>8</sub> T, (AGAC)<sub>4</sub> GC, (GA)<sub>8</sub> C, (GA)<sub>8</sub> TC, (GT)<sub>8</sub> C y (CA)<sub>8</sub> G presentaron un número medio de marcadores de gran influencia para la distribución de la Figura 1. 8 (cinco o seis marcadores), mientras que (AG)<sub>8</sub> T y (CTC)<sub>6</sub> AC sólo presentaron dos y uno respectivamente (Tabla 1. 7).

### ***Análisis de la diversidad morfológica, agronómica y fenológica***

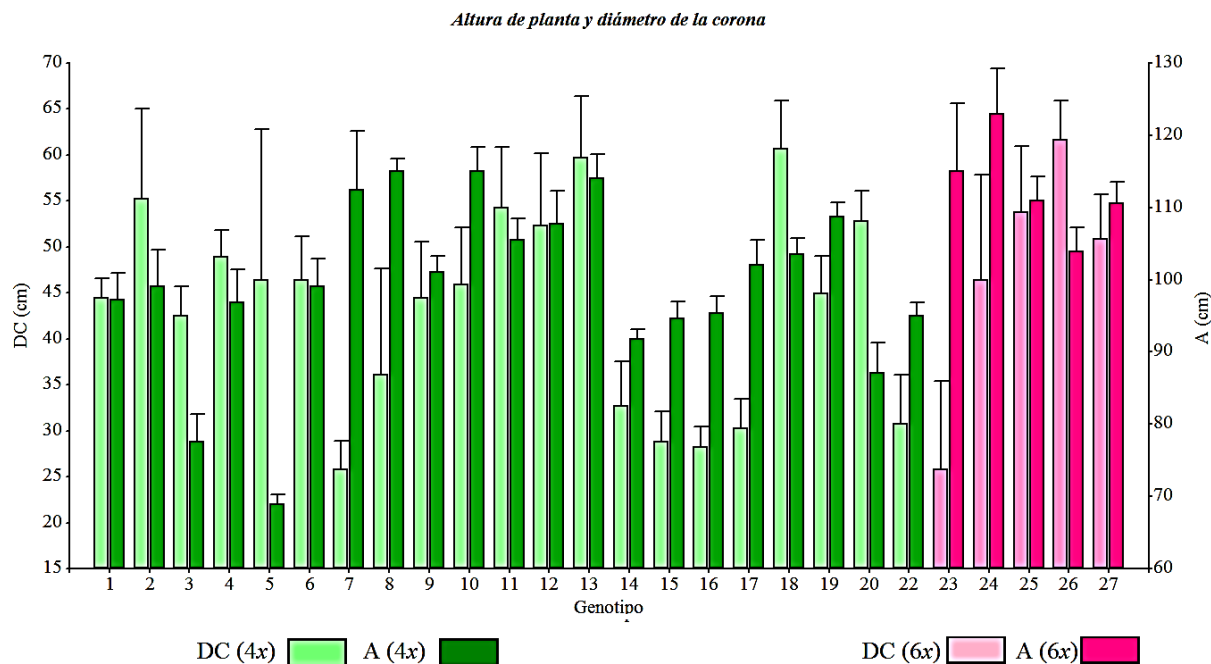
El análisis de la varianza indicó diferencias significativas para todas las variables morfológicas, fenológicas y agronómicas evaluadas entre los 26 genotipos (Tabla 1. 8). Los valores de los coeficientes de variación (CV) obtenidos indican que los rasgos más variables, (mayores a 25 %) fueron B (41 %), LEn (35,6 %), CI (34,7 %) y NEs (26 %); mientras que LEs, AEs, y CS, presentaron los valores más bajos de CV con valores de 8,2 %, 8,2 y 10 % respectivamente. Una variación intermedia se observó en los restantes caracteres estudiados, los cuales presentaron valores de CV ente 18,2 % y 23 % (Tabla 1. 8). La mayor parte de las variables analizadas mostraron valores medios con diferencias significativas entre los genotipos tetraploides y hexaploides, siendo en seis de ellas (A, LEn, LL, AL, LEs, AEs, y PF) superiores los valores mostrados por los hexaploides; mientras que en otras cinco variables (CS, LP, LRB, NEs y EsA) el valor medio de los tetraploides fue superior al de los hexaploides. Los caracteres DC, B, CI y PV no mostraron diferencias significativas en sus medias para los citotipos tetraploides respecto de los hexaploides (Tabla 1. 8). En la Figura 1. 9 se puede apreciar ejemplos de la diversidad observada en algunos de estos rasgos.



**Figura 1. 9. Diferentes portes, capacidad de cobertura de suelo y estado fenológico de ejemplares de *Acroceras macrum*, a seis semanas de plantado el ensayo experimental. a. genotipo 9 tetraploide en pico de floración, porte rastrero, cobertura del suelo mayor al 80 %. B. genotipo 5 (4x), porte rastrero, estado vegetativo, baja cobertura de suelo (50 %). c. genotipo 27 (6x) en pico de floración, porte rastrero-semi erecto (decumbente), cobertura del suelo mayor al 80 %. d. genotipo 22 (4x) en pico de floración, porte semi erecto, cobertura del suelo media-alta (70 %), panículas largas con pequeñas espiguillas (poco distinguibles en la figura). e. genotipo 25 (6x) porte erecto-semi erecto en inicio de floración, cobertura del suelo media-baja. f. genotipo 14 (4x) en inicio de la floración, mata pequeña y densa, erecta-semi erecta, cobertura del suelo media (65 %), se puede apreciar también las hojas de menor longitud respecto a los ejemplares a, c, d, y e. Las plantas a, b y c presentaron un diámetro amplio, d y e diámetros medios y f un diámetro estrecho. g. detalle de inflorescencias de planta en floración. h. detalle de planta rastrera en estado vegetativo, con estolones prolongados, por delante de la cual se observan inflorescencias de una planta en floración.**

**Altura de planta (A).** En la Figura 1. 10 se puede observar la variación en altura de los diferentes genotipos tetraploides y hexaploides de *A. macrum*. El rango de variación general fue de 22 a 64,5 cm, correspondiendo el valor más bajo a un genotipo 4x (#5) y el más alto a uno 6x (#24). Los genotipos 6x mostraron una altura media superior a los 4x y éstos últimos a su vez mostraron mayor coeficiente de variación que los hexaploides (Tabla 1. 8). Hay que considerar que el número de genotipos 6x evaluados fue mucho menor al de los 4x.

**Diámetro de la corona (DC).** Los valores de DC estuvieron en un rango de 70 a 110 cm, con una media de 100. El valor inferior fue observado tanto en genotipos 4x (#7, 15, 16 y 17) como en un 6x (#23); mientras que el superior también fue encontrado en genotipos 4x (#2, 11, 12, 13, 18 y 20) y 6x (#25 y 26) (Figura 1.10, Tabla 1. 8). Si bien la variable presentó una importante diversidad, tanto general como intracitotipo, no hubo diferencias significativas en los valores medios generales al comparar tetraploides y hexaploides (Tabla 1. 8).

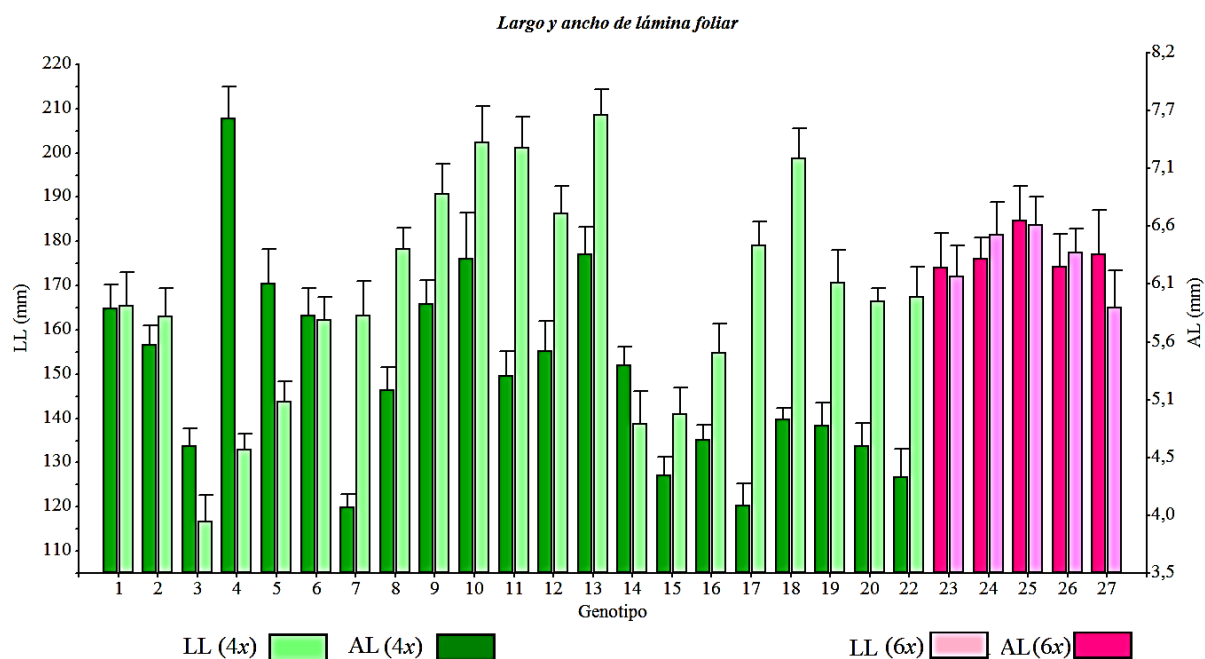


**Figura 1. 10. Variación en altura (A) y diámetro de la corona (DC) de la planta en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x; mientras que los tonos más oscuros representan la altura y los más claros el diámetro de la corona. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

**Ancho de Lámina foliar (AL).** El rango de variación general observado fue de 4,1 a 7,7 mm, correspondiendo el valor más bajo a los genotipos 7 y 17 y el valor más alto al genotipo 4 (todos 4x) (Figura 1. 11, Tabla 1. 8). La media general fue de 5,6 mm, con un CV

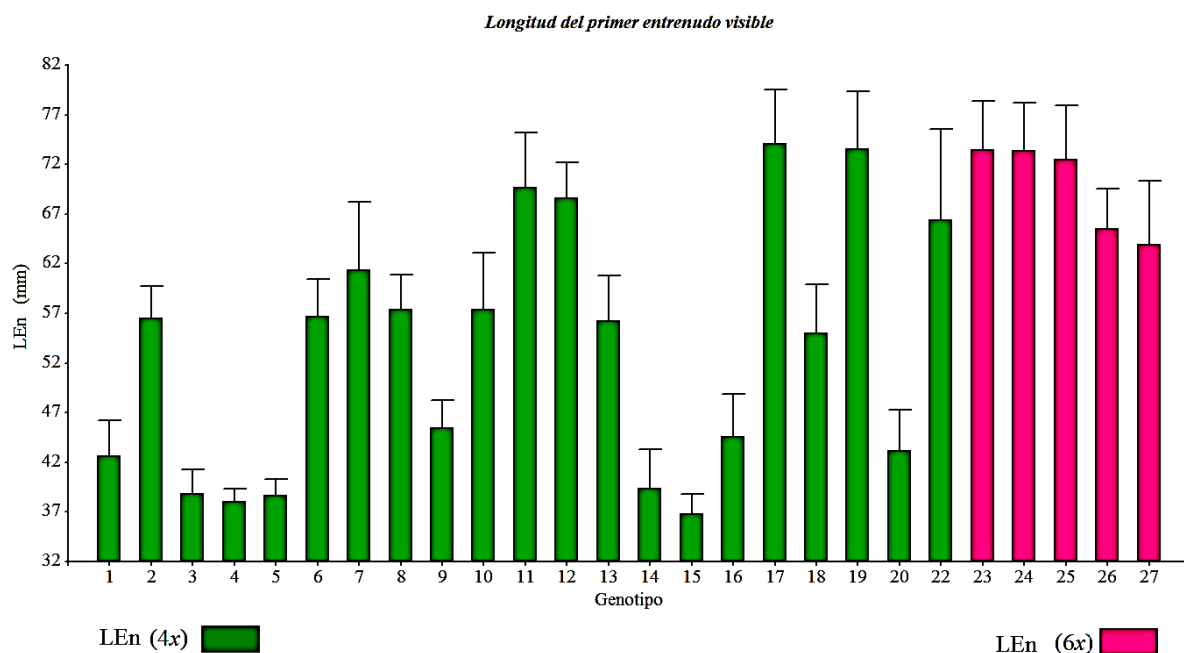
del 22 %, existiendo diferencias significativas entre la media de los hexaploides (6,4 mm) y la de los tetraploides (5,4 mm). A su vez, los tetraploides mostraron un CV de 21,8 % y los hexaploides de 16,2 % (Tabla 1. 8).

**Largo de lámina foliar (LL).** Se observó un rango de variación entre 117 y 209 mm, correspondiendo el valor más bajo al genotipo 3 (4x) y el más alto al genotipo 13 (4x) (Figura 1. 11, **Tabla 1. 8**). La media general fue de 170 mm, con un CV 18,2 %, y se encontraron diferencias significativas entre los 6x (176 mm) y los 4x (168 mm). Por su parte, el CV de los tetraploides (19,1 %) fue mayor al de los hexaploides (13,7 %) (**Tabla 1. 8**).



**Figura 1. 11.** Variación en el largo (LL) y ancho (AL) de la lámina foliar en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x; mientras que los tonos más oscuros representan el LL y los más claros la AL. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.

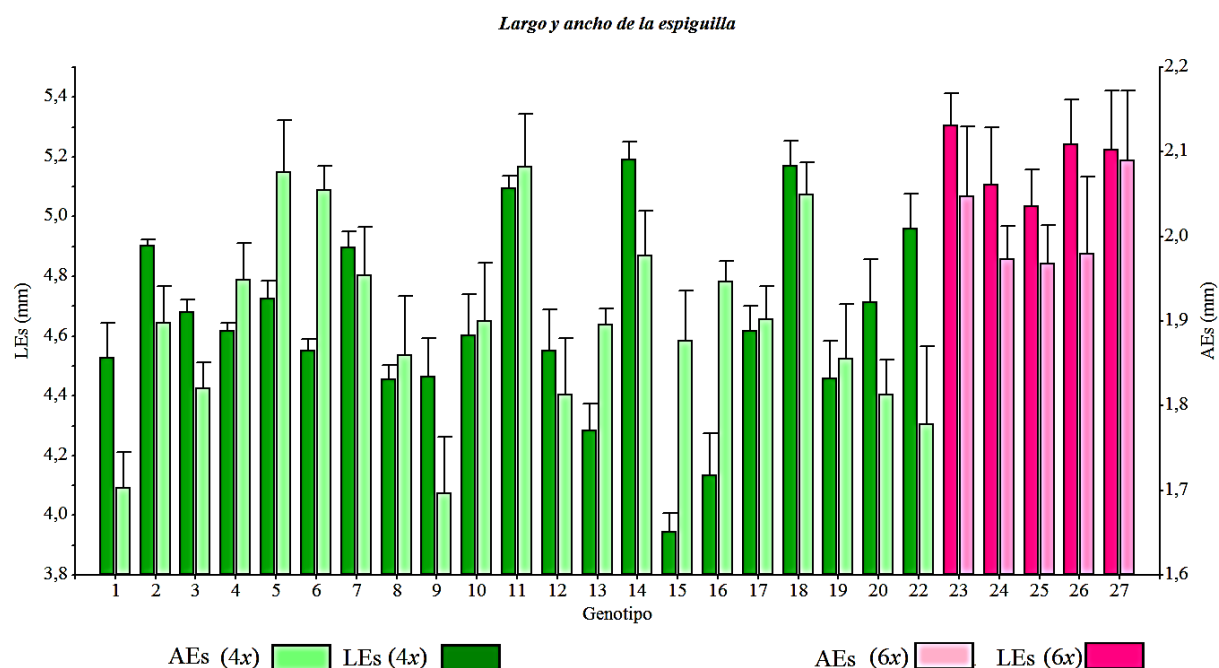
**Largo del entrenudo (LEn).** Se observó un rango de variación general entre 37 y 74 mm, correspondiendo el valor más bajo al genotipo 15 (4x) y el más alto a los genotipos 17 y 19 (4x) (Figura 1. 12, Tabla 1. 8). La media general fue de 57 mm, con un CV de 35,6 %, observándose diferencias significativas entre los hexaploides (69,9 mm) y los tetraploides (53,3 mm). Por su parte, los genotipos 4x mostraron un mayor CV (36,3 %) con respecto a los 6x (24,7 %) (Tabla 1. 8).



**Figura 1. 12. Largo del primer entrenudo visible (LEn) medido a las nueve semanas de plantado el ensayo para 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

**Largo de la espiguilla (LEs).** El rango de variación general observado estuvo entre 4,0 y 5,3 mm, donde el valor más bajo correspondió al genotipo 15 (4x) y el más alto al genotipo 23 (6x) (Figura 1. 13, Tabla 1. 8). La media general fue de 4,7, con un CV de 8,2 y no se observaron diferencias significativas entre los valores medios de ambos niveles de ploidía. El CV de los tetraploides fue de 7,3 % y el de los hexaploides de 5,6 % (Tabla 1. 8).

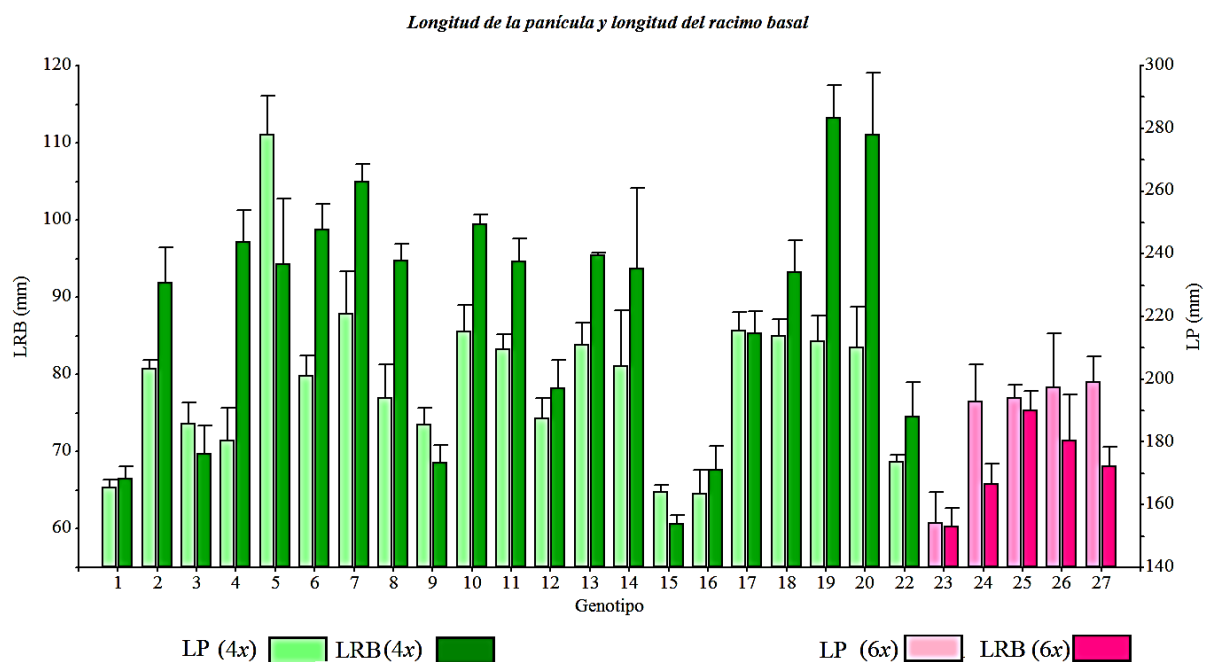
**Ancho de la espiguilla (AEs).** La variación general observada mostró un rango entre 1,7 y 2,1 mm, correspondiendo el valor más bajo a los genotipos 1 y 9 (ambos 4x) y el más alto a los genotipos 5, 6 (ambos 4x) y 27 (6x) (Figura 1. 13, Tabla 1. 8). La media general fue de 4,7 mm, con un CV de 8,2, observándose diferencias significativas entre los hexaploides (5,2 mm) y los tetraploides (4,6 mm). El CV de los tetraploides fue de 8,1 %, mientras que el de los hexaploides fue de 7,2 % (Tabla 1. 8).



**Figura 1. 13. Variación en el largo (LEs) y ancho (AEs) de la espiguilla en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x; mientras que los tonos más oscuros representan a LEs y los más claros a AEs. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

**Longitud de la panícula (LP)** La variación general observada mostró un rango entre 154 y 278 mm, correspondiendo el valor más bajo al genotipo 23 (6x) y el más alto al genotipo 5 (4x) (Figura 1. 14, Tabla 1. 8). La media general fue de 197 mm, con un CV de 14,7 %, y se observaron diferencias significativas entre los valores medios de los tetraploides (200 mm) y los hexaploides (188 mm). El CV de los tetraploides fue idéntico al valor general y muy similar al de los hexaploides (Tabla 1. 8).

**Longitud del racimo basal (LRB).** Se observó un rango de variación general entre 61 y 113 mm, representado el valor más bajo por el genotipo 15 (4x) y el más alto por el genotipo 20 (4x) (Figura 1. 14, Tabla 1. 8). La media general fue de 84 mm, con un CV de 20,7, observándose diferencias significativas entre tetraploides (88,3 mm) y hexaploides (68,2 mm). El CV de los tetraploides fue de 19,2 % y el de los hexaploides de 11,9 % (Tabla 1. 8).



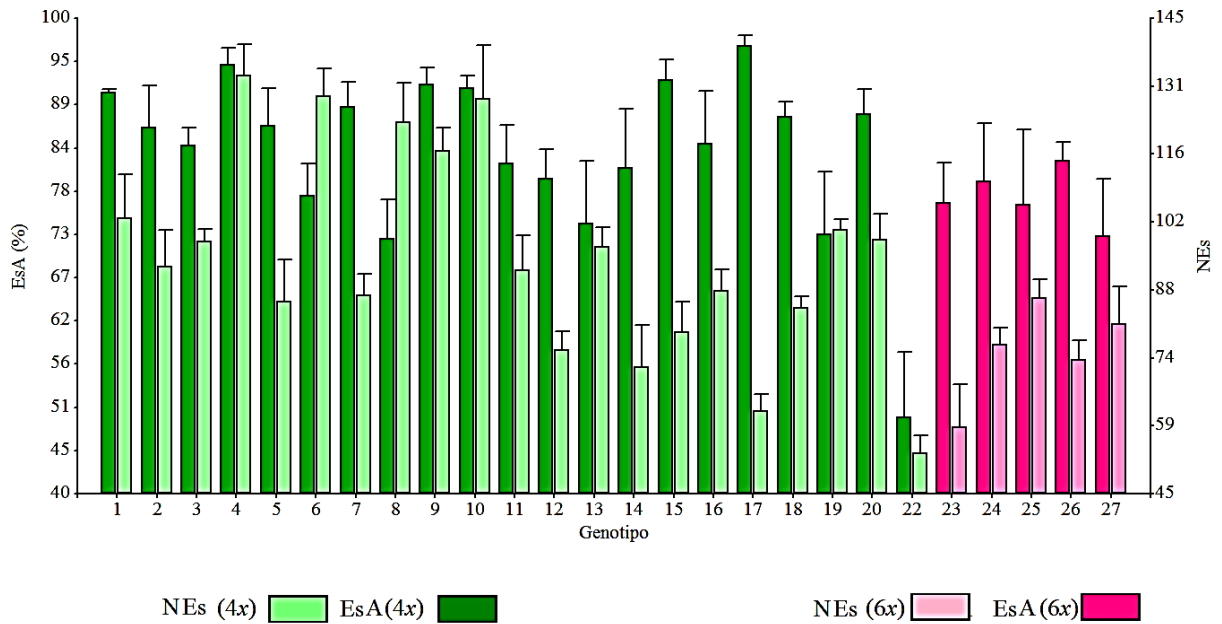
**Figura 1. 14. Variación en la longitud de la panícula (LP) y del racimo basal (LRB) en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x; mientras que los tonos más oscuros representan a LP y los más claros a LRB. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

**Número de espiguillas por panícula (NEs).** El rango de variación general observado fue entre 54 y 133 espiguillas por panícula, correspondiendo el menor valor al genotipo 22 (4x) y el mayor al genotipo 4 (4x) (Figura 1. 15, Tabla 1. 8). La media general fue de 91,2 espiguillas por panícula, con un CV de 26 %, observándose diferencias significativas entre la media de los tetraploides (95,1) y los hexaploides (75,0). Los tetraploides mostraron un CV de 25,2 % y los hexaploides uno de 19,3 % (Tabla 1. 8).

**Porcentaje de espiguillas abiertas por panícula (EsA).** El rango de variación general observado fue de 49,6 a 96,5 %, correspondiendo el valor más bajo al genotipo 22 (4x) y el más alto al genotipo 17 (4x) (Figura 1. 15, Tabla 1. 8). La media general fue de 82,2 %, con un CV de 16 %, observándose diferencias significativas entre la media de los tetraploides (83,3 %) y los hexaploides (77,4 %). El CV de los tetraploides fue de 15,7 % y el de los hexaploides fue de 16,1 % (Tabla 1. 8).



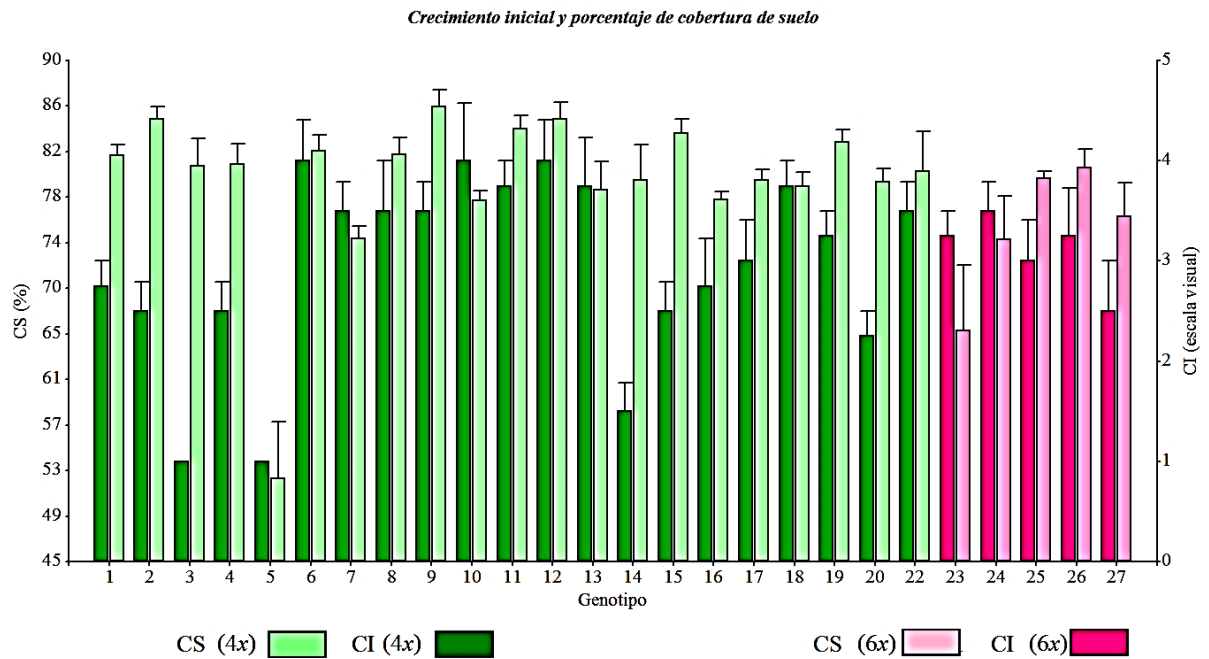
Número de espiguillas y porcentaje de apertura de espiguillas por panícula



**Figura 1. 15. Variación en el número de espiguillas (NEs) y el porcentaje de espiguillas abiertas por panícula (EsA) en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x; mientras que los tonos más oscuros representan a EsA y los más claros a NEs. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

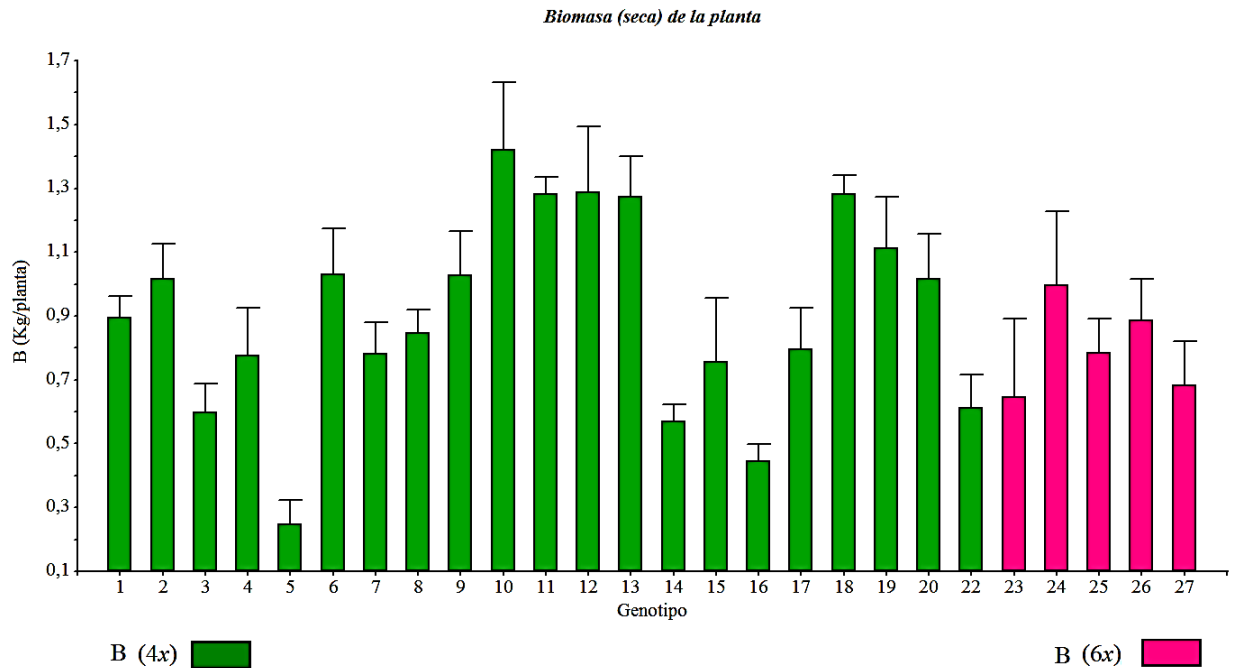
**Crecimiento inicial (CI).** El CI presentó un rango de variación entre 1 y 4, siendo el valor más bajo para un genotipo 4x (#5) y el más alto fue compartido por tres genotipos 4x (#6, 10 y 12) (Figura 1. 16, Tabla 1. 8). No hubo diferencias significativas en el valor medio observado en los genotipos 4x con respecto a los 6x; sin embargo, el CV de los 4x (34,7 %) fue superior al de los 6x (25,4 %) (Tabla 1. 8).

**Cobertura de suelo (CS).** El rango de variación general observado fue de 52,5 a 85,9 %, correspondiendo el valor más bajo al genotipo 5 (4x) y el más alto al genotipo 9 (4x) (Figura 1. 16, Tabla 1. 8). La media general fue del 78,6 %, con un CV de 10 %, y no se observó diferencias significativas entre los genotipos 4x y 6x. El CV de los tetraploides fue del 9,5 % y el de los hexaploides de 10,9 % (Tabla 1. 8).



**Figura 1. 16.** Variación en crecimiento inicial (CI) y cobertura del suelo (CS) en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x; mientras que los tonos más oscuros representan el CI y los más claros la CS. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.

**Biomasa (B).** La variación general observada mostró un rango entre 0,266 y 1,432 Kg pl<sup>-1</sup>, correspondiendo el valor más bajo al genotipo 5 (4x) y el más alto al genotipo 10 (4x) (Figura 1. 17, Tabla 1. 8). La media general fue de 0,902, con un CV de 41 %, no observándose diferencias significativas entre los genotipos tetraploides y los hexaploides. El CV de los tetraploides fue de 40,7 % mientras el de los hexaploides fue de 42,3 % (Tabla 1. 8).



**Figura 1. 17. Biomasa seca de la planta entera (B); medida a los 180 días de plantado el ensayo, para 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

**Periodo vegetativo (PV).** El rango de variación general observado para este carácter fue de entre 33 y 59 días, correspondiendo el menor valor al genotipo 7 (4x) y el mayor a los genotipos 3 y 14 (ambos 4x) (Figura 1. 18, Tabla 1. 8). La media general fue de 43 días, con un CV de 19 %, no observándose diferencias significativas en los valores medios de los genotipos 4x con respecto a los 6x. El CV de los tetraploides fue de 20,5 % mientras que el de los hexaploides fue de 9,8 % (Tabla 1. 8).

**Pico de floración (PF).** Este carácter mostró un rango de variación entre 40 y 93 días, correspondiendo el menor valor al genotipo 7 (4x) y el mayor valor fue observado en los genotipos 2, 3, 4, 5 (todos 4x), 23, 25 y 27 (los tres 6x) (Figura 1. 18, Tabla 1. 8). La media general fue de 77 días, con un CV de 23 5, y se observó diferencias significativas en las medias de los hexaploides (92 días) con respecto a los tetraploides (73 días). El CV de los tetraploides fue de 24,3 %, mientras que el de los hexaploides fue de 3,1 % (Tabla 1. 8).

Duración del periodo vegetativo y días hasta el pico de floración

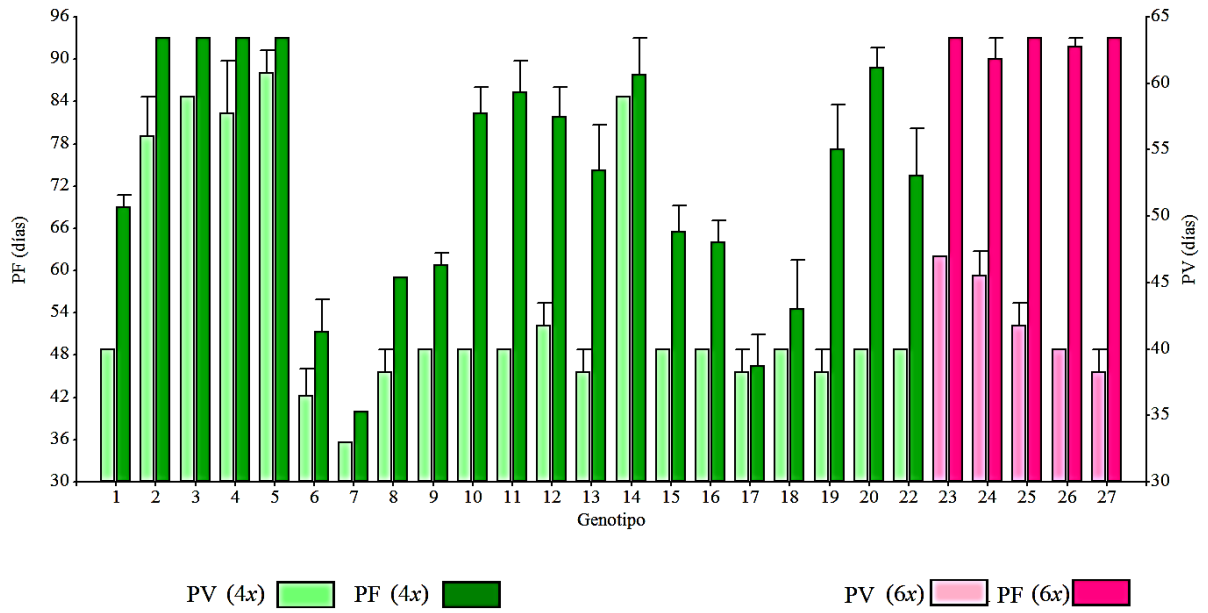


Figura 1. 18. Variación en la duración del periodo vegetativo (PV) y el pico de floración (PF) en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x; mientras que los tonos más oscuros representan a PV y los más claros a PF. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.

**Tabla 1. 8. Resumen del análisis de la diversidad morfológica, agronómica y fenológica de una colección de *Acroceras macrum*.**

	Ploidía	A (cm)	DC (cm)	LEn (mm)	LL (mm)	AL (mm)	LP (mm)	LRB (mm)	LEs (mm)	AEs (mm)	NEs	EsA (%)	CS (%)	CI*	B (Kg/pl)	PV (días)	PF (días)
1	4x	44,3 <sup>bcd</sup>	90 <sup>ab</sup>	43 <sup>cde</sup>	165 <sup>defgh</sup>	5,9 <sup>bcd</sup>	166 <sup>cde</sup>	67 <sup>ij</sup>	4,5 <sup>fghi</sup>	1,7 <sup>c</sup>	103 <sup>abcde</sup>	90,6 <sup>a</sup>	81,5 <sup>a</sup>	2,8 <sup>abc</sup>	0,909 <sup>abcd</sup>	40 <sup>bcd</sup>	69 <sup>bcd</sup>
2	4x	45,8 <sup>bcd</sup>	110 <sup>ab</sup>	57 <sup>abcde</sup>	163 <sup>efgh</sup>	5,6 <sup>bcd</sup>	203 <sup>bcd</sup>	92 <sup>abcde</sup>	4,9 <sup>abcde</sup>	1,9 <sup>abc</sup>	93 <sup>cdef</sup>	86,1 <sup>a</sup>	84,8 <sup>a</sup>	2,5 <sup>abcd</sup>	1,031 <sup>abc</sup>	56 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>
3	4x	28,8 <sup>ef</sup>	90 <sup>ab</sup>	39 <sup>de</sup>	117 <sup>i</sup>	4,7 <sup>hijk</sup>	186 <sup>bcd</sup>	70 <sup>ghij</sup>	4,7 <sup>cdefghi</sup>	1,85 <sup>abc</sup>	98 <sup>bcde</sup>	84,0 <sup>a</sup>	80,6 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,614 <sup>bcd</sup>	59 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>
4	4x	44,0 <sup>bcd</sup>	100 <sup>ab</sup>	38 <sup>de</sup>	133 <sup>hi</sup>	7,7 <sup>a</sup>	181 <sup>bcd</sup>	97 <sup>abcde</sup>	4,6 <sup>defghi</sup>	1,95 <sup>abc</sup>	133 <sup>a</sup>	94,1 <sup>a</sup>	80,7 <sup>a</sup>	2,5 <sup>abcd</sup>	0,792 <sup>abcde</sup>	58 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>
5	4x	22,0 <sup>f</sup>	100 <sup>ab</sup>	39 <sup>de</sup>	144 <sup>ghi</sup>	6,2 <sup>bcd</sup>	278 <sup>a</sup>	94 <sup>abcde</sup>	4,7 <sup>bcd</sup>	2,1 <sup>a</sup>	85 <sup>defg</sup>	86,4 <sup>a</sup>	52,5 <sup>c</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,266 <sup>d</sup>	61 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>
6	4x	45,8 <sup>bcd</sup>	100 <sup>ab</sup>	57 <sup>abcde</sup>	162 <sup>efgh</sup>	5,9 <sup>bdefg</sup>	201 <sup>bcd</sup>	99 <sup>abcde</sup>	4,5 <sup>efghi</sup>	2,1 <sup>ab</sup>	129 <sup>ab</sup>	77,6 <sup>a</sup>	81,9 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>	1,044 <sup>abcd</sup>	37 <sup>de</sup>	51 <sup>fgh</sup>
7	4x	56,3 <sup>abc</sup>	70 <sup>b</sup>	61 <sup>abcde</sup>	163 <sup>efgh</sup>	4,1 <sup>k</sup>	221 <sup>b</sup>	100 <sup>ab</sup>	4,9 <sup>abcde</sup>	1,95 <sup>abc</sup>	87 <sup>defg</sup>	88,8 <sup>a</sup>	74,1 <sup>ab</sup>	3,5 <sup>ab</sup>	0,797 <sup>abc</sup>	33 <sup>e</sup>	40 <sup>h</sup>
8	4x	58,3 <sup>ab</sup>	80 <sup>ab</sup>	57 <sup>abcde</sup>	178 <sup>abcde</sup>	5,2 <sup>efghijk</sup>	194 <sup>bcd</sup>	95 <sup>abcde</sup>	4,4 <sup>ghij</sup>	1,85 <sup>abc</sup>	123 <sup>abc</sup>	72,1 <sup>ab</sup>	81,6 <sup>a</sup>	3,5 <sup>ab</sup>	0,861 <sup>abcd</sup>	38 <sup>cde</sup>	59 <sup>bcd</sup>
9	4x	47,3 <sup>bcd</sup>	90 <sup>ab</sup>	45 <sup>bcd</sup>	191 <sup>abcde</sup>	6,0 <sup>bcd</sup>	186 <sup>bcd</sup>	69 <sup>hij</sup>	4,5 <sup>ghij</sup>	1,7 <sup>c</sup>	117 <sup>abcde</sup>	91,7 <sup>a</sup>	85,9 <sup>a</sup>	3,5 <sup>de</sup>	1,042 <sup>abcd</sup>	40 <sup>bcd</sup>	61 <sup>defg</sup>
10	4x	58,3 <sup>ab</sup>	90 <sup>ab</sup>	57 <sup>abcde</sup>	202 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>bcd</sup>	215 <sup>b</sup>	100 <sup>abc</sup>	4,6 <sup>defghi</sup>	1,9 <sup>abc</sup>	128 <sup>ab</sup>	91,2 <sup>a</sup>	77,4 <sup>ab</sup>	4,0 <sup>a</sup>	1,432 <sup>abc</sup>	40 <sup>bcd</sup>	82 <sup>abc</sup>
11	4x	50,8 <sup>abcd</sup>	110 <sup>ab</sup>	70 <sup>a</sup>	201 <sup>abc</sup>	5,3 <sup>defghij</sup>	210 <sup>bcd</sup>	95 <sup>abcde</sup>	5,1 <sup>abcde</sup>	2,05 <sup>a</sup>	92 <sup>cdef</sup>	81,6 <sup>a</sup>	83,9 <sup>a</sup>	3,8 <sup>ab</sup>	1,293 <sup>ab</sup>	40 <sup>bcd</sup>	85 <sup>ab</sup>
12	4x	52,5 <sup>abcd</sup>	110 <sup>ab</sup>	69 <sup>ab</sup>	186 <sup>abcde</sup>	5,5 <sup>cdefghi</sup>	187 <sup>bcd</sup>	78 <sup>cdefghij</sup>	4,5 <sup>efghi</sup>	1,85 <sup>abc</sup>	75 <sup>efg</sup>	79,7 <sup>a</sup>	84,8 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>	1,298 <sup>ab</sup>	42 <sup>bcd</sup>	82 <sup>abc</sup>
13	4x	57,5 <sup>ab</sup>	110 <sup>ab</sup>	56 <sup>abcde</sup>	209 <sup>a</sup>	6,4 <sup>bcd</sup>	211 <sup>bcd</sup>	95 <sup>abcde</sup>	4,3 <sup>hij</sup>	1,9 <sup>abc</sup>	97 <sup>bcd</sup>	74,1 <sup>ab</sup>	78,4 <sup>ab</sup>	3,8 <sup>ab</sup>	1,287 <sup>ab</sup>	38 <sup>cde</sup>	74 <sup>abcd</sup>
14	4x	40,0 <sup>cde</sup>	80 <sup>ab</sup>	39 <sup>de</sup>	139 <sup>ghi</sup>	5,4 <sup>cdefghi</sup>	204 <sup>bcd</sup>	94 <sup>abcde</sup>	5,2 <sup>ac</sup>	2,0 <sup>abc</sup>	72 <sup>efg</sup>	81,1 <sup>a</sup>	79,3 <sup>a</sup>	1,5 <sup>cb</sup>	0,586 <sup>bcd</sup>	59 <sup>a</sup>	88 <sup>ab</sup>
15	4x	42,3 <sup>bcd</sup>	70 <sup>ab</sup>	37 <sup>e</sup>	141 <sup>ghi</sup>	4,4 <sup>ijk</sup>	164 <sup>de</sup>	61 <sup>j</sup>	4,0 <sup>j</sup>	1,9 <sup>abc</sup>	79 <sup>efg</sup>	92,1 <sup>a</sup>	83,5 <sup>a</sup>	2,5 <sup>abcd</sup>	0,762 <sup>abcd</sup>	40 <sup>bcd</sup>	66 <sup>cdefg</sup>
16	4x	42,8 <sup>bcd</sup>	70 <sup>ab</sup>	45 <sup>bcd</sup>	155 <sup>fgh</sup>	4,7 <sup>ghijk</sup>	164 <sup>de</sup>	68 <sup>ij</sup>	4,1 <sup>ij</sup>	2,0 <sup>abc</sup>	88 <sup>bef</sup>	84,2 <sup>a</sup>	77,5 <sup>ab</sup>	2,8 <sup>abc</sup>	0,464 <sup>cd</sup>	40 <sup>bcd</sup>	64 <sup>cdefg</sup>
17	4x	48,0 <sup>abcd</sup>	70 <sup>ab</sup>	74 <sup>a</sup>	179 <sup>abcde</sup>	4,1 <sup>jk</sup>	216 <sup>b</sup>	85 <sup>bcd</sup>	4,6 <sup>defghi</sup>	1,9 <sup>abc</sup>	62 <sup>fg</sup>	96,5 <sup>a</sup>	79,2 <sup>a</sup>	3,0 <sup>abc</sup>	0,812 <sup>abcd</sup>	38 <sup>cde</sup>	47 <sup>gh</sup>
18	4x	49,3 <sup>abcd</sup>	110 <sup>ab</sup>	55 <sup>abcde</sup>	199 <sup>abcd</sup>	4,9 <sup>fghijk</sup>	214 <sup>bc</sup>	93 <sup>abcde</sup>	5,1 <sup>abc</sup>	2,05 <sup>ab</sup>	84 <sup>defg</sup>	87,6 <sup>a</sup>	78,7 <sup>a</sup>	3,8 <sup>ab</sup>	1,293 <sup>ab</sup>	40 <sup>bcd</sup>	55 <sup>efgh</sup>
19	4x	53,3 <sup>abcd</sup>	90 <sup>ab</sup>	74 <sup>a</sup>	171 <sup>bcd</sup>	4,9 <sup>fghijk</sup>	212 <sup>bcd</sup>	111 <sup>a</sup>	4,5 <sup>ghij</sup>	1,85 <sup>abc</sup>	100 <sup>abcde</sup>	72,7 <sup>ab</sup>	82,7 <sup>a</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	1,125 <sup>abc</sup>	38 <sup>cde</sup>	77 <sup>abcd</sup>
20	4x	36,3 <sup>def</sup>	110 <sup>ab</sup>	43 <sup>cde</sup>	166 <sup>defgh</sup>	4,7 <sup>hijk</sup>	210 <sup>bcd</sup>	113 <sup>a</sup>	4,7 <sup>bcd</sup>	1,85 <sup>abc</sup>	98 <sup>bcde</sup>	87,9 <sup>a</sup>	79,1 <sup>a</sup>	2,3 <sup>bcd</sup>	1,029 <sup>abc</sup>	40 <sup>bcd</sup>	89 <sup>a</sup>
22	4x	42,5 <sup>bcd</sup>	80 <sup>ab</sup>	65 <sup>abc</sup>	169 <sup>cdefg</sup>	4,5 <sup>hijk</sup>	174 <sup>bcd</sup>	75 <sup>efghij</sup>	4,9 <sup>abcde</sup>	1,8 <sup>bc</sup>	54 <sup>g</sup>	49,6 <sup>b</sup>	80,0 <sup>a</sup>	3,5 <sup>ab</sup>	0,628 <sup>bcd</sup>	40 <sup>bcd</sup>	74 <sup>abcd</sup>
23	6x	58,3 <sup>ab</sup>	70 <sup>b</sup>	73 <sup>a</sup>	172 <sup>bcd</sup>	6,3 <sup>bcd</sup>	154 <sup>e</sup>	60 <sup>j</sup>	5,3 <sup>a</sup>	2,05 <sup>ab</sup>	59 <sup>fg</sup>	76,7 <sup>ab</sup>	65,8 <sup>b</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	0,662 <sup>bcd</sup>	47 <sup>b</sup>	93 <sup>a</sup>
24	6x	64,5 <sup>a</sup>	100 <sup>ab</sup>	73 <sup>a</sup>	181 <sup>abcde</sup>	6,4 <sup>bcd</sup>	193 <sup>bcd</sup>	66 <sup>ij</sup>	5,1 <sup>abcd</sup>	2,0 <sup>abc</sup>	76 <sup>efg</sup>	79,4 <sup>a</sup>	73,9 <sup>ab</sup>	3,5 <sup>ab</sup>	1,011 <sup>abc</sup>	46 <sup>bc</sup>	90 <sup>a</sup>
25	6x	55,0 <sup>abc</sup>	110 <sup>ab</sup>	72 <sup>a</sup>	184 <sup>abcde</sup>	6,8 <sup>ab</sup>	194 <sup>bcd</sup>	75 <sup>defghij</sup>	5,0 <sup>abcde</sup>	2,0 <sup>abc</sup>	86 <sup>defg</sup>	76,5 <sup>ab</sup>	79,4 <sup>a</sup>	3,0 <sup>abc</sup>	0,801 <sup>abcd</sup>	42 <sup>bcd</sup>	93 <sup>a</sup>
26	6x	49,5 <sup>abcd</sup>	110 <sup>a</sup>	67 <sup>abc</sup>	179 <sup>abcde</sup>	6,4 <sup>bcd</sup>	197 <sup>bcd</sup>	72 <sup>fghij</sup>	5,2 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>abc</sup>	73 <sup>efg</sup>	82,0 <sup>a</sup>	80,4 <sup>a</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	0,900 <sup>abcd</sup>	40 <sup>bcd</sup>	92 <sup>a</sup>
27	6x	54,8 <sup>abc</sup>	100 <sup>ab</sup>	65 <sup>abc</sup>	168 <sup>cdefg</sup>	6,6 <sup>abc</sup>	199 <sup>bcd</sup>	68 <sup>ij</sup>	5,2 <sup>abc</sup>	2,1 <sup>a</sup>	81 <sup>defg</sup>	72,4 <sup>ab</sup>	76,0 <sup>ab</sup>	2,5 <sup>abcd</sup>	0,698 <sup>bcd</sup>	38 <sup>cde</sup>	93 <sup>a</sup>
<b>Media</b>		48,0	100	57	170	5,6	197	84	4,7	1,9	91,2	82,2	78,6	3,0	0,902	43	77
<b>CV (%)</b>		22,8	21,3	<b>35,6</b>	18,2	22	14,7	20,7	<u>8,2</u>	<u>8,2</u>	<b>26</b>	16	<u>10</u>	<b>34,7</b>	<b>41</b>	19	23
<b>Media 4x</b>		46,0 <sup>b</sup>	96,2 <sup>a</sup>	53,3 <sup>b</sup>	168 <sup>b</sup>	5,4 <sup>b</sup>	200 <sup>a</sup>	88,3 <sup>a</sup>	4,6 <sup>b</sup>	1,9 <sup>b</sup>	95,1 <sup>a</sup>	83,3 <sup>a</sup>	79,4 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	0,814 <sup>a</sup>	42,5 <sup>a</sup>	73 <sup>b</sup>
<b>CV 4x (%)</b>		24,2	21,9	36,3	19,1	21,8	14,7	19,2	7,3	8,1	25,2	15,7	9,5	37,6	40,7	20,5	24,3
<b>Media 6x</b>		56,4 <sup>a</sup>	101,6 <sup>a</sup>	69,9 <sup>a</sup>	176 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	188 <sup>b</sup>	68,2 <sup>b</sup>	5,2 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>	75,0 <sup>b</sup>	77,4 <sup>b</sup>	75,1 <sup>b</sup>	3,1 <sup>a</sup>	0,923 <sup>a</sup>	43,6 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>
<b>CV 6x (%)</b>		16,6	23,5	24,7	13,7	16,2	14,1	11,9	5,6	7,2	19,3	16,1	10,9	25,4	42,3	9,8	3,1

A: Altura de la planta; DC: diámetro de la corona; LEn: largo del entrenudo; LL: largo de la lámina foliar; AL: ancho de la lámina foliar; LP: largo de la panícula; LRB: longitud del racimo basal; LEs: largo de las espiguillas; AEs: ancho de las espiguillas; NEs: número de espiguillas; EsA: porcentaje de espiguillas abiertas en la panícula; CS: cobertura del suelo; CI: crecimiento inicial; B: biomasa seca de la planta; PV: periodo vegetativo; PF: pico de floración. \* medido con una escala visual de 1 a 5, de menor a mayor crecimiento inicial. Letras distintas indican medias significativamente diferentes según el análisis de la varianza. Niveles de ploidía: 4x: tetraploide; 6x: hexaploide. Coeficientes de variación (CV) expresados como porcentaje; subrayado: menores valores de CV; negrita: mayores valores de CV.

Se estudió la correlación según Pearson entre las variables morfológicas, agronómicas y fenológicas; encontrándose que algunos de los rasgos más informativos estaban fuertemente correlacionados, con un valor absoluto mayor o igual a 0,5 (entre 0,5 y 0,61). Esta correlación fue en algunos casos positiva (B y CI, LRB y LP, CI y LL, PV y PF, A y CI, AEs y LEs, LL y LI, A y LL) y en otros casos fue negativa (LL y PV, CI y PV), pero su significado estadístico fue elevado en las dos situaciones (*p*-valor inferior a 0,01) (Tabla 1. 9). Por debajo del valor absoluto de 0,5 se presentaron otras correlaciones que también fueron muy significativas estadísticamente, entre las cuales vale la pena mencionar la correlación positiva entre LRB y NEs, A y B, A y LI, CS y B (entre 0,36 y 0,44), y la correlaciones negativas de PV y A (-0,46) (Tabla 1. 9).

**Tabla 1. 9. Correlaciones según Pearson de 16 variables morfológicas y agronómicas de una colección de *Acroceras macrum*.**

	DC	A	CI	AL	LL	LEn	PV	PF	CS	EsA	LEs	AEs	LP	LRB	NEs	B
DC	1															
A	-0,01	1														
CI	0,23*	<b>0,53**</b>	1													
AL	0,43**	0,22*	0,20**	1												
LL	0,19*	<b>0,50**</b>	<b>0,58**</b>	0,18**	1											
LEn	0,08	0,44**	0,38**	0,09	<b>0,50**</b>	1										
PV	0,00	-0,46**	<b>-0,57**</b>	0,19	<b>-0,58**</b>	-0,30**	1									
PF	0,28**	-0,12	-0,31**	0,44**	-0,20	0,00	<b>0,55**</b>	1								
CS	0,27**	0,17	0,26*	0,02	0,15	0,04**	-0,27**	-0,16	1							
EsA	-0,05	-0,14	-0,16	0,01	-0,16	-0,14	0,15	-0,11	-0,03	1						
LEs	0,21*	0,14	0,05	0,21	-0,01*	0,27	0,16	0,32*	-0,18	-0,23*	1					
AEs	0,22*	0,10	0,08	0,25	-0,06*	0,19	0,11	0,14	-0,29**	-0,09	<b>0,53**</b>	1				
LP	0,22*	-0,17	-0,02	-0,03	0,02	0,12	0,11	-0,02	-0,33**	0,09	0,15	0,29**	1			
LRB	0,14	-0,05	0,10	-0,07	-0,02	0,01	-0,02	-0,14	-0,03	0,08	-0,04	0,13	<b>0,61**</b>	1		
NEs	0,19*	-0,05	0,18	0,32	0,07	-0,11	-0,02	-0,11	0,21*	0,19*	-0,29**	-0,04	0,19	0,44**	1	
B	<b>0,50**</b>	0,36**	<b>0,61**</b>	0,19	<b>0,50**</b>	0,21*	-0,32**	-0,08	0,37**	0,05	0,03**	-0,03	0,12	0,24*	0,30**	1

DC: diámetro de la corona; A: Altura de la planta; CI: crecimiento inicial; AL: ancho de la lámina foliar; LL: largo de la lámina foliar; PV: periodo vegetativo; PF: pico de floración; CS: cobertura del suelo; EsA: porcentaje de espiguillas abiertas en la panícula; LEs: largo de las espiguillas; AEs: ancho de las espiguillas; LP: largo de la panícula; LRB: longitud del racimo basal; NEs: número de espiguillas; LEn: largo del entrenudo; B: biomasa. Negrita: coeficiente de correlación  $\geq |0,5|$ . \*: *p*-valor  $\leq |0,05|$ . \*\*: *p*-valor  $\leq |0,01|$ .

Cuando se estimó la diversidad considerando todos los caracteres evaluados en conjunto, se observaron marcadas diferencias entre los genotipos.

**Tabla 1. 10. Distancias Euclídeas obtenidas mediante 16 variables morfológicas, agronómicas y fenológicas para una colección de *Acroceras macrum*.**

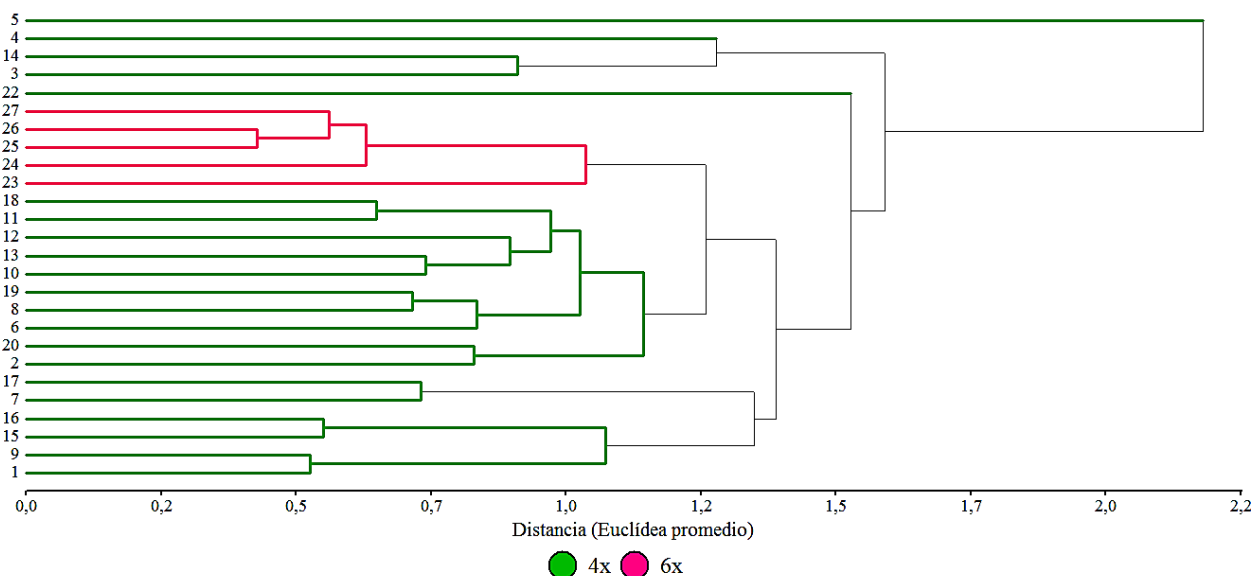
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	26	27	
1	0,00																										
2	1,36	0,00																									
3	1,55	1,56	0,00																								
4	1,43	1,49	1,25	0,00																							
5	2,13	2,17	1,68	1,86	0,00																						
6	1,35	1,12	1,73	1,55	2,30	0,00																					
7	1,32	1,33	1,74	1,89	2,19	1,25	0,00																				
8	1,12	1,08	1,71	1,54	2,29	0,82	1,09	0,00																			
9	0,51	1,16	1,60	1,40	2,42	1,13	1,44	0,93	0,00																		
10	1,21	1,12	1,79	1,59	2,32	1,00	1,32	0,94	1,03	0,00																	
11	1,38	1,10	1,75	1,68	2,25	1,06	1,22	1,09	1,36	0,95	0,00																
12	0,97	1,05	1,73	1,60	2,44	0,98	1,29	0,91	0,93	0,88	0,93	0,00															
13	1,17	1,16	2,00	1,59	2,32	0,99	1,45	0,90	1,08	0,72	0,94	0,77	0,00														
14	1,53	1,06	0,89	1,23	1,49	1,54	1,51	1,52	1,66	1,73	1,58	1,61	1,79	0,00													
15	1,05	1,36	1,29	1,54	2,15	1,51	1,27	1,33	1,17	1,61	1,67	1,38	1,63	1,35	0,00												
16	1,06	1,37	1,25	1,50	2,05	1,26	1,25	1,08	1,18	1,64	1,62	1,36	1,56	1,28	0,54	0,00											
17	1,29	1,34	1,74	1,90	2,18	1,29	0,71	1,14	1,29	1,44	1,21	1,17	1,45	1,49	1,19	1,13	0,00										
18	1,34	1,10	1,93	1,71	2,21	0,98	1,14	1,19	1,29	1,04	0,63	1,01	0,98	1,59	1,64	1,57	1,15	0,00									
19	1,26	1,01	1,73	1,59	2,26	0,91	1,09	0,70	1,23	0,99	1,02	0,83	0,87	1,52	1,46	1,39	1,13	1,12	0,00								
20	1,10	0,81	1,23	1,29	1,82	1,19	1,30	1,05	1,16	1,20	1,17	1,16	1,20	1,17	1,33	1,31	1,29	1,15	0,95	0,00							
22	1,49	1,49	1,78	2,11	2,43	1,54	1,49	1,31	1,63	1,62	1,64	1,28	1,64	1,52	1,44	1,32	1,45	1,68	1,33	1,59	0,00						
23	1,47	1,23	1,54	1,54	2,09	1,22	1,45	1,64	1,80	1,62	1,58	1,47	1,73	1,46	1,54	1,43	1,55	1,66	1,69	1,85	1,38	0,00					
24	1,32	1,15	1,51	1,47	2,06	1,12	1,42	1,21	1,36	1,06	1,00	0,95	1,11	1,35	1,53	1,46	1,37	1,11	1,19	1,33	1,38	1,01	0,00				
25	1,31	0,94	1,62	1,44	2,02	1,23	1,48	1,23	1,27	1,26	0,88	0,97	1,11	1,31	1,52	1,42	1,39	1,10	1,18	1,29	1,38	1,07	0,62	0,00			
26	1,20	0,85	1,62	1,45	2,07	1,23	1,49	1,29	1,28	1,22	0,78	0,85	1,08	1,34	1,62	1,45	1,35	0,95	1,19	1,20	1,41	1,18	0,65	0,42	0,00		
27	1,45	1,08	1,60	1,48	1,92	1,27	1,48	1,29	1,53	1,42	1,03	1,20	1,28	1,24	1,50	1,37	1,46	1,22	1,29	1,38	1,37	0,97	0,69	0,55	0,58	0,00	

**Tabla 1. 11. Distancias ultramétricas obtenidas mediante mediante 16 variables morfológicas, agronómicas y fenológicas para una colección de *Acroceras macrum*.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	25	26	27	
1	0,00																										
2	1,36	0,00																									
3	1,55	1,55	0,00																								
4	1,55	1,55	1,25	0,00																							
5	2,13	2,13	2,13	2,13	0,00																						
6	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	0,00																					
7	1,32	1,36	1,55	1,55	2,13	1,36	0,00																				
8	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	0,82	1,36	0,00																			
9	0,51	1,36	1,55	1,55	2,13	1,36	1,32	1,36	0,00																		
10	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	1,00	1,36	1,00	1,36	0,00																	
11	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	1,00	1,36	1,00	1,36	0,95	0,00																
12	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	1,00	1,36	1,00	1,36	0,88	0,95	0,00															
13	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	1,00	1,36	1,00	1,36	0,72	0,95	0,88	0,00														
14	1,55	1,55	0,89	1,25	2,13	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	0,00													
15	1,05	1,36	1,55	1,55	2,13	1,36	1,32	1,36	1,05	1,36	1,36	1,36	1,36	1,55	0,00												
16	1,05	1,36	1,55	1,55	2,13	1,36	1,32	1,36	1,05	1,36	1,36	1,36	1,36	1,55	0,54	0,00											
17	1,32	1,36	1,55	1,55	2,13	1,36	0,71	1,36	1,32	1,36	1,36	1,36	1,36	1,55	1,32	1,32	0,00										
18	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	1,00	1,36	1,00	1,36	0,95	0,63	0,95	0,95	1,55	1,36	1,36	1,36	0,00									
19	1,36	1,12	1,55	1,55	2,13	0,82	1,36	0,70	1,36	1,00	1,00	1,00	1,00	1,55	1,36	1,36	1,36	1,00	0,00								
20	1,36	0,81	1,55	1,55	2,13	1,12	1,36	1,12	1,36	1,12	1,12	1,12	1,12	1,55	1,36	1,36	1,36	1,12	1,12	0,00							
22	1,49	1,49	1,55	1,55	2,13	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,55	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	0,00						
23	1,36	1,23	1,55	1,55	2,13	1,23	1,36	1,23	1,36	1,23	1,23	1,23	1,23	1,55	1,36	1,36	1,36	1,23	1,23	1,23	1,49	0,00					
24	1,36	1,23	1,55	1,55	2,13	1,23	1,36	1,23	1,36	1,23	1,23	1,23	1,23	1,55	1,36	1,36	1,36	1,23	1,23	1,23	1,49	1,01	0,00				
25	1,36	1,23	1,55	1,55	2,13	1,23	1,36	1,23	1,36	1,23	1,23	1,23	1,23	1,55	1,36	1,36	1,36	1,23	1,23	1,23	1,49	1,01	0,62	0,00			
26	1,36	1,23	1,55	1,55	2,13	1,23	1,36	1,23	1,36	1,23	1,23	1,23	1,23	1,55	1,36	1,36	1,36	1,23	1,23	1,23	1,49	1,01	0,62	0,42	0,00		
27	1,36	1,23	1,55	1,55	2,13	1,23	1,36	1,23	1,36	1,23	1,23	1,23	1,23	1,55	1,36	1,36	1,36	1,23	1,23	1,23	1,49	1,01	0,62	0,55	0,55	0,00	

La distancia Euclídea entre los genotipos tetraploides varió entre 0,51 y 2,44; mientras que el rango de variación entre los hexaploides fue de 0,42 a 1,18 y el rango de distancias entre tetraploides y hexaploides varió entre 0,78 y 2,09 (Tabla 1. 10). De esos datos se obtuvo una matriz de distancias ultramétricas (Tabla 1. 11), las cuáles corresponden al dendrograma de la Figura 1. 19.

Los genotipos tetraploides se separaron en dos grandes grupos, y en el medio de ambos se agruparon los hexaploides (Figura 1. 19). Las distancias ultramétricas variaron en el rango de 0,51 a 2,13 para los genotipos (4x), 0,42 a 1,01 para los genotipos (6x) y 1,23 a 2,13 entre genotipos (4x) y (6x) (Tabla 1. 11). El coeficiente de correlación entre ambas matrices (o entre las distancias Euclídeas obtenidas del conjunto de datos y el dendrograma a partir de distancias ultramétricas) fue de 0,87.

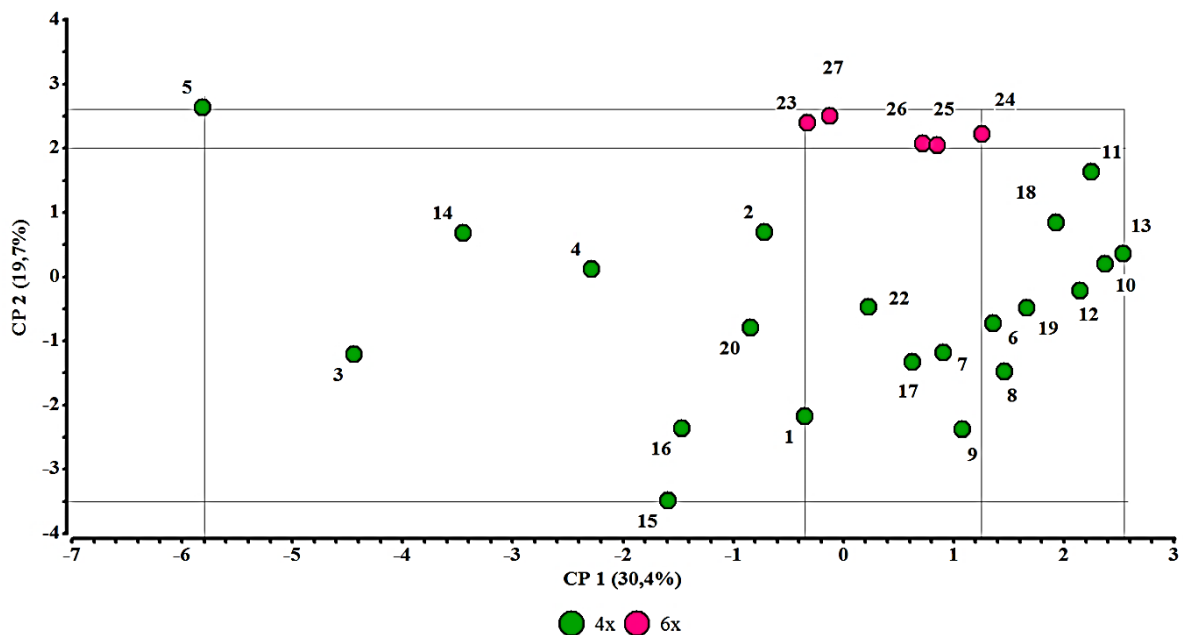


**Figura 1. 19. Dendrograma generado a partir de las distancias euclídeas, mediante el método de agrupamiento UPGMA, en base a 16 caracteres morfológicos, fenológicos y agronómicos de 26 genotipos de *Acroceras macrum*. En color verde se representan los genotipos tetraploides (4x) y en color rosado los hexaploides (6x).**

La diversidad basada en los 16 caracteres morfológicos, agronómicos y fenológicos se estudió también mediante el análisis de componentes principales. Los dos primeros componentes (CP-1 y CP-2) explicaron en conjunto el 50 % de la variación total y permitieron obtener el gráfico de la Figura 1. 20, donde quedan representadas cualitativamente varias características de la diversidad encontrada en dichas variables sobre el conjunto de 26 genotipos de *A. macrum*. Aproximadamente el 40 % de los genotipos (4x) (#5,



3, 14, 4, 15, 16, 20, 2, 1) se disponen en la región comprendida entre -5,8 y -0,4 del CP-1 y los (6x) #23 y 27 se disponen a valores de -0,4 y -0,2, respectivamente, del CP-1; mientras la mayor parte de los hexaploides se dispone en la región comprendida entre 0,7 y 1,3 y el aproximadamente 60 % restante de los tetraploides se disponen en la región comprendida entre 0,3 y 2,6 del CP-1. Por otro lado, aproximadamente el 65 % de los genotipos (4x) se posicionaron en la región comprendida entre cero y -3,5 sobre el CP-2 y el resto de los teraplodes en la región comprendida entre cero y 2,5; mientras que todos los hexaploides se ubican en la región comprendida entre 2 y 2,5 de el CP-2 (Figura 1. 20). Como resultado, los genotipos hexaploides se agrupan sobre valores positivos tanto de CP-1 como de CP-2, y el conjunto de genotipos tetraploides se distribuyen a su alrededor, sobre valores más bajos de CP-1 y/o CP-2.



**Figura 1. 20. Componentes principales obtenidos a partir de 16 caracteres morfológicos, fenológicos y agronómicos evaluados en 26 genotipos de *Acroceras macrum*. Los círculos de color verde representan los genotipos tetraploides (4x) y los rosados los hexaploides (6x).**

Las contribuciones más importantes a la distribución de genotipos observada en la Figura 1. 20 se pueden deducir de los coeficientes de correlación con el CP-1 y CP-2 (Tabla 1. 12). En la Tabla 1. 12, se destacan en negrita los coeficientes de correlación de las variables que presentaron correlaciones importantes (coeficientes  $\geq |0,5|$ ) con los primeros siete componentes principales, mientras que se subrayan los de las que presentaron una correlación media a alta (coeficientes  $\geq |0,3|$ ) tanto para CP-1 como para CP-2.

El CP-1 representó el 30.4 % de la variación total. La variable PV presentó una fuerte correlación negativa con el CP-1, influyendo sobre el desplazamiento de los genotipos hacia valores negativos sobre el eje de las abscisas, mientras que las que presentaron una fuerte correlación positiva con el CP-1 (CI, LL, B, A, LEn y CS) (Tabla 1. 12) contribuyeron con los agrupamientos que se aprecian en la Figura 1. 20 sobre valores positivos del eje de las abscisas. Es decir que las variables cuyos coeficientes de correlación se destacan en negrita en la segunda columna de la Tabla 1. 12, contribuyeron a la distribución intracitotipo de los genotipos.

El CP-2 explicó el 19,7 % de la variación total. La variable CS presentó una fuerte correlación negativa con el CP-2 contribuyendo a desplazar los genotipos hacia valores negativos sobre el eje de las ordenadas, y las variables que presentaron una fuerte correlación positiva con el CP-2 (LEs, AEs, PF, AL) (Tabla 1. 12) contribuyeron principalmente a agrupar los genotipos hexaploides y a desplazar algunos genotipos 4x, sobre valores positivos sobre el eje de las ordenadas. Es decir que las variables cuyos coeficientes se destacan en negrita en la tercera columna de la Tabla 1. 12, contribuyeron a la distribución intracitotipo de los genotipos y a agrupar los genotipos 6x de *A. macrum*.

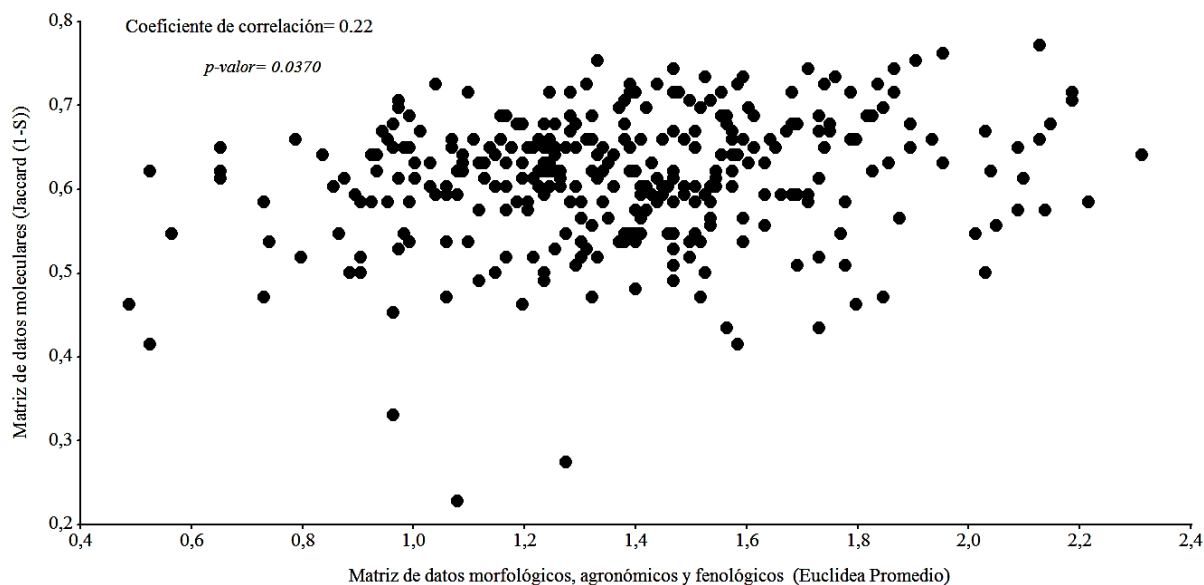
Las variables con los coeficientes de correlación subrayados en la Tabla 1. 12 contribuyen a la distribución sobre ambos ejes. Estos últimos, dependiendo del signo y la magnitud de sus coeficientes, en algunos casos contribuyen a la agrupación intracitotipo (como DC y LEn para el conjunto de los hexaploides) pero principalmente tienden a relacionarse a la variabilidad intracitotipo que se observa en la Figura 1. 20.

La variación que no es explicada por los primeros dos componentes principales es explicada por el conjunto restante de componentes principales. El componente principal 3 (CP-3) contribuyó al 16 % de la variación y se correlacionó fuertemente a las variables NEs, DC, LRB, A, EsA y B. El componente principal 4 (CP-4) explicó el 12 % de la variación total y se correlacionó con A, AL, LRB y PF. Los demás CP explicaron menos del 7 % de la variación total y sus coeficientes de correlación con los caracteres evaluados fueron menores en valor absoluto a 0.4 (Tabla 1. 12). En la Figura 1. 20 puede observarse que los genotipos más cercanos presentaron valores similares para las variables estudiadas (Tabla 1. 8). Los genotipos 6x se agrupan entre sí a distancias más cortas que a los 4x. Algunos genotipos 4x también forman agrupaciones, mientras otros se distinguen claramente de los demás (Figura 1. 20).

**Tabla 1. 12. Correlaciones entre variables morfológicas, agronómicas y fenológicas con los primeros componentes principales (CP-1 a CP-7) derivados del análisis de la diversidad de una colección de *Acroceras macrum***

VARIABLES	CP-1 30,4 %	CP-2 19,7 %	CP-3 16,0 %	CP-4 12,0 %	CP-5 7,0 %	CP-6 5,0 %	CP-7 4,0 %
A	<b>0,82</b>	0,20	-0,19	-0,13	0,29	-0,08	0,14
DC	<u>0,28</u>	<u>0,45</u>	<b>0,62</b>	-0,27	-0,29	0,18	-0,16
AL	0,02	<b>0,56</b>	0,35	<b>-0,55</b>	0,40	-0,19	-0,10
LL	<b>0,87</b>	0,22	0,09	0,07	0,02	0,15	-0,30
LEn	<u><b>0,68</b></u>	<u>0,44</u>	-0,41	0,13	-0,09	-0,01	0,05
LP	-0,11	0,38	<b>0,51</b>	<b>0,69</b>	-0,12	0,04	-0,20
LRB	0,15	0,03	<b>0,63</b>	<b>0,56</b>	-0,25	-0,28	0,24
AEs	-0,07	<b>0,69</b>	-0,02	0,34	0,35	0,01	0,31
LEs	0,02	<b>0,79</b>	-0,24	0,02	-0,16	0,19	0,32
NEs	0,11	-0,29	<b>0,77</b>	-0,17	0,26	-0,37	0,13
EsA	-0,20	-0,28	<b>0,49</b>	0,05	0,42	0,64	0,12
CI	<b>0,95</b>	-0,04	-0,06	0,01	0,15	-0,08	-0,01
CS	<u><b>0,46</b></u>	<u><b>-0,50</b></u>	0,11	-0,42	-0,38	0,10	0,37
B	<b>0,80</b>	-0,01	<b>0,45</b>	-0,12	-0,16	0,18	0,04
PV	<u><b>-0,79</b></u>	<u>0,30</u>	0,21	-0,22	-0,10	0,01	0,12
PF	<u>-0,37</u>	<u><b>0,64</b></u>	0,10	<b>-0,52</b>	-0,23	-0,05	-0,05

En la Figura 1. 21 puede observarse la relación entre la diversidad estimada con las caracterizaciones moleculares y morfológicos y agronómicos, evaluada sobre la base de la prueba de Mantel. Aunque se observó una correlación significativa entre los datos obtenidos sobre la base de las dos técnicas, la explicación que ofrece la variación genética detectada por la técnica de marcadores ISSR de la variación fenotípica observada es bastante baja ( $r = 0,22$ ;  $p$ -valor = 0,037).



**Figura 1. 21. Correlación entre distancias genéticas Jaccard (1-S) obtenidas con marcadores de ISSR y las distancias euclídeas generadas a partir de la evaluación de 16 caracteres morfológicos, fenológicos y agronómicos, en una colección de 26 genotipos de *Acroceras macrum*.**

## ***DISCUSIÓN***

---

### ***Colección del material vegetal***

El presente trabajo permitió rescatar, en gran parte, una antigua colección introducida de África, con material selecto de *Acroceras macrum*. El material rescatado es muy valioso ya que lleva años de adaptación a regiones anegadas del nordeste de Argentina y en este estudio se ha logrado determinar que su diversidad es amplia, lo cual es fundamental para iniciar un programa de mejoramiento de la especie.

La colección introducida a la Argentina constaba de 53 líneas genéticas provenientes del RFI-ARC y cinco líneas importadas por productores. De la colección implantada en la EEA INTA Corrientes, la cual fue abandonada hace varios años atrás, se realizó una colecta de plantas individuales.

### ***Tipificación genética del germoplasma***

Mediante análisis de marcadores de ISSR se logró tipificar genéticamente las 47 plantas recolectadas de la colección original, logrando diferenciarse 27 genotipos, lo cual nos permitió descartar plantas que resultaron clones de algunos de los genotipos identificados. Estos resultados indican que o bien el material original (el cual nunca había sido caracterizado molecularmente) estaba constituido por algunos genotipos repetidos o bien algunos genotipos se perdieron por no poder adaptarse o por el tipo de manejo al que los terrenos fueron expuestos a lo largo de los años desde la implantación del material. Si este último es el caso, los resultados también indican que el material recolectado tiene una gran adaptación y persistencia a las condiciones de donde se lo extrajo, constituyendo germoplasma ampliamente recomendable para su plantación en la zona húmeda de la región (norte y centro de Corrientes).

Weising y col. (2005) concluyen que los marcadores moleculares basados en los polimorfismos del ADN proveen una información de alta calidad para la preservación de material valioso con el máximo de diversidad y sin duplicaciones innecesarias. Los resultados de este trabajo apoyan esa idea, ya que los marcadores ISSR resultaron útiles para la reducción del material a una colección pequeña y de amplia variabilidad. Esto es importante ya que ahorrará espacio, tiempo de trabajo e insumos en las próximas tareas de mejoramiento.

### ***Determinación de los niveles de ploidía***

Los cromosomas de los progenitores y de algunos de los híbridos que componían la colección importada fueron contados y hubo solamente tetraploides y hexaploides. Rhind y Goodenough (1976) reportaron tres niveles de ploidía para *A. macrum*: tetraploides, pentaploides y hexaploides. Dentro de los híbridos de la colección importada, al menos en el grupo del cual se disponía de información del nivel de ploidía, no fue reportado el citotipo pentaploide.

El análisis del número de cromosomas de los genotipos recolectados se realizó por conteo cromosómico que es un método ampliamente reconocido como económico, sin requerimientos de equipamiento sofisticado y directo por lo cual resulta confiable para especie que, como sucede en *A. macrum*, no se cuenta con métodos indirectos estandarizados que eviten los resultados confusos. Este análisis resultó en la presencia de 22 genotipos tetraploides y cinco hexaploides. Esto demuestra que la colección original introducida de Sudáfrica no contenía citotipos pentaploides, o los mismos no sobrevivieron a las condiciones de cultivo en nuestro país. Los niveles de ploidía habían sido chequeados por citometría de flujo (resultado no mostrado), método que interpretó a dos de los cinco genotipos componentes del citotipo tetraploide como pentaploides y a los tres restantes como pentaploides. Interpretaciones erróneas con dicha metodología también fueron observadas en *Brachiaria brizantha* (Pagliarini y col., 2012), lo cual indica que la citometría de flujo no es siempre una metodología apropiada para inferir el nivel de ploidía y que el método directo por observación y conteo cromosómico continúa dando la mayor precisión y seguridad a esos fines.

Se han reportado los números cromosómicos, obtenidos por recuento, de varias gramíneas descritas en regiones africanas donde *A. macrum* crece naturalmente. De Wet y Anderson (1956) estudiaron 79 especies provenientes de 45 géneros de gramíneas colectados en la región sudafricana de Transvaal, incluyendo 32 especies de paníceas; mientras que Hoshino y Davidse (1988) estudiaron 45 especies pertenecientes a 30 géneros de gramíneas colectados en Sudáfrica y Namibia, incluyendo 22 especies de paníceas. En general, en todos los géneros que estos autores estudiaron son comunes los niveles de ploidía  $2n= 2x$ ,  $2n= 4x$ ,  $2n= 6x$  y aunque más raros también se reportaron especies con  $2n= 3x$  (de Wet y Anderson, 1956; Hoshino y Davidse, 1988). Sin embargo, el nivel de ploidía  $2n= 5x$  no parece resultar tan común y no ha sido reportado en los trabajos antes citados.

Estos recuentos sugieren además, que varias especies de la tribu *Paniceae* tienen, como nuestros resultados indican en *A. macrum*; un número básico de cromosomas de  $x=9$  y niveles de ploidía  $2n=4x$  y  $6x$ , indicando que éstos son comunes en las especies sudafricanas de esta tribu. Entre ellas se incluyen especies del género *Panicum*: *P. deustum*, ( $2n=36$ ) (de Wet y Anderson, 1956) y *P. monticolum* ( $2n=54$ ) (Hoshino y Davidse, 1988), especies con  $2n=36$  en el género *Digitaria*: *D. diagonalis* (de Wet y Anderson, 1956), *D. seriata* (de Wet y Anderson, 1956; Hoshino y Davidse, 1988), *D. valida* (de Wet y Anderson, 1956) y *D. var. glauca*, *D. diversinervis* (Hoshino y Davidse, 1988), *D. eriantha* (Hoshino y Davidse, 1988) y *D. ternata* (Hoshino y Davidse, 1988); especies con  $2n=36$  en el género *Setaria*: *S. almaspicata*, *S. lindenbergiana*, *S. perennis*, *S. tenuiseta*, *S. sphacelata* (de Wet y Anderson, 1956), y con  $2n=54$ : *S. chevalieri*, *S. phragmitoides*, *S. splendida* (de Wet y Anderson, 1956) y *S. megaphylla* (Hoshino y Davidse, 1988), especies con  $2n=36$  en el género *Rhynchelytrum*: *R. repens*, *R. setifolium* (de Wet y Anderson, 1956), *R. nerviglume* (Hoshino y Davidse, 1988) y especies de otros géneros como *Pennisetum villosum* ( $2n=54$ ) (Hoshino y Davidse, 1988), *Echinochloa pyramidalis* ( $2n=54$ ) (de Wet y Anderson, 1956), *Alloteropsis semialata* ( $2n=54$ ) (de Wet y Anderson, 1956; Hoshino y Davidse, 1988), , *Urochloa panicoides* ( $2n=36$ ) (Hoshino y Davidse, 1988), *Trycholaena monachne* ( $2n=36$ ) (de Wet y Anderson, 1956) y *Cenchrus ciliaris* ( $2n=36$ ) (de Wet y Anderson, 1956). Por otra parte, en dos especies Americanas nativas del género *Acroceras* también se ha reportado un número cromosómico de  $2n=36$ : *A. zizanioides* Dandy (Davidse y Pohl, 1978) y *A. oryzoides* Stapf (Davidse y Pohl, 1971), lo que podría estar indicando una mayor prevalencia de este número cromosómico que podría deberse a mejores características adaptativas o reproductivas.

### ***Diversidad molecular***

La colección originalmente introducida consistía en híbridos selectos provenientes de un antiguo programa de mejoramiento que se llevó a cabo en Sudáfrica, algunos de ellos formaban parte de una progenie originada de cruzamientos entre poblaciones recolectadas en el este y sur de África, incluyendo el único cultivar sudafricano de la especie “Cedara select” (Rhind y Goodenough, 1976; Rhind y Goodenough, 1979), pero la mayor parte de ellos podían agruparse en familias de medios hermanos, dentro de las cuales algunos hermanos completos también podían encontrarse. En este trabajo se logró distinguir entre grupos de genotipos pertenecientes al citotipo tetraploide respecto de los pertenecientes al citotipo

hexaploide y también se pudo detectar una mayor variabilidad dentro del citotipo tetraploide. Este resultado coincide con lo esperado, dada la naturaleza del material original, el cual contaba con varias líneas producto de cruzamientos, en su mayoría con 36 cromosomas contados (es decir, tetraploides) y un reducido número de hexaploides confirmados por conteo cromosómico. Las líneas tetraploides, como se explicó previamente, constituían familias con diferente grado de parentesco, lo cual podría estar en vinculación con la diferente magnitud de las distancias genéticas encontradas dentro del citotipo  $4x$ . Por otro lado, es esperable también que dentro del grupo de genotipos hexaploides se hallen las menores distancias genéticas, debido a que es muy probable que la mayoría (sino todos ellos) estén emparentados en su origen. Como ya se mencionó, uno de los híbridos de la antigua colección importada tenía de padre al cultivar “Cedara Select”, del otro se desconoce el padre pero es probable que se haya también originado de “Cedara Select” dado que sólo se reportaron dos ecotipos hexaploides dentro del material que originó el programa de mejoramiento del RFI (Rhind y Goodenough, 1976). El material introducido por productores resultó ser hexaploide en el conteo de cromosomas, y se presume que dicho material era de hecho el “Cedara Select”. El cruzamiento entre estas líneas dentro del predio de la EEA INTA Corrientes pudo haber originado los cinco genotipos hexaploides que estuvieron presentes en el material vegetal de este trabajo.

Los marcadores moleculares ISSR distinguieron 27 genotipos y los agruparon según su nivel de ploidía, con distancias genéticas entre pares dentro de un amplio rango para ambos grupos (0,28 a 0,64 dentro del clúster tetraploide y entre 0,22 y 0,63 en el hexaploide), y una mayor diversidad dentro del citotipo  $4x$ . El agrupamiento de genotipos de un mismo nivel de ploidía, según las distancias genéticas determinadas por marcadores moleculares ISSR también se informó para otras especies como *Trifolium hybridum* (Paplauskienė y Dabkevičienė, 2012), *Camellia reticulata* (Wang y Ruan, 2012) y *Cynodon dactylon* (Farsani y col., 2012). La distancia promedio entre todos los genotipos fue de 0,61. La distancia entre los diferentes pares de genotipos estudiados fue de 0,22 a 0,80, siendo la mayor de ellas la que separa un genotipo  $4x$  de uno  $6x$ . Al comparar estas distancias con la distancia promedio de los genotipos de *A. macrum* a una especie diferente (0,84), en este caso *P. notatum* (usado como patrón en este trabajo), se puede notar que la diversidad dentro del material estudiado es de amplitud considerable. Este hecho posibilita el cruzamiento entre genotipos con diferente grado de distanciamiento, lo cual sería posible tanto dentro de un nivel de ploidía como entre

los dos niveles de ploidía presentes en el material. Esto posibilitaría conseguir una variación continua que permita plantear el mejoramiento y selección en caracteres de interés.

En cuanto a los iniciadores utilizados para el análisis de la diversidad, sus valores de PIC (Tabla 1. 4) de entre 0,2 y 0,36 indican que cada uno de ellos es medianamente informativo individualmente. La informatividad de un marcador refleja la probabilidad de encontrar individuos heterocigotos para ese marcador en la población general, y es función del número de alelos posibles para el marcador y de las frecuencias relativas de cada alelo en la población (Nagy y col., 2012). El número bajo de alelos, para el caso de los ISSR se asumen dos por *locus*, sumado a que las frecuencias alélicas en marcadores dominantes no siempre están balanceadas en 0,5 para la presencia y 0,5 para la ausencia de banda (característica propia de este tipo de marcadores) (Pradeep Reddy y col., 2002), determina que sea normal que los valores de PIC no superan el 0,5. Aun así, estudiando un número de *loci* elevado, la información suministrada por el conjunto de marcadores ISSR puede dar mayor información sobre la diversidad genética que otros tipos de marcadores moleculares (Pradeep Reddy y col., 2002; González y Aguirre, 2007) (ver ejemplos en el Capítulo Introductorio). Ese rango de PIC y el número de bandas polimórficas amplificadas son del mismo orden que lo informado para marcadores ISSR en otras especies vegetales como *Cynodon dactylon* (Farsani y col., 2012), *Curcuma longa* (Singh y col., 2012), *Morus alba* (Kalpana y col., 2012) y *Paspalum simplex* (Brugnoli y col., 2014), especies donde se determinó con éxito la diversidad inter e intrapoblacional.

### ***Diversidad mediante caracteres morfológicos, agronómicos y fenológicos***

Las 16 variables morfológicas agronómicas y fenológicas estudiadas presentaron diferencias significativas entre los genotipos. Entre las variables estudiadas, varias presentaron coeficientes de variación general superiores al 25 % (A, LL, B, LEn, CI y NEs) (Tabla 1. 8), estos rasgos dieron una importante contribución a que se lograran separar genotipos diferentes mediante el análisis morfológico, agronómico y fenológico.

El presente trabajo también encontró diferencias significativas para algunos caracteres morfológicos, agronómicos y fenológicos entre tetraploides y hexaploides. En algunos casos se trató de caracteres que presentaron una gran variabilidad general y una amplia variabilidad dentro de cada citotipo (coeficientes de variación superiores al 25 %) pero en otros casos se trató de caracteres que independientemente de la variabilidad general,



tuvieron baja variabilidad dentro de cada citotipo (coeficientes de variación menores al 16 %) y diferencias significativas de los valores medios entre los 2 niveles de ploidía estudiados. Las características que presentaron baja variabilidad dentro de los citotipos pero con medias significativamente diferentes entre éstos, podrían servir para distinguir morfológicamente genotipos 4x de 6x, por ejemplo las dimensiones de las espiguillas (Tabla 1. 8). Resultados similares, donde algunas características morfológicas o agronómicas permitieron agrupar diferencialmente genotipos según sus diferentes niveles de ploidía, se encontraron también para otras especies como *Trifolium hybridum* L. (Paplauskienė y Dabkevičienė, 2012) y *Dactylis glomerata* L. (Peng y col., 2008)

La caracterización mediante rasgos morfológicos, agronómicos y fenológicos deja algunos aspectos a destacar como las diferencias significativas entre los valores medios de los días que se tarda para alcanzar el pico de floración (PF) al comparar el citotipo tetraploide y el hexaploide (Tabla 1. 8). Esto crea un desfase entre las fechas de máximo floración de algunos genotipos 4x y 6x que podría dificultar su cruzamiento. Aun así, otros cruzamientos entre estos dos niveles de ploidía serán posibles dado que algunos genotipos 4x coinciden en PF con los 6x (Figura 1. 18).

Es destacable también el hecho de que el material de trabajo presentó en su morfología rangos de valores de medios a altos según la descripción de la especie (Zuloaga y col., 1987) llegando a superar los valores reportados en algunos órganos reproductivos. Así, si bien la altura de la planta (A) y el ancho de la lámina foliar (AL), rondan en la mitad del rango de los valores reportados para la especie, el largo de la lámina foliar (LL), el largo de la panícula (LP), el largo del racimo basal (LRB) y el largo de la espiguilla (LEs) van de la media al más del máximo descripto. Esto puede estar en relación al hecho de que el material original contenía líneas selectas por su performance, muchas de las cuales se distinguían por su vigor (Tabla 1. 8).

También se puede destacar que, como es común que se de en vegetales poliploides, muchas variables relacionadas al tamaño de los órganos presentaron valores más altos en los genotipos hexaploides al compararlos con otros de ploidía menor (tetraploides). Por otro lado, como se ve en la Tabla 1. 8, si bien los genotipos hexaploides se destacan sobre la mayor parte de los tetraploides para las variables A, LEn, LL, AL, LEs y AEs; para las mismas también se puede hallar genotipos tetraploides con performance destacada.

Si bien varias de las características analizadas tienen un alto valor agronómico y presentaron importante variabilidad que posibilitará su posterior selección con fines de mejoramiento, un resultado muy interesante fue el mayor número de espiguillas en varios genotipos tetraploides ya que el bajo número de cariósides es una de las limitaciones a superar con el mejoramiento de la especie (Figura 1. 15). Otro resultado destacable desde el punto de vista agronómico fue encontrar correlaciones de magnitud importante entre variables de interés, una de las más relevantes fue la correlación positiva entre el crecimiento inicial y biomasa, altura y largo de la lámina foliar de la planta ( $r$  de 0,61; 0,50 y 0,50; respectivamente), una correlación negativa entre crecimiento inicial y longitud del periodo vegetativo ( $r = -0,57$ ) y correlaciones positivas entre variables de tamaño (o cantidad) de los órganos como ser longitud de la panícula y del racimo basal; longitud del racimo basal y número de espiguillas, largo de lámina con la longitud del entrenudo y con la altura de la planta ( $r = 0,61$ ; 0,44; 0,50 y 0,50; respectivamente) (Tabla 1. 9). Es decir que, dentro del acervo genético de esta colección, sería posible aumentar el rendimiento en semilla fértil, por ejemplo mediante la selección de genotipos con panículas anchas, con mayor porcentaje de apertura de las espiguillas, mayor número y tamaño de espiguillas y una floración concentrada que favorezca su cosecha. De igual modo, sería posible seleccionar genotipos que reúnan las mejores características de producción forrajera, por ejemplo plantas de porte importante con buena altura, hojas grandes y entrenudos largos invasivos. Pero además, sería posible seleccionar precozmente genotipos según el vigor con que se implanten, dado que el vigor inicial presentó una importante correlación positiva con la biomasa y negativa con la extensión del periodo vegetativo y que la buena implantación también se correlacionó con la altura de la planta y el tamaño de sus hojas. Es decir que un rápido establecimiento, que podría relacionarse con una mayor capacidad fotosintética dada su correlación con el tamaño de las hojas, estaría reflejando una mejor adaptación de la planta a las condiciones edafológicas y climáticas del NEA, y esto se traduce en mejores rendimientos y en una floración temprana. Cuando además la floración es concentrada (se alcanza la máxima floración en periodos más cortos), no sólo se podría facilitar la cosecha de las semillas, sino también disminuir el posible impacto de la foración sobre el valor nutritivo.

### ***Correlación entre la diversidad mediante caracteres moleculares y morfológicos, agronómicos y fenológicos***

Sobre la base de la prueba de Mantel, se obtuvo una correlación significativa entre la diversidad estimada con las caracterizaciones moleculares y morfológicos, agronómicos y fenológicos; aunque esta fue baja ( $r = 0,22$ ;  $p = 0,037$ ) Figura 1. 21. Una correlación positiva y de un orden similar ( $r = 0,23$ ) entre estos dos métodos también se observó en *Paspalum simplex* (Brugnoli y col., 2014) en un análisis que incluyó un similar número de marcadores y cinco variables morfológicas y agronómicas. En *Sorghum bicolor* L., otra especie africana que ha sido introducida en América, Abdel-Fatah y col. (2013) no encontraron una correlación significativa para siete variables agronómicas y 22 marcadores ISSR, la correlación no fue significativa incluso al incrementar el número de marcadores a 64 combinando en la matriz molecular datos de marcadores ISSR y RAPD. El hecho de que la correlación fue significativa y positiva, pero de poca magnitud puede estar en relación a que la variación genotípica es sólo un componente de la variación fenotípica, la cual tiene además un fuerte componente ambiental (Mesén, 1998). Por otro lado la naturaleza de los marcadores utilizados (que si bien informan la variabilidad de algunas regiones codificantes predominantemente lo hacen de las no codificantes) (González y Aguirre, 2007) los hace poco adecuados para explicar rasgos como los estudiados, que se basan en la expresión fenotípica de regiones génicas codificantes.

Sendas técnicas resultan en información que es complementaria, y el uso de ambas permite explorar tanto tanto la variabilidad genética expresada como la no expresada. Dado que ambas son función de la variabilidad genética, están correlacionadas. Una buena correlación entre estas técnicas es deseable desde el punto de vista que indica que las características evaluadas son aceptablemente heredables (Pohelman y Sleper, 2003), por lo cual podría constituir una eficaz herramienta para la selección de futuras líneas mejoradas y proteger la propiedad intelectual de los cultivares. Una mejor correlación entre las dos metodologías podría conseguirse vinculando el análisis molecular al de características fenotípicas de interés que tengan un componente genético lo más alto posible y a su vez una baja influencia ambiental.

## ***CONCLUSIONES***

---

A partir del presente trabajo se logró rescatar una colección de germoplasma exótico de *Acroceras macrum* altamente adaptado a áreas donde las pasturas son de muy baja calidad como lo son las zonas bajas y anegadizas del nordeste de Argentina. Este material tiene un gran potencial agronómico para el mejoramiento, y su caracterización genética permitió preservarlo para ese fin evitando la redundancia de material, lo cual ahorra espacio, recursos económicos, humanos y tiempo.

El germoplasma caracterizado contenía material de dos niveles de ploidía: el 81,5 % correspondió al citotipo tetraploide y el 18,5 % al citotipo hexaploide. No estuvo presente material del tercer nivel de ploidía reportado para la especie: pentaploide.

Esta colección contiene un grupo de 27 genotipos con una amplia diversidad, entre ellos se puede encontrar diferentes grados de separación genética, la mayor de estas distancias se encuentra entre un par de genotipos de ploidía diferente. La mayor parte de esta diversidad está presente en un grupo de 22 genotipos tetraploides. En el resto de ellos, un grupo de cinco genotipos hexaploides, la diversidad es restringida pero el rango de distancias entre ellos es amplio.

El material presentó igualmente importante variación en algunos rasgos agronómicos, muchos de los cuales presentaron diferencias significativas entre los valores medios para los dos niveles de ploidía estudiados. Muchos de estos rasgos que estuvieron en relación al tamaño de los órganos presentaron medias significativamente mayores para el citotipo hexaploide, pero las medias fueron menores en los rasgos relacionados con la fertilidad de las plantas.

Los genotipos hexaploides presentaron en promedio una fecha de floración más avanzada que el promedio de los tetraploides, aun así la amplia diversidad encontrada para este rasgo en los tetraploides hace posible encontrar genotipos que florezcan en fechas coincidentes con los hexaploides, pudiéndose proyectar la obtención de material híbrido con un nivel de ploidía pentaploide.

El nivel de diversidad estimado por marcadores moleculares estuvo correlacionado con la diversidad obtenida mediante variables morfológicas y agronómicas. La magnitud de esta correlación fue baja, pero aun así significativa. Es factible encontrar rasgos de interés cuya variabilidad se explique mejor a partir de la diversidad genética utilizando

marcadores moleculares ISSR, y el estudio de la correlación entre sus matrices es una herramienta útil para elegirlos.

Estos resultados, son el primer paso para diagramar el estudio que conduzca a una caracterización reproductiva y posteriormente a programar la mejora genética de la especie a partir del germoplasma presente en Argentina.

# Capítulo 2

---

*Modo de reproducción, tipo de poliploidía y fertilidad de la colección de Acroceras macrum.*

## **OBJETIVOS**

- Determinar el modo de reproducción de *A. macrum* mediante análisis de la macrosporogénesis y megagametogénesis.
- Estimar el tipo de poliploidía a partir del análisis de la microsporogénesis de los diferentes citotipos de *A. macrum*.
- Determinar la fertilidad masculina de *A. macrum* mediante análisis de la viabilidad del polen.
- Establecer el sistema de polinización de *A. macrum* a partir de la producción de semillas en diferentes condiciones de polinización.
- Evaluar la posibilidad de obtener híbridos intraespecíficos de *A. macrum* a partir de cruzamientos intra- e interploidía.

## ***INTRODUCCIÓN***

---

La reproducción es un proceso fundamental de los seres vivos que asegura la continuidad de las especies. Los vegetales tienen mecanismos que le permiten tanto la reproducción sexual como la reproducción asexual, los cuales son muy diversos. Cada uno de los distintos mecanismos de reproducción requiere que la planta posea recursos especiales (Strasburger y col., 2004). Los sistemas reproductivos determinan el flujo de genes y la estructura genética de las poblaciones; conocer sus características es fundamental para utilizar más eficientemente los recursos genéticos dentro de los programas de mejoramiento vegetal, tanto para la producción de híbridos como también como una herramienta en la selección de genotipos élite (Acquaah, 2012).

En una familia con cerca de 10.000 especies como es el caso de las gramíneas, es muy difícil hacer generalizaciones. De cualquier manera, la reproducción sexual está presente en la mayoría de las gramíneas, ya sea como un mecanismo obligado o facultativo o en la pseudogamia; y entre las características reproductivas más frecuentes se pueden nombrar el hermafroditismo y la alogamia, con un mecanismo de polinización cruzada que depende principalmente de la acción del viento. Sin embargo, en el caso de *A. macrum*, como en el de muchas otras gramíneas, la multiplicación clonal por rizomas y estolones es el principal modo de propagación (Zuloaga y col., 1987). Esto no descarta que otros sistemas reproductivos estén igualmente presentes en la especie. De hecho, para *A. macrum* se ha reportado la obtención de plántulas a partir de semillas provenientes de cruzamientos, y aunque el origen híbrido de las mismas no fue determinado, presentaron cierto grado de variabilidad para algunas características agronómicas estudiadas (Rhind y Goodenough, 1976), lo cual es un importante indicio de reproducción sexual; por otro lado tampoco se puede descartar la posibilidad de algún tipo de desarrollo apomítico en la especie (Rhind y Goodenough, 1979). La aposporia (el más frecuente de los procesos apomíticos en las gramíneas) en la mayoría de los casos se presenta en paralelo a la producción de gametas sexuales fértiles. Por otro lado, en algunas especies que presentan muy baja fertilidad, como *Echinochloa stagnina*, se ha reportado que la apomixis no es exitosa, se han observado aberraciones que impiden el correcto desarrollo de los sacos embrionarios y también problemas meióticos que impiden la formación de polen viable (Muniyamma, 1978). Pero además, los sistemas reproductivos resultan de la combinación de varios factores entre los cuales el comportamiento meiótico de las células madre que originan los gametos y la compatibilidad genética entre los mismos;

cumplen un rol fundamental. Por lo tanto, el estudio de los sistemas reproductivos implica estudiar los procesos de generación de los gametofitos tanto masculinos como femeninos; y también caracterizar y establecer las propiedades de los sistemas genéticos, tales como su organización, estructura y comportamiento meiótico (Pareja Ordóñez y col., 2010). Por último, para tipificar con precisión el modo de reproducción de un individuo, los estudios citológicos de los eventos que se desarrollan en los gametangios no son suficientes, sino que también se requiere diseñar experiencias para el estudio del sistema de polinización, de producción de semillas mediante cruzamientos en condiciones controladas y caracterizar si existe diversidad o uniformidad genética dentro de la descendencia producida (Brown y Emery, 1958).

Debido al casi total desconocimiento acerca del modo de reproducción o los diferentes modos por los cuales *A. macrum* puede reproducirse, el objetivo principal de este capítulo es determinar si esta especie es realmente capaz de reproducirse sexualmente generando híbridos que posibiliten su mejoramiento genético. Para ello es necesario estudiar si la especie produce gametos con una estructura y fertilidad compatibles con la reproducción sexual, o si por el contrario estas estructuras se relacionan con un modo de reproducción apomíctico. Esto es encarar el estudio de la génesis del polen y del saco embrionario, lo cual dará un panorama acerca de hasta qué punto estos procesos se desarrollan siguiendo el curso normal de las plantas que se reproducen sexualmente y de la ocurrencia de irregularidades que puedan conducir a la formación de gametófitos aneuploides, inviables o no reducidos. Pero para una correcta interpretación del modo de reproducción, estos estudios deben completarse estudiando la producción de semillas en diferentes condiciones de polinización; esto es favoreciendo la fecundación al azar con otros genotipos, forzando la autopolinización, o diseñando cruzamientos controlados con previa emasculación o sin emasculación; y verificando el origen de la progenie obtenida mediante cruzamientos. Estos estudios serán de utilidad para establecer si el germoplasma disponible de *A. macrum* sólo es capaz de reproducirse clonalmente y por lo tanto su mejoramiento genético mediante cruzamientos no sería viable, o si es capaz de reproducirse sexualmente. En este último caso se debe establecer si lo hace de forma preferentemente autógena, alógama o facultativa. Todo este conjunto de datos será el puntapié inicial para encarar el mejoramiento de esta especie tan promisoría por el camino correcto.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

### ***Material vegetal***

El germoplasma de *Acroceras macrum* utilizado para esta investigación fue recolectado en la región del NEA y, como se explica en el Capítulo 1, consistió en 27 genotipos: 22 de ellos tetraploides y cinco hexaploides.

### ***Análisis de la megasporogénesis y la megagametogénesis***

Inflorescencias en diferentes estadios de desarrollo fueron recolectadas por la mañana (entre las 7 y las 8 hs) y fijadas en una solución de FAA (formaldehído: ácido acético:etanol 70 %, en proporciones 1:1:18 v/v) por 24 hs. Para el análisis de la megasporogénesis se colectaron inflorescencias inmaduras, las cuales se encontraban dentro de su envoltura foliar o con el ápice apenas emergiendo de la misma. También se colectaron inflorescencias con espiguillas en antesis para estudiar los sacos embrionarios. Después de 24 hs en el fijador se desechó la solución de FAA y se agregó etanol 70 % para su conservación en heladera a 4° C. Un total de 8 genotipos tetraploides y 2 hexaploides fueron analizados.

Se realizaron disecciones de los pistilos de las espiguillas fijadas, con la ayuda de un bisturí y aguja histológica, bajo una lupa estereoscópica EZ4 (Leica ®). Los pistilos fueron conservados en etanol 70 % a 4 °C hasta su tratamiento de clarificación. De las inflorescencias inmaduras se conservaron los pistilos con estigmas recientemente emergentes a recientemente formados, y de las inflorescencias maduras se conservaron los pistilos de espiguillas en reciente antesis o en un estado próximo a la misma.

La serie de pasos para la clarificación de los pistilos fue una adaptación de la técnica de Young y col. (1979). La misma consistió en exponer los pistilos a la acción de una serie de soluciones que se describen en la Tabla 2. 1; esto se realizó aspirando cuidadosamente la solución sobrenadante de los tubos conteniendo los pistilos y reemplazándola por la siguiente en la serie. El primer paso consistió en la decoloración de los pistilos, reemplazando la solución de conservación (etanol al 70 %), por una solución de decoloración (peróxido de hidrógeno al 10 %). Los pistilos quedaron expuestos a esta última solución por un lapso de media hora a dos horas, hasta notar una adecuada decoloración. Los pasos subsiguientes consistieron en (1) la deshidratación seriada en diluciones de concentración creciente de etanol en agua, seguida de (2) la clarificación seriada en mezclas

de diferentes proporciones de etanol y salicilato de metilo. Los pistilos clarificados se montaron sobre un portaobjeto, con el agregado de una gota de metilsalicilato, y luego se colocó un cubreobjeto sobre los mismos para finalmente ser observados bajo un microscopio óptico con dispositivo Normanski o de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC). Se observó un mínimo de 30 pistilos inmaduros por genotipo seleccionado, registrando la presencia (o ausencia) de estructuras características de procesos meióticos y/o apospóricos de la megaesporogénesis. En estadíos en anthesis, se observó un mínimo de 30 pistilos por cada genotipo seleccionado.

**Tabla 2. 1. Metodología de clarificado de ovarios, según la descripción de Young et al. (1979) con algunas modificaciones, utilizada en *Acroceras macrum*.**

	SOLUCIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN					
		30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
<b>1. SERIE DE DECOLORACIÓN</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 %)</b>	Hasta decoloración					
<b>2. SERIE DE DESHIDRATACIÓN</b>	<b>ETOH (% EN VOL)</b>	50	70	80	90	100	100
<b>3. SERIE DE CLARIFICACIÓN</b>	<b>ETOH: SALICILATO DE METILO (PROPORCIÓN V/V)</b>	1: 1	1: 3	1: 6	1: 9	0: 1	0: 1

### *Estudio de la microesporogénesis*

Se fijaron inflorescencias jóvenes (aun sin emerger o emergiendo en menos de un diez por ciento de su largo final), en una solución de etanol 96° y ácido acético glacial en proporciones 3:1 (v/v) durante 24 h; después se pasaron a etanol 70° y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su análisis. Para colorear cromosomas se utilizó una solución saturada de colorante carmín en ácido acético (solución de acetocarmín), el cual colorea los componentes del citoplasma. La meiosis se produce en estadíos muy tempranos en la formación de flores y es necesario detectar no sólo el estadío apropiado en que se encuentren espiguillas con anteras cuyas células madre del polen (CMP) estén en plena división meiótica, sino también el horario adecuado para encontrar la mayor proporción CMP en los estadíos meióticos de interés. Las asociaciones cromosómicas se observaron durante la diacinesis, aunque adicionalmente se hicieron observaciones sobre estadíos más avanzados de la meiosis para detectar la ocurrencia de anomalías como grupos de cromosomas no

orientados en la placa ecuatorial, anormalidades en el huso acromático, cromosomas rezagados, adelantados o adheridos y no disyunción.

Las anteras se diseccionaron bajo una lupa estereoscópica EZ4 (Leica ®) y se transfirieron cada una a un portaobjetos de vidrio con una gota de acetocarmín. Se dejó en contacto el tejido con el colorante durante 1 a 3 segundos, luego de lo cual se aplastó suavemente (sin machacar) la antera hasta su eclosión, usando el revés de una pequeña cuchara de acero inoxidable. Se retiraron los restos de antera y se cubrió el preparado con un cubreobjetos, se retiraron las burbujas de aire con golpes suaves y se colocó el preparado entre dos láminas de papel de filtro sobre los cuales se aplastó firmemente con el dedo pulgar. Se calentó el preparado con calor suave sobre una llama de alcohol, aproximadamente a 80 °C, evitando que hierva y se precedió a su observación en el microscopio óptico DM2500 (Leica ®) (con ocular de 20 o 40 aumentos) de modo de chequear el estado meiótico de las Células madre del Polen (CMP). Los preparados en el estado meiótico adecuado (diacinesis o prometafase) se hicieron permanentes con trementina de Venecia, se dejaron secar bajo la presión de una pequeña pesa (por un lapso de un mes aproximadamente) y se observaron campo a campo con ocular de 100 aumentos en aceite de inmersión. Se dibujaron las células y se tomaron fotos de células seleccionadas. Se tomaron registros de asociaciones cromosómicas en 65 CMP provenientes de tres genotipos tetraploides, y en 30 CMP provenientes de un genotipo hexaploide. Además se observó un número variable de células en estados más avanzados de la meiosis.

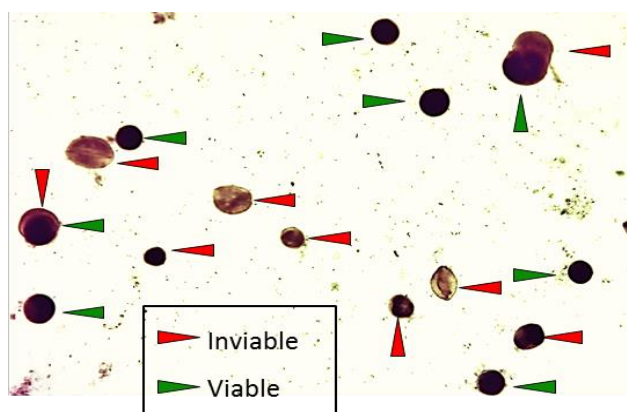
### ***Análisis de la viabilidad del polen***

Utilizando una caja de Petri conteniendo una servilleta de papel a modo de cámara húmeda, Se recogieron espiguillas en el inicio de la antesis (primeros signos de apertura de las glumas), pocos minutos antes de la emergencia de las anteras. Se extrajeron las anteras maduras de cada espiguilla bajo una lupa estereoscópica EZ4 (Leica ®). Las anteras se depositaron sobre una gota de solución de lugol (preparada con 1 gr. de yodo, 2 gr. de yoduro de potasio en 100 ml de agua ultrapura), en un portaobjetos donde se realizó un aplastado con una pequeña cuchara metálica para liberar los granos de polen. Se eliminaron los restos de anteras y se cubrió el preparado con un cubreobjetos. Se observaron unos 1000 granos de polen por preparado, donde se contabilizaron los que se tiñeron con lugol (color oscuro) y los que no se tiñeron (color claro). El tamaño de los granos de polen no fue medido, pero se tomó

en cuenta a la hora de considerar su viabilidad. Dado que las micrósporas aneuploides no suelen ser viables debido a su desbalance genético, y su generación está frecuentemente asociada a la de granos de polen de menor tamaño que no se colorean (Chalup y Seijo, 2005; Ortiz y col., 2006), sólo fueron considerados viables los granos de tamaño medio a grande que estuvieran completamente teñidos.

Las observaciones se hicieron en un microscopio óptico DM2500 (Leica ®) a 20 x de aumento.

La viabilidad del polen se midió en porcentaje considerando el número total de granos de polen teñidos en al menos tres cuartas partes de su contenido y con un tamaño medio a grande, sobre el total de granos de polen contabilizados y multiplicado por 100. Por cada planta se repitió el conteo tres veces (sobre espiguillas diferentes, las espiguillas recogidas de cada planta se conservaron en heladera dentro de su cámara húmeda hasta el momento del conteo). Un ejemplo del criterio considerado para estimar la viabilidad de los granos de polen puede observarse en la Figura 2. 1.



**Figura 2. 1. Criterio de viabilidad del polen utilizado para una colección de *Acroceras macrum*. Se consideraron viables sólo los granos de tamaño mediano a grande que estuvieran teñidos al menos en tres cuartas partes de su contenido.**

#### ***Determinación del sistema de polinización y de la fertilidad***

El material vegetal utilizado estuvo constituido por los 27 genotipos encontrados en la colección (como se describe en el Capítulo 1). Todos los individuos fueron clonados por multiplicación vegetativa en un invernáculo de la FCA-UNNE (Figura 2. 2 a) y luego fueron plantados en el predio del Campus Sargento Cabral de la FCA-UNNE (Figura 2. 2 b). El diseño experimental utilizado fue el de bloques completos al azar con dos repeticiones para favorecer la polinización libre entre los diferentes genotipos. Las plantas se ubicaron a una distancia de 1 × 1 m en cuatro líneas por bloque (Figura 2. 2 b).

Las determinaciones se realizaron evaluando la producción de semillas por autopolinización y bajo polinización abierta, y también mediante cruzamientos controlados con y sin emasculación previa.



**Figura 2. 2. Material utilizado en los cruzamientos a partir de una colección de *Acroceras macrum*. a. clones de las plantas multiplicadas vegetativamente en invernáculo para ser plantadas en la parcela experimental (b) y para los cruzamientos.**

Producción de semillas por autopolinización: la metodología empleada para las autopolinizaciones consistió en seleccionar tres o cuatro inflorescencias por planta, en las cuales aún no se había iniciado la antesis de las primeras espiguillas, y ensobrarlas por separado, en sobres de papel sulfito, permaneciendo de esa forma durante 25 a 30 días hasta la madurez de las cariósides (Figura 2. 3 b). El ensobrado se realizó a mediados de febrero de 2013.

Producción de semillas por polinización abierta: para evaluar la producción de semillas en polinización abierta, tres o cuatro inflorescencias de cada planta, en ambas repeticiones, fueron ensobradas con sobres de papel sulfito a mediados de febrero del 2013. El ensobrado se realizó un día después de haberse producido la antesis de todas las espiguillas de la inflorescencia. Los sobres se mantuvieron cubriendo la panoja hasta su maduración (Figura 2. 3 b).

Producción de semillas a partir de cruzamientos controlados: la producción de semillas con diferentes combinaciones genotípicas se evaluó mediante cruzamientos controlados utilizando dos procedimientos: 1) cruzamientos mediante emasculación previa del progenitor femenino y 2) cruzamientos sin emasculación previa del progenitor femenino.

La técnica con la emasculación previa de los progenitores femeninos se ensayó en 15 combinaciones: trece combinaciones homoploides entre 4x y dos heteroploides. La técnica

sin emasculación previa se ensayó en 22 combinaciones: diez homoploides entre  $4x$ , dos homoploides entre  $6x$  y diez heteroploides (



**Tabla 2. 2).** En el conjunto de las combinaciones realizadas por ambas metodologías, se emplearon 25 genotipos diferentes (ya sea como progenitores femeninos o masculinos), todos los genotipos hexaploides estuvieron involucrados, y sólo un genotipo 4x (#19), no se utilizó en ningún cruzamiento (





Tabla 2. 2).



Figura 2. 3. Cámara húmeda utilizada para los cruzamientos controlados con emasculación (a) y plantas ensobradas en la parcela experimental para evaluar la producción de semillas en condiciones de autopolinización y de polinización abierta (b).

Tabla 2. 2. Detalle de los cruzamientos controlados entre diferentes genotipos de *Acroceras macrum*. Se indica el progenitor femenino a la izquierda y el masculino a la derecha.

	CRUZAMIENTOS C/ EMASCULACIÓN	CRUZAMIENTOS S/ EMASCULACIÓN
	♀ x ♂	♀ x ♂
	1 x 16	2 x 3
	3 x 16	4 x 9

<b>TETRAPLOIDES</b>	6 x 1	5 x 13
	6 x 17	11 x 5
	8 x 1	12 x 2
	8 x 3	12 x 8
	9 x 16	14 x 6
	10 x 1	14 x 8
	13 x 4	15 x 4
	16 x 4	20 x 5
	17 x 1	
	18 x 17	
	21 x 13	
<b>HOMOPLOIDES</b>		25 x 26
		26 x 27
<b>HEXAPLOIDES</b>	9 x 23	4 x 24
	27 x 13	4 x 25
		5 x 24
		22 x 24
		23 x 5
		23 x 7
		24 x 3
		25 x 8
		25 x 9
		27 x 1

Los cruzamientos con emasculación previa a la polinización fueron realizados en el invernáculo de la FCA-UNNE. Las plantas utilizadas como madres se encontraban cultivadas en macetas bajo invernáculo; mientras que el polen de los progenitores masculinos fue recolectado de las plantas que formaban parte de la parcela experimental dentro del mismo predio de la FCA-UNNE. El proceso de los cruzamientos comenzaba con la colecta de polen del progenitor masculino dentro de sobres de papel sulfito. Este procedimiento se realizaba al comienzo de la antesis (6:30 - 7:30 hs), el mismo día en que sería utilizado para la polinización del progenitor femenino. Las plantas madres se depositaban en una cámara para cruzamientos (Figura 2. 3 a) la tarde previa a la polinización. Esta cámara está provista de un humidificador, el cual mantiene una alta humedad ambiente para evitar la dehiscencia de las anteras. Las macetas de las plantas madres fueron colocadas en la cámara de cruzamiento, la tarde previa al inicio de la floración (antesis de las espiguillas). El humidificador de la cámara se activa automáticamente mediante un temporizador, el cual fue programado para que el equipo se encienda dos a tres horas antes del comienzo de la antesis, dejando el ambiente saturado de humedad una vez que emergen las anteras. A la mañana del día siguiente y en el horario de la floración, se procedió a la emasculación de las espiguillas en antesis, mediante la ayuda de una pinza de puntas rectas y finas, evitando que las mismas se abran y derramen su polen sobre los estigmas. Una vez emasculadas, se procedió a la polinización depositando el

polen recolectado desde el sobre y sacudiendo delicadamente sobre las inflorescencias del progenitor femenino. Luego de la polinización, las inflorescencias permanecieron ensobradas para evitar la contaminación con polen extraño. Como el proceso para completar la floración de todas las espiguillas de una inflorescencia de *A. macrum* lleva varios días, fue necesario repetir el procedimiento descrito previamente durante 5 a 7 días. Luego de completada la polinización de todas las espiguillas de la inflorescencia, éstas se mantuvieron ensobradas hasta la maduración de las cariósides.

El segundo procedimiento de cruzamientos controlados, sin emasculación previa del progenitor femenino, se llevó a cabo sobre las plantas cultivadas en la parcela experimental. El procedimiento involucró la eliminación de las espiguillas de las inflorescencias del progenitor femenino que ya habían florecido los días previos al inicio de los cruzamientos, y el posterior ensobrado de las mismas. A partir del inicio de la antesis de las espigas ensobradas del progenitor femenino, se colectó polen del progenitor masculino. Este procedimiento se realizó provocando el depósito del polen sobre una de las caras internas de un sobre de papel sulfito, ensobrando y dando suaves golpeteos a las inflorescencias en antesis del progenitor masculino; tras lo cual dicho sobre se utilizó para reemplazar el que hasta entonces ensobraba las inflorescencias del progenitor femenino, cuidando que los estigmas entren en contacto con suficiente cantidad de polen. El procedimiento se repitió durante los sucesivos días hasta completar la floración (durante 5 a 7 días), luego de lo cual, las inflorescencias se mantuvieron ensobradas hasta la maduración de los granos (Figura 2. 3 b).

En todas las metodologías utilizadas para la evaluación de la producción de semillas (autopolinización, polinización abierta, cruzamientos controlados) se procedió de la misma manera luego de la polinización. Dicho procedimiento consistió en que una vez producida la madurez de los granos, se mantuvieron ensobradas las inflorescencias de 25 a 30 días post-polinización para asegurar que todas las espiguillas hayan tenido la posibilidad de formar semillas, tras lo cual se realizó la cosecha cortando las espigas. Los sobres y su contenido fueron secado en estufa a 37 °C por 48 hs, luego se procedió con el trillado y separación manual de las espiguillas con grano (llenas) de las sin ellos (vacías). Finalmente, se realizó el conteo y la determinación del porcentaje de semillas logradas. La misma se basó en el número total de espiguillas con grano sobre el total de espiguillas polinizadas. Se eliminaron manualmente las glumas y glumelas y las cariósides se sembraron en terrinas con

sustrato estéril, con humedad apropiada, bajo invernáculo. La cantidad de plántulas logradas se utilizó para calcular la eficiencia reproductiva de cada cruzamiento. La eficiencia reproductiva se calculó como porcentaje de plantas logradas del total de espiguillas polinizadas. Detalles de las cariósides y su germinación de las se ilustran en la Figura 2. 4.



**Figura 2. 4. Secuencia desde la obtención de cariósides por cruzamiento controlado entre diferentes genotipos de *Acroceras macrum*, hasta su germinación. a. Escarificado manual, 20-25 días post cruzamiento; se muestra el grano dentro del antecio abierto. b. Cariósida en corte longitudinal, donde puede observarse el embrión desarrollado ocupando aproximadamente un 25 % del grano. c. Cariósida germinada a los 15 días de ser puesta en germinador a 30° C. d. Plántulas de *Acroceras macrum* híbridas obtenidas a los 20 días de sembradas en terrina en invernáculo.**

### **Análisis estadísticos**

Tanto la viabilidad del polen como la producción de semillas en autopolinización y en polinización abierta fueron analizadas mediante un diseño de bloques al azar con dos repeticiones. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2013; Balzarini y col., 2008). Se realizó un ANOVA y separación las medias para cada genotipo dentro del citotipo, así como las medias generales de ambos citotipos se analizaron por el Test de Tukey. También se hizo un análisis de las correlaciones según Pearson entre estas variables.

La producción media de semillas de cada cruzamiento controlado también fue calculada. Los dos tratamientos aplicados en cruzamientos controlados (con y sin emasculación previa) se analizaron por separado y sus medias generales fueron calculadas en cada caso: para cruzamientos homoploides entre tetraploides, cruzamientos homoploides entre hexaploides, y cruzamientos heteroploides. Como los genotipos analizados no fueron los mismos para el ensayo con emasculación y sin emasculación, y además no se realizaron repeticiones, no fue posible hacer una comparación de medias. Se realizó un análisis de la correlación según Pearson entre la producción de semillas de las combinaciones homoploides

tetraploides (con emasculación del progenitor femenino) y las distancias genéticas entre los progenitores obtenidas en el Capítulo 1 (por las dos metodologías utilizadas). Para este último análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2013; Balzarini y col., 2008)

### ***Determinación del origen híbrido de la progenie***

De entre los cruzamientos controlados sin emasculación previa se seleccionaron aquellos que mayor número de plántulas produjeron para evaluar el porcentaje de progenie de origen híbrido. Fue testeada la progenie de cuatro familias, que hicieron un total de 33 plántulas. Las familias evaluadas fueron ( $\text{♀} \times \text{♂}$ ): 20 x 5 (ocho integrantes), 12 x 8 (nueve integrantes), 15 x 4 (siete integrantes) y 11 x 5 (nueve integrantes) (Los resultados del test en la progenie se informan en la Tabla 2. 12). Para que un individuo de la progenie sea corroborado como híbrido se requirió de la amplificación de al menos dos marcadores informativos, este requisito no se cumplió en sólo una de las plántulas que integraban la progenie del cruzamiento 20 x 5 y otra de la progenie del cruzamiento 15 x 4; ambas amplificaron sólo un marcador informativo de los 9 marcadores informativos para la familia 20 x 5 y de los 7 para la familia 15 x 4 (Tabla 2. 11). Del total de la progenie, compuesta de los 33 individuos que en total fueron estudiados, el 93,93 % fueron corroborados como híbridos (Tabla 2. 12).

Tabla 2. 12). Cuando las progenies se encontraban en estado de plántulas, se procedió a la microextracción de los ADN genómicos, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo 1.

Para comprobar que las progenies obtenidas se generaron por hibridación y no por autopolinización o apomixis, se realizó un análisis del origen genético de los descendientes. Para ello, se realizó una prueba de progenies mediante la utilización de “huellas genéticas” (DNA fingerprints), generadas a partir de un número de iniciadores de ISSR suficiente para obtener una adecuada cantidad de marcadores específicos del progenitor masculino. Esta

metodología de análisis permite comprobar si los descendientes de un cruzamiento provienen de los progenitores masculinos utilizados, o de lo contrario, si son el producto de la autofecundación del progenitor femenino o consecuencia de un proceso apomíctico.

Se utilizó un set de 13 iniciadores ISSR (entre cinco y siete por familia) (Los resultados del test en la progenie se informan en la Tabla 2. 12). Para que un individuo de la progenie sea corroborado como híbrido se requirió de la amplificación de al menos dos marcadores informativos, este requisito no se cumplió en sólo una de las plántulas que integraban la progenie del cruzamiento 20 x 5 y otra de la progenie del cruzamiento 15 x 4; ambas amplificaron sólo un marcador informativo de los 9 marcadores informativos para la familia 20 x 5 y de los 7 para la familia 15 x 4 ( Tabla 2. 11). Del total de la progenie, compuesta de los 33 individuos que en total fueron estudiados, el 93,93 % fueron corroborados como híbridos (Tabla 2. 12).

Tabla 2. 12) seleccionados por ser informativos, es decir que, mostraron polimorfismos entre los progenitores femenino y masculino, y a su vez permitieron identificar marcadores específicos del progenitor masculino ausentes en el femenino. La presencia de más de dos marcadores específicos del progenitor masculino en los descendientes se tomó como prueba de que éstos fueron efectivamente generados por hibridación con ese progenitor masculino. La ausencia de marcadores específicos del progenitor masculino en la progenie fue considerada indicio de un origen diferente (autofecundación, polinización con otro genotipo, o apomixis). Las condiciones de amplificación por PCR, resolución en geles por electroforesis, detección de los patrones de amplificación y documentación de los resultados; se realizaron como fue descrito en el Capítulo 1.

## **RESULTADOS**

---

### ***Estudio del origen y las características de los sacos embrionarios***

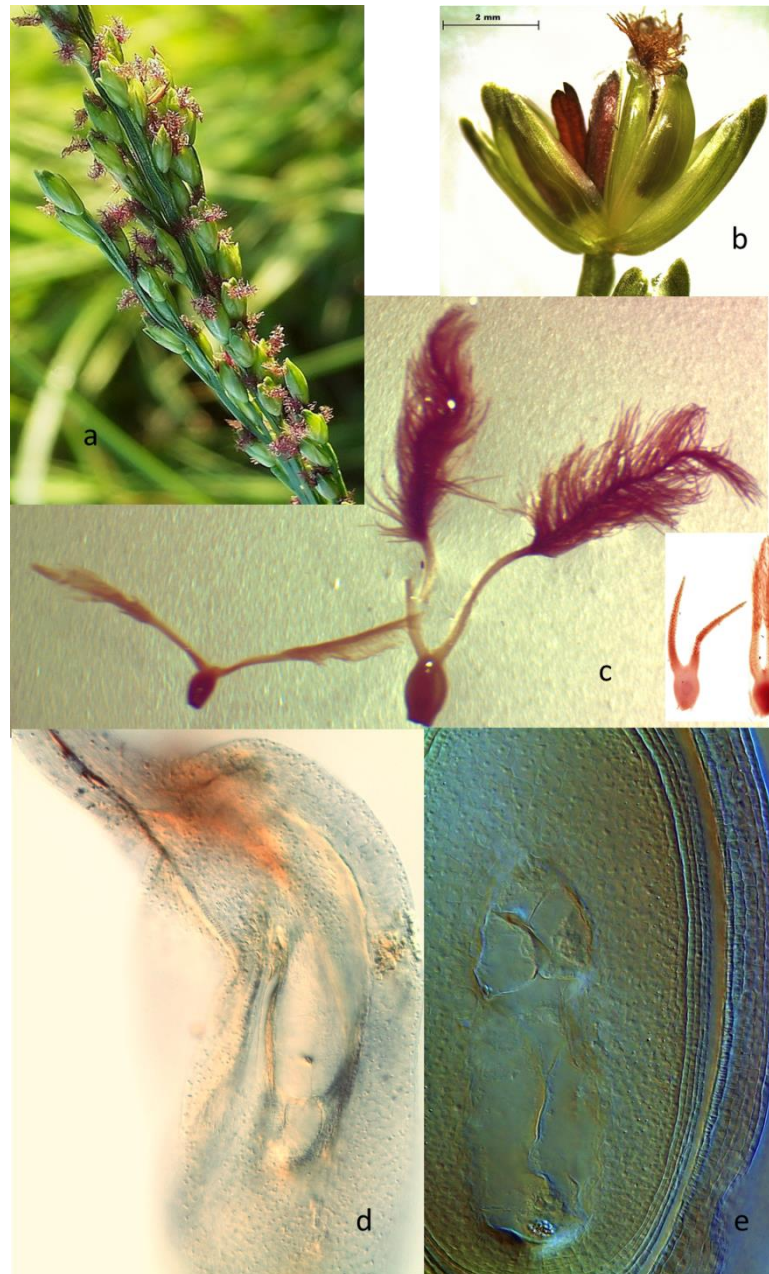
Todos los individuos de *A. macrum* estudiados fueron andromonoicos, con espiguillas bifloras compuestas por una flor bisexual pedicelada y una flor masculina sécil (Figura 2. 5 b). La maduración de las anteras (tres por flor, cada una con dos tecas y de dehiscencia longitudinal) de las flores bisexuales se produjo siempre antes que las de la flor masculina de la misma espiguilla y entre ambas, se observó además, una separación temporal de la antesis, la cual se producía en cada espiguilla primero en la flor bisexual y días después en la flor masculina. La antesis transcurrió durante la mañana (comenzando entre 6:45 a 7:45hs, dependiendo de las condiciones climáticas). Las flores bisexuales fueron las únicas que contenían gineceo, éste estuvo conformado por un ovario globoso, fusiforme, dos estilos cortos y dos estigmas plumosos (Figura 2. 5 c) que durante la antesis, emergieron generalmente después que las anteras de la misma flor, desde pocos minutos hasta horas más tarde (dependiendo de las condiciones ambientales). A su vez, la maduración y abscisión de las cariósides (provenientes exclusivamente de flores bisexuales) comenzó desde el ápice hacia la base de la panícula.

### ***Análisis de la megasporogénesis y la megagametogénesis***

Los 486 pistilos primordiales, provenientes de espiguillas muy jóvenes, y los 666 pistilos maduros, de espiguillas en antesis, fueron sometidos a tratamiento de clarificación (Young y col., 1979) y observados por microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC).

Dentro del ovario (unilocular,) (Figura 2. 5 c) hubo un solo óvulo (Figura 2. 5 d y e). Para analizar la relación temporal existente entre la megasporogénesis y la microesporogénesis se observó estos procesos en ovario y anteras provenientes del mismo antecio. En los ovarios, la célula madre de la megáspora (CMM) ya estaba visible, mientras que los procesos de microsporogenesis y megasporogénesis aún no se iniciaban; y la microsporogénesis concluía en general antes de la meiosis de la CMM.





**Figura 2. 5. Características y desarrollo de los órganos reproductivos femeninos de *Acroceras macrum*. a. Porción de inflorescencia de *acroceras macrum* en antesis. b. Espiguilla, a la derecha la flor masculina (con las anteras en su interior) y a la izquierda la flor bisexual (se observa parte de los estigmas). c. Gineceo (de izquierda a derecha, intermedio-maduro, maduro, muy joven, joven-intermedio). d. Óvulo de un ovario joven en proceso de rotación. e. Óvulo de un ovario maduro con un saco embrionario de tipo *Polygonum*.**

En los primeros estadios, el tejido tegumentario (interno y externo) compuesto de dos capas de células, creció recubriendo el óvulo desde la cálaza hasta formar la micrópila. Este proceso se observó a medida que aparecieron las estructuras características de la megasporogénesis (Figura 2. 6 a-d): desde que el ovario empezó a girar, y continuó durante la aparición de las estructuras de la megagametogénesis (Figura 2. 6 e-g), incluso cuando el

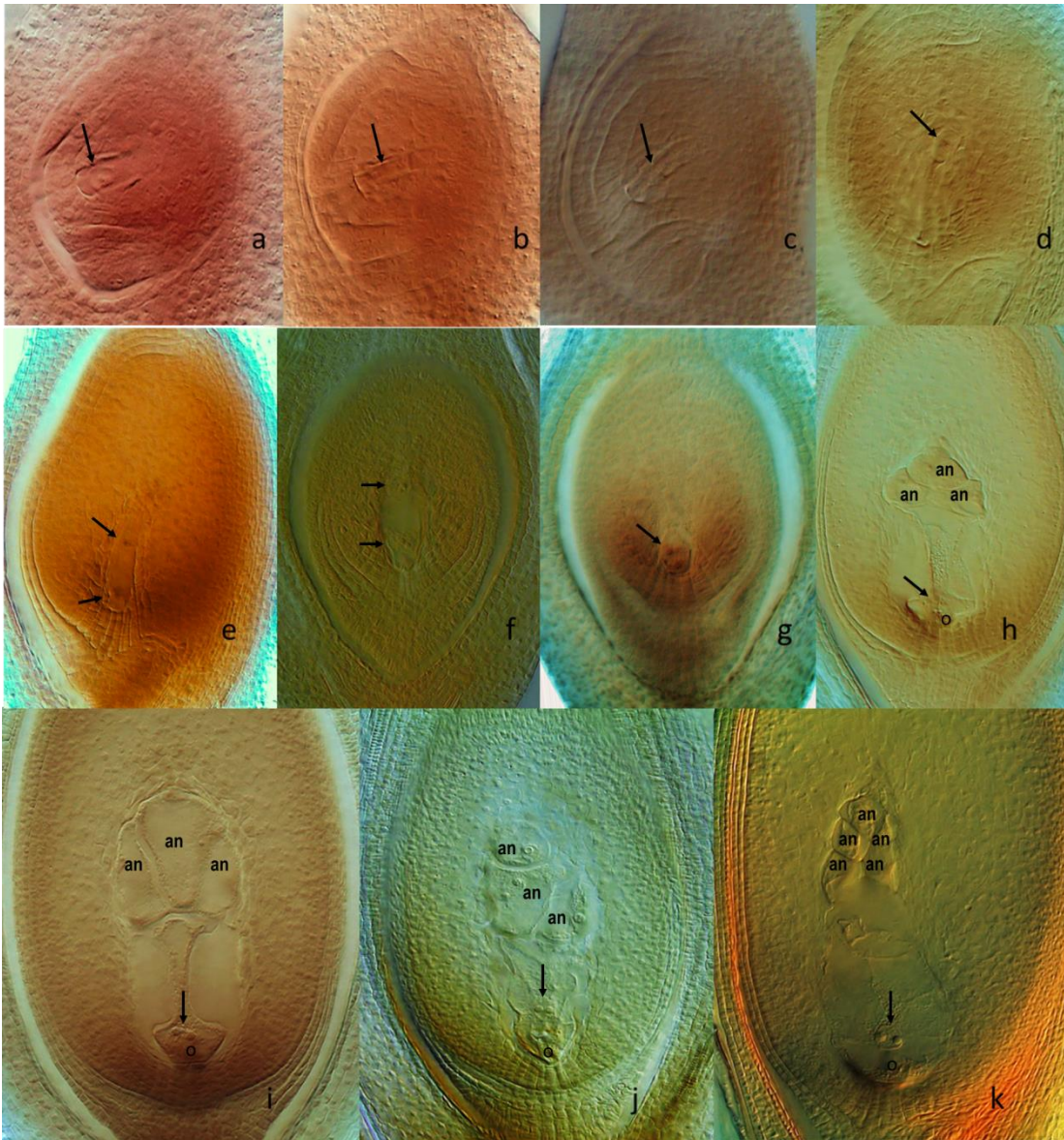
ovario completó su giro (90°); ocurriendo de esta manera tanto en tetraploides (4x) como en hexaploides (6x). Los tejidos tegumentarios estuvieron presentes desde estadíos muy tempranos, de modo que recubrieron de forma casi completa el óvulo cuando comenzó la aparición de las estructuras megasporogénicas.

La CMM se agrandó antes de pasar por el proceso meiótico. Producto de la meiosis de la CMM, se produjeron cuatro megasporocitos que se ubicaron linealmente y fueron avacuolados o poco vacuolados, rectangulares y con un único nucléolo ubicado centralmente hacia el extremo micropilar (Figura 2. 6 b-d). Fue posible observar así mismo, estructuras donde los tres megasporocitos ubicados sobre el extremo orientado hacia la micropila, se habían degradado, mientras que la célula ubicada sobre el extremo orientado hacia la cálaza continuó evolucionando (Figura 2. 6 d). Las estructuras megasporogénicas (arquéspora, célula madre de la macróspora, tétrade de macroesporocitos y macróspora funcional) (Figura 2. 6 a-d) se observaron principalmente desde el inicio del giro del óvulo hasta un giro de aproximadamente 65°.

Las estructuras megagametogénicas (con dos, cuatro y ocho núcleos, producto de la mitosis de la megáspora funcional) se observaron principalmente en la última etapa de la rotación ovárica, desde los 65° hasta alinear completamente el funículo, la micropila y la cálaza (Figura 2. 5 d, Figura 2. 6 e-h). Estas estructuras, se caracterizaron por ser muy vacuoladas y sus nucléolos prominentes evidenciaron la separación nuclear, pero no hubo indicios de citocinesis. La citocinesis (parcial) se evidenció con la organización de un rudimento de saco embrionario del tipo *Polygonum* (dos nucléolos en una célula central cenocítica con contenido granular y muy vacuolada, tres antípodas con vacuolas pequeñas y uninucleoladas hacia la cálaza, ovocélula con contenido granular hacia la micropila) (Figura 2. 6 i).

En estadios de madurez (Figura 2. 5 c), se observó un único megagametófito por óvulo (Figura 2. 5 e). El mismo, consistió en un saco embrionario con grandes antípodas de número variable hacia la cálaza (muy vacuoladas, en ocasiones con más de un nucléolo, y habitualmente con contenido citoplasmático granuloso) (Figura 2. 6 i-k). La célula de mayor tamaño en dicho megagametófito fue la célula central binucleada. Ésta se caracterizó por contener una gran vacuola en posición central y dos núcleos evidenciables por sus voluminosos nucléolos. La ovocélula fue uninucleolada, con contenido citoplasmático granular y poco vacuolada. En la mayoría de los ovarios estudiados, no se pudieron distinguir

las sinérgidas. Los sacos a la madurez tuvieron una estructura del tipo *Poaceae* (Anton y Cocucci, 1984) derivada del *Polygonum*, con un número variable de antípodas en posición cálazal (entre tres y seis) y también variable cantidad de nucléolos por antípoda (Figura 2. 6 i-k). No se observó el crecimiento de células nucelares ni la formación de temprana de proembriones.



Figura

**2. 6. Desarrollo del saco embrionario en ovarios clarificados. a. Célula Madre de la Megáspora (CMM) profásica (flecha). b. Megaesporocitos, producto de la meiosis de la CMM (flecha). c. Degradación de los megaesporocitos micropilares (flecha). d. Megáspora funcional (flecha) y restos megaesporocitos micropilares. e. Estadío binucleado (1er mitosis de la megáspora funcional). f. Estadío tetranucleado (2da mitosis) y polarización de núcleos (flechas). g. Núcleos agrupados en polo microfilar (flecha). h, i, j, k. Sacos embrionarios (flecha: Célula Central Binucleada). h. saco en maduración. i. Saco tipo *Polygonum*\*. j. Proliferación nuclear de las antípodas\*. k. Saco tipo *Poaceae*, con cinco antípodas\*. \*an: antípodas; o:ovocélula.**

Un 9 % de los pistilos analizados no presentaron indicios de haber iniciado el proceso de megasporogénesis, o abortaron prematuramente este proceso. Un 10 % presentó evidencias de que se abortó el proceso generativo del gametófito femenino. El 91 % restante presentó algún tipo de proliferación que indicó que el proceso de formación de la gameta se había al menos iniciado. Los porcentajes de abortos de tetraploides (en un rango entre 0 y 13 %) fueron significativamente menores que los de los hexaploides (rango entre 21 y 22 %) (Tabla 2. 3). Se estudiaron los ovarios de un grupo de diferentes genotipos  $4x$  que habían rotado menos de  $45^\circ$ , la mayor parte de ellos, estaban en un punto intermedio entre la diferenciación de la arqueospora y la meiosis de la CMM (Figura 2. 6 a). El porcentaje de ovarios en los que se observó la arqueospora o la CMM y el porcentaje de ovarios que presentaron evidencia de la reciente meiosis de la CMM (cuatro megasporocitos, o megáspora funcional y restos de los megasporocitos que degeneraron) presentaron diferencias significativas entre genotipos  $4x$ , sin embargo no hubo diferencias significativas entre los dos genotipos hexaploides estudiados (Tabla 2. 3). También se estudiaron ovarios con una rotación más avanzada (entre  $45$  y  $90^\circ$ ) para el mismo grupo de genotipos  $4x$  y  $6x$  y en esos casos predominaron estructuras correspondientes a la megagametogénesis (principalmente citogametófitos con 2 a 8 núcleos y pequeños sacos inmaduros). Se encontraron diferencias entre citotipos (e intracitotipo) para el porcentaje de ovarios que presentaron evidencia de una meiosis de la CMM reciente o detenida y también se encontró una diferencia intercitotipo para el porcentaje en estadio de cuatro a ocho núcleos (Tabla 2. 3). El porcentaje medio de ovarios tetraploides que habiendo superado los  $45^\circ$  de rotación se encontraban en el estadio de meiosis de la CMM, fue menor que en el caso de los hexaploides; y por el contrario el porcentaje medio de  $4x$  que avanzaron hasta una estructura de un citogametófito con dos a cuatro células fue mayor que el de los  $6x$ . Otra característica que presentó importante variación (intracitotipo  $4x$ ), fue el porcentaje de ovarios con un pequeño saco embrionario en crecimiento.

**Tabla 2. 3. Análisis de megasporogénesis y megagametogénesis en ovarios de *Acrocera macrum* en estadios tempranos de maduración, para diferentes rangos de rotación del ovario.**

GENOTIPO	NIVEL DE PLOIDÍA	N° OVARIOS	ABORTADOS (%)	SIN ESTRUCTURAS GAMETOGÉNICAS (%)	N° OVARIOS CON ESTRUCTURAS	ROTACIÓN 0° - 45°				ROTACIÓN 45° - 85°					
						N° OVARIOS	ARQ/ CMM (%)	4 MESP/ MESP FUNCIONAL (%)	2-8 NÚCLEOS (%)	SACOS (%)	N° OVARIOS	ARQ/ CMM (%)	4 MESP/ MESP FUNCIONAL (%)	2-8 NÚCLEOS (%)	SACOS (%)
6	4x	84	10 <sup>ab</sup>	8 <sup>a</sup>	69	42	67 <sup>bc</sup>	28 <sup>abc</sup>	5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	27	5 <sup>b</sup>	48 <sup>ab</sup>	45 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>
7	4x	82	13 <sup>ab</sup>	7 <sup>a</sup>	66	31	55 <sup>bc</sup>	45 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	35	25 <sup>ab</sup>	18 <sup>bc</sup>	45 <sup>a</sup>	12 <sup>bc</sup>
9	4x	36	0 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	34	18	88 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	16	0 <sup>b</sup>	56 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>	6 <sup>c</sup>
13	4x	48	10 <sup>ab</sup>	12 <sup>a</sup>	37	19	53 <sup>bc</sup>	43 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	18	0 <sup>b</sup>	8 <sup>c</sup>	39 <sup>a</sup>	53 <sup>a</sup>
15	4x	90	4 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	77	51	87 <sup>ab</sup>	11 <sup>bc</sup>	2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	26	6 <sup>b</sup>	6 <sup>c</sup>	50 <sup>a</sup>	38 <sup>ab</sup>
22	4x	55	2 <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup>	48	31	62 <sup>bc</sup>	38 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	17	53 <sup>a</sup>	25 <sup>bc</sup>	22 <sup>ab</sup>	0 <sup>c</sup>
26	6x	38	21 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	25	12	64 <sup>c</sup>	25 <sup>abc</sup>	9 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	13	28 <sup>ab</sup>	58 <sup>a</sup>	4 <sup>c</sup>	10 <sup>bc</sup>
27	6x	61	22 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	41	22	66 <sup>c</sup>	24 <sup>abc</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	19	15 <sup>b</sup>	29 <sup>bc</sup>	16 <sup>bc</sup>	40 <sup>ab</sup>
<b>General</b>		<b>523</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>397</b>	<b>226</b>	<b>68</b>	<b>28</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>171</b>	<b>18</b>	<b>22</b>	<b>36</b>	<b>24</b>
<b>4x</b>		395	8 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>	331	92	69 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	139	17 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	42 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
<b>6x</b>		101	22 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	66	34	65 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	32	20 <sup>a</sup>	41 <sup>a</sup>	11 <sup>b</sup>	28 <sup>a</sup>

**Arq:** arquéspora. **CMM:** célula madre de la megáspora. **Mesp:** megasporocitos. **Mesp. Funcional:** megáspora funcional. Letras diferentes indican diferencias significativas, según el test de Tuckey.

El resultado del análisis de las gametas femeninas adultas de *Acrocera macrum* figura en la Tabla 2. 4. Tanto el número de antípodas por saco embrionario, como el porcentaje de ovarios que abortaron o se detuvieron en algún punto la maduración del mismo, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos observados. El número de antípodas en el saco maduro varió de tres a seis, con un promedio general de 3,6. De entre los genotipos estudiados, el mayor número de antípodas se encontró en el tetraploide #22, con un promedio de 4,5 antípodas; mientras que el 4x #9 mantuvo su promedio de antípodas por saco cercano al número del tipo *Polygonum* (tres) y estadísticamente inferior al promedio del resto de los genotipos estudiados. Al comparar las medias generales del número de antípodas, no hubo diferencias significativas entre tetraploides y hexaploides, sin embargo tanto el porcentaje general de abortos como el de óvulos inmaduros dentro de un gineceo maduro de una flor en anthesis (detenciones en el desarrollo) fueron significativamente superiores en los hexaploides respecto de los tetraploides. Sumando el porcentaje de abortos y de sacos inmaduros (Tabla 2. 4), un 15 % de los tetraploides estudiados y un 51 % de los hexaploides estudiados no presentaban una gameta totalmente desarrollada al momento de la

antesis. Así, los porcentajes de abortos variaron entre un 0 % y un 27 % en los 4x, frente a una variación entre un 25 % y un 40 % observada en los 6x, y los porcentajes de detenciones en el desarrollo en los 4x fueron muy bajas (1 % en promedio), mientras que en los 6x fueron de un 19 % (Tabla 2. 4). La Tabla 2. 4a tendencia abortiva se hizo más evidente en estos estadios más avanzados, si se compara con la observada en los primeros estadios que se resumen en la Tabla 2. 3.

**Tabla 2. 4. Características de sacos embrionarios maduros de *Acrocera macrum*, en pistilos recolectados durante la antesis. Se indica la media por genotipo, citotipo y la media general.**

GENOTIPO	NIVEL DE PLOIDÍA	OVARIOS ANALIZADOS	Nº ANTÍPODAS	PORCENTAJE DE ABORTOS	PORCENTAJE DETENIDOS (INMADUROS)
<b>1</b>	4x	17	3,5 <sup>bc</sup>	24 <sup>abc</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>6</b>	4x	100	3,6 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>	4 <sup>ab</sup>
<b>7</b>	4x	80	3,3 <sup>bc</sup>	33 <sup>ab</sup>	6 <sup>ab</sup>
<b>9</b>	4x	66	3,1 <sup>c</sup>	15 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>13</b>	4x	103	3,7 <sup>b</sup>	27 <sup>abc</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>15</b>	4x	39	3,6 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>17</b>	4x	30	3,6 <sup>b</sup>	13 <sup>bc</sup>	4 <sup>ab</sup>
<b>22</b>	4x	44	4,5 <sup>a</sup>	14 <sup>bc</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>26</b>	6x	82	3,7 <sup>b</sup>	40 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>
<b>27</b>	6x	105	3,5 <sup>bc</sup>	25 <sup>abc</sup>	19 <sup>a</sup>
	<b>General</b>	666	3,6	19	6
	<b>4x</b>	479	3,6 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
	<b>6x</b>	187	3,6 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>

Diferencias significativas se indican con letras diferentes.

### *Estudio de la microesporogénesis*

El resultado del análisis de las asociaciones cromosómicas observadas durante la diacinesis y prometafase de la Meiosis I se resume en la Tabla 2. 5. El arreglo más frecuente de los 36 cromosomas del citotipo tetraploide fue en 18 asociaciones bivalentes (Figura 2. 7a y b), y aunque en menor proporción, también frecuentemente se observaron 16 asociaciones bivalentes y una cuadrivalente o 14 bivalentes y 2 cuadrivalentes. Fue raro observar cromosomas desapareados o en asociaciones trivalentes y no se observaron asociaciones de más de cuatro cromosomas, sin embargo en varias de las células en diacinesis o prometafase se pudo apreciar la presencia de un cromosoma supernumerario, más pequeño que algunas veces parecía unido a alguno de los grupos de cromosomas comunes (Figura 2. 7a y c). En los preparados observados, la mayoría de las células se hallaban en la última etapa de la profase I (diacinesis) (Figura 2. 7a-c), aunque se observaron algunas CMP profásicas que no lograron organizar sus cromosomas (Figura 2. 7j). En el 47,5 % de las células observadas que se

hallaban en un estado desde metafase I hasta telofase II hubo entre 1 y 5 asociaciones cromosómicas bivalentes rezagadas o mal orientadas en el plano ecuatorial (Figura 2. 7h-i) y algunas contenían micronúcleos (Figura 2. 7k). Es posible que la proporción de aberraciones meióticas sea variable entre los genotipos que integran el citotipo, pero no se comprobó este hecho.

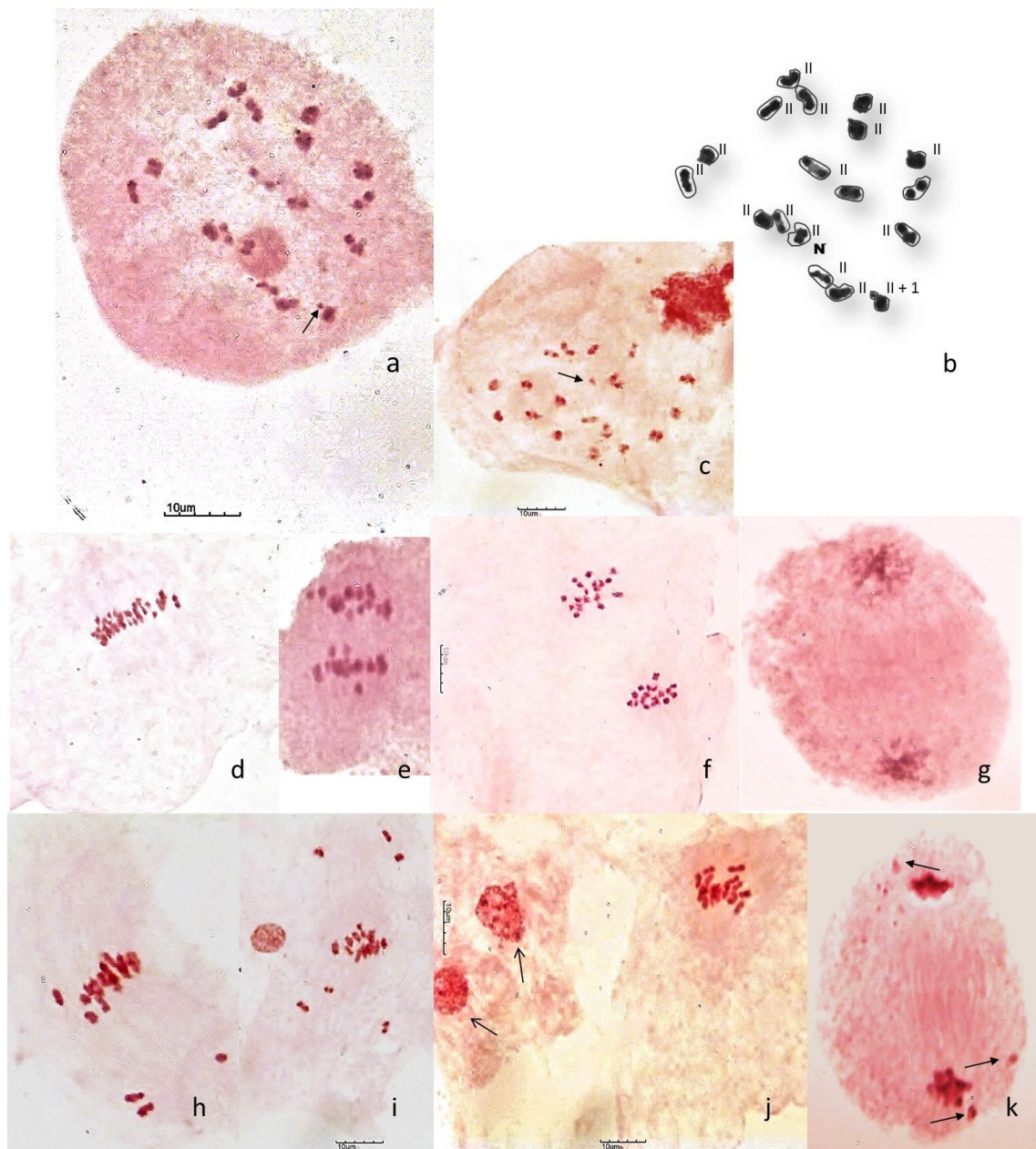
En el citotipo hexaploide predominaron las asociaciones bivalentes (entre 0 y 6), trivalentes (entre 8 y 18) y hexavalentes (entre 0 y 4), con menor cantidad de univalentes, tetravalentes y pentavalentes (Tabla 2. 5), en la Figura 2. 8a y b puede observarse un ejemplo de las asociaciones cromosómicas durante la diacinesis. Muchas de las células en profase I no lograron organizar por completo sus cromosomas, incluso cuando la membrana nuclear había desaparecido por completo (Figura 2. 8c). Adicionalmente, se encontraron anomalías en un 78,1 % de las células desde un estado de metafase I hasta telofase II; las más habituales fueron la presencia de cromosomas mal orientados, rezagados o fuera del plano ecuatorial durante la metafase y la adhesión o migración precoz de cromosomas en anafase (Figura 2. 8d-f), entre otras anomalías observadas se incluyeron la diferencia de tamaño entre diadas resultantes de la meiosis I, desfase de etapas meióticas en diadas hermanas durante la meiosis II, microesporocitos post meióticos de diferentes tamaños, y micronúcleos.

Si bien no se analizó la microgametogénesis, no se encontró ninguna desviación de este proceso del patrón conocido para los miembros de *Poaceae* (Bedinger, 1992). Así se observaron microsporas expandidas (a comparación de las que conformaban las tétrades) y esféricas, con un núcleo central grande que empezaron a desarrollar su pared de calosa. También se observaron microgametocitos, con pared más desarrollada, en alguna etapa mitótica; a su vez, en otros se observaron núcleos una posición periférica opuesta al poro, creándose una asimetría del contenido celular (Figura 2. 8j-m).

**Tabla 2. 5. Arreglos cromosómicos observados en el citotipo tetraploide (4x) y el hexaploide (6x) de una colección de *Acroceras macrum*.**

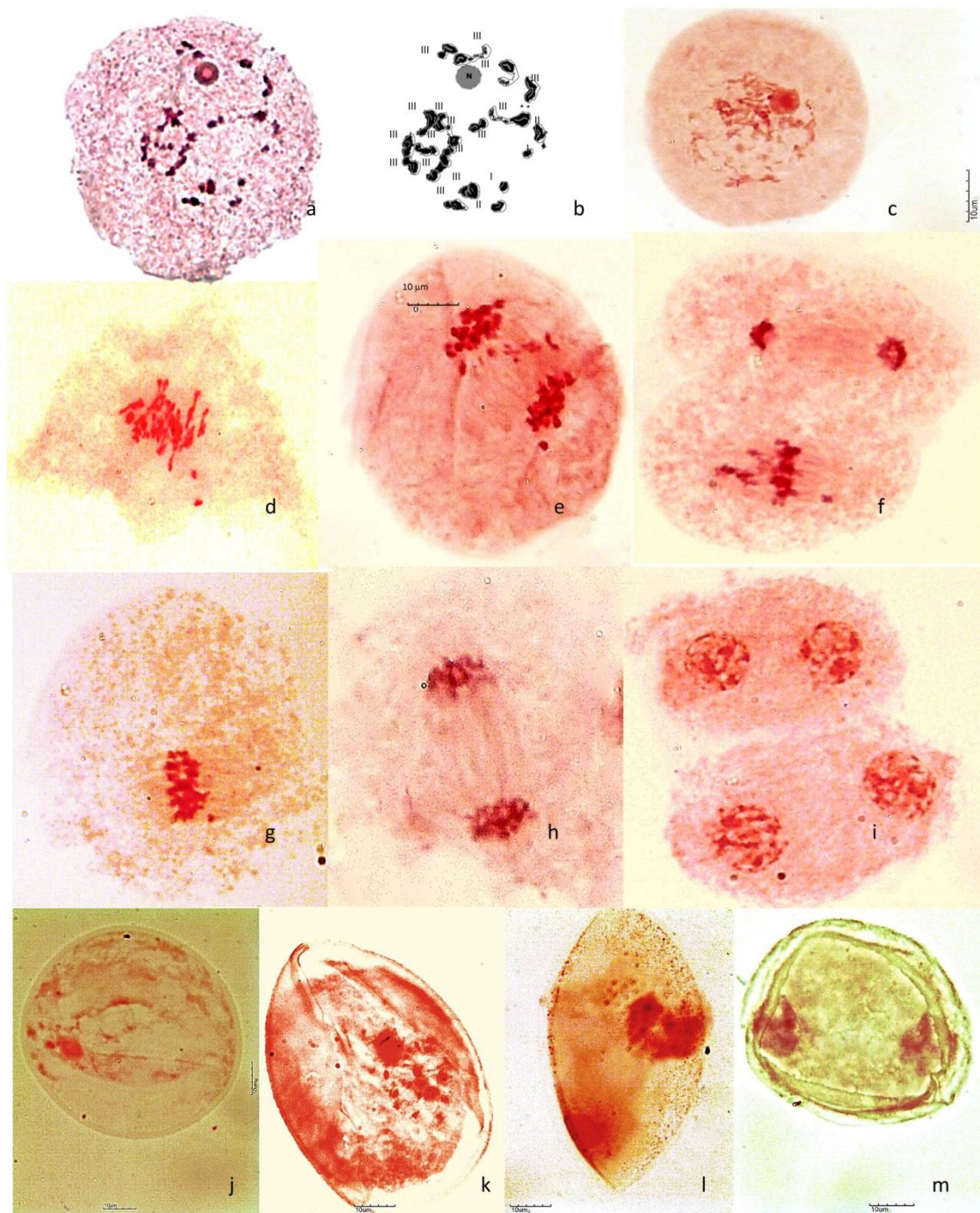
NIVEL DE PLOIDÍA	Nº CÉLULAS ANALIZADAS		I	II	III	IV	V	VI	I: univ alen te. II: biva lente . III: triva
4x	65	MEDIA RANGO	0,17 (0-2)	16,09 (12-18)	0,11 (0-1)	0,83 (0-3)	0	0	
6x	30	MEDIA RANGO	0,30 (0-3)	2,20 (0-6)	13,26 (8-18)	0,27 (0-2)	0,33 (0-1)	1,13 (0-4)	

lente. IV: tetravalente. V: pentavalente. VI: hexavalente.



**Figura 2. 7. Microesporogénesis del citotipo tetraploide ( $2n = 4x = 36$  cromosomas) de *Acroceras macrum*. a-c. Célula madre del polen (CMP) mostrando agrupaciones cromosómicas. a. CMP en diacinesis. b. Copia esquemática de las agrupaciones\* observadas en (a). c. CMP en prometáfase, la flecha señala un cromosoma supernumerario. d-g. Estados meióticos transcurriendo normalmente. d. Metafase I. e y f. Anafase I, en e se cuentan 18 cromosomas en cada polo. g. Telofase I. h-k. Anormalidades meióticas. h. CMP en metafase I con bivalentes muy rezagados. i. CMP en anafase I mostrando dificultad en la disyunción con bivalentes adelantados. j. Material genético plegado como cromatina, en el núcleo de las CMP que no pudieron organizarse en la etapa de la profase (flechas). k. Micronúcleos (flechas) en una telofase. \*En (b): II: bivalente. La barra indica 10  $\mu$ m.**

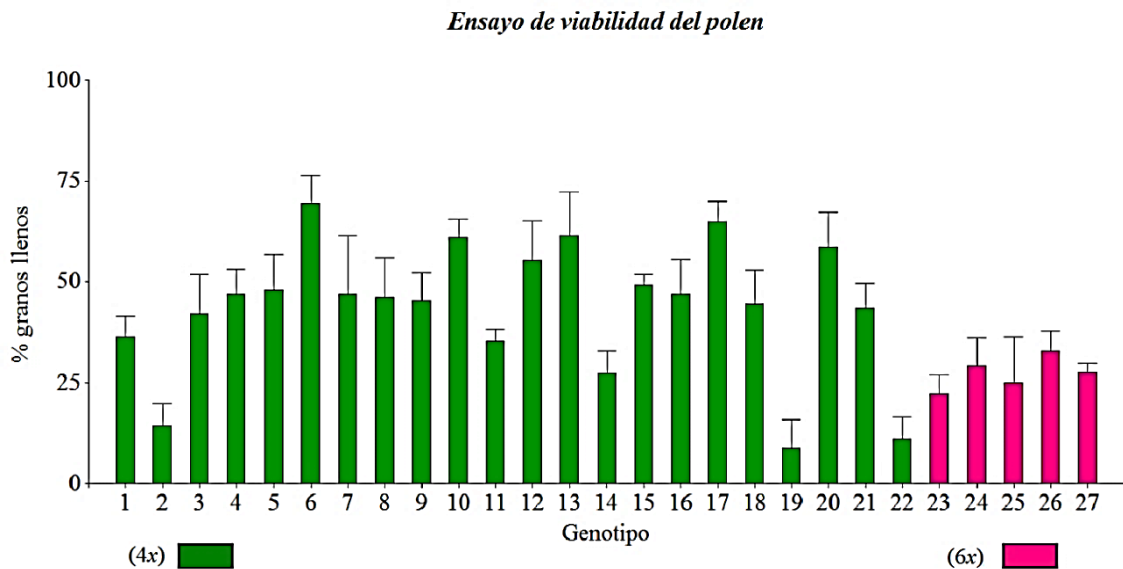




**Figura 2. 8. Microesporogénesis del citotipo hexaploide ( $2n = 6x = 54$  cromosomas) de *Acroceras macrum*. a y b. Célula madre del polen (CMP) en diacinesis con varios tipos de agrupaciones cromosómicas. b. copia esquemática de las agrupaciones observadas en a. c-f. Anormalidades meióticas\*. c. CMP profásica con cromosomas no organizados por completo a pesar de la desaparición del núcleo. d. CMP en anafase I con dificultades para la disyunción cromosómica: univalentes migrando hacia uno de los polos mientras el resto de los cromosomas se retarda en el plano ecuatorial con problemas de orientación y adhesión entre ellos. e. CMP en anafase I con cromosomas rezagados. f. Díadas desincronizadas, una se encuentra en metafase II con varios cromosomas rezagados y la otra se encuentra al final de la anafase II. g-i. Estados meióticos transcurriendo normalmente. g. Metafase I. h. Anafase I. i. telofase II. j-m. Microgametogénesis. En (b)\*: I: univalente, II: bivalente, III: trivalente. La barra indica 10  $\mu$ m.**

### *Análisis de la viabilidad de polen*

Los porcentajes de viabilidad de polen se exponen en la Tabla 2. 6. Se observó una amplia variación general (CV de 38,34 %), con diferencias altamente significativas ( $p$  valor  $<0,001$ ) intra e intercitotipo. El valor medio del porcentaje de granos de polen viables para la colección fue de 40,8 %. El citotipo tetraploide, presentó valores de viabilidad de polen en el rango de 8,9 % a 69,6 % y una media de 43,3 %, el extremo superior estuvo representado por el genotipo 6 y el inferior por el #19 (Figura 2. 9, Tabla 2. 6). El citotipo hexaploide presentó valores de viabilidad de polen en el rango de 22,3 % a 32,9 % y una media de 26,2 %, el extremo superior estuvo representado por el genotipo 26 y el inferior por el #23 (Figura 2. 9, Tabla 2. 6). Los genotipos 4x #19 y 22 y los 6x #24, 25, 26 y 27, presentaron porcentajes de viabilidad de polen inferiores al 25 %. Los genotipos tetraploides #6, 10, 12, 13, 17 y 20 superaron el 50 % (Figura 2. 9, Tabla 2. 6).



**Figura 2. 9. Porcentaje de granos de polen viables para 27 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

Por otra parte, se observó una gran variación en el tamaño de los granos de polen, principalmente dentro de los genotipos 6x.

### *Determinación del sistema de polinización y de la fertilidad*

La producción de semillas presentó marcadas diferencias según el sistema de polinización considerado. En autopolinización no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos, ya sean estos tetraploides o hexaploides, sin embargo al considerar sólo

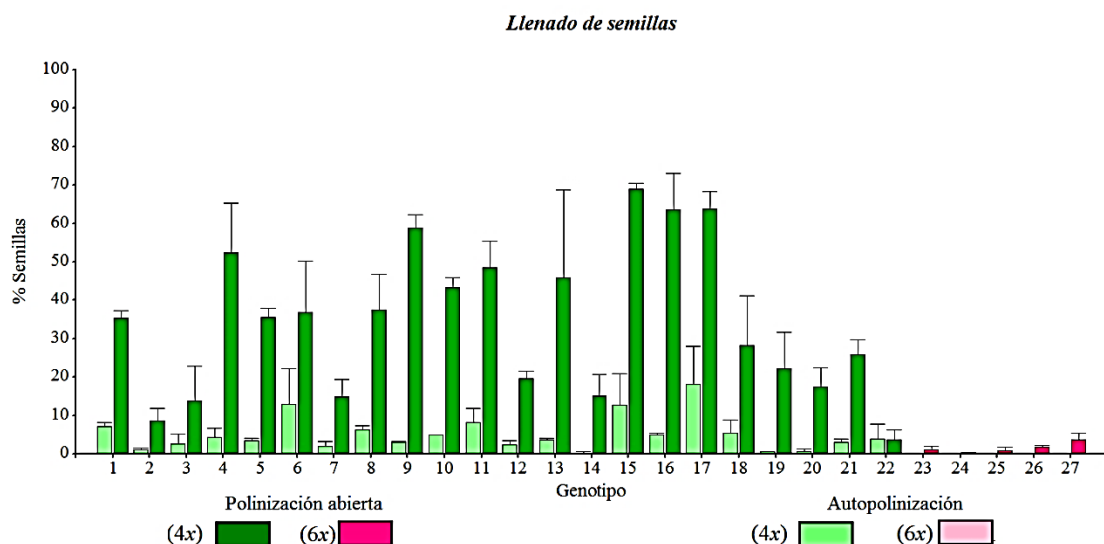
el nivel de ploidía, el citotipo tetraploide presentó porcentajes de llenado de semilla significativamente superiores que los observados en el citotipo hexaploide ( $p$  valor de 0,0090) con valores en un rango de 0,3 % a 18 % y una media de 5 % frente a la nula producción de semillas llenas observada en todo el citotipo 6x (Tabla 2. 6).

**Tabla 2. 6. Porcentajes de granos de polen viable y semillas producidas, en condiciones de autopolinización y de polinización abierta, para una colección de 27 genotipos de *Acroceras macrum*, tetraploides (4x) y hexaploides (6x).**

GENOTIPO	% GRANOS POLEN VIABLES	% SEMILLAS AUTO-POLINIZACIÓN	% SEMILLAS POLINIZACIÓN ABIERTA
1	36,4 <sup>abcde</sup>	7,1 <sup>a</sup>	35,3 <sup>abcdefg</sup>
2	14,3 <sup>cde</sup>	1,0 <sup>a</sup>	8,6 <sup>defg</sup>
3	42,1 <sup>abcde</sup>	2,5 <sup>a</sup>	13,9 <sup>defg</sup>
4	47,1 <sup>abcde</sup>	4,3	52,4 <sup>abcd</sup>
5	48,2 <sup>abcde</sup>	3,3 <sup>a</sup>	35,6 <sup>abcdefg</sup>
6	69,6 <sup>a</sup>	13,0 <sup>a</sup>	36,8 <sup>abcdefg</sup>
7	47,0 <sup>abcde</sup>	1,9 <sup>a</sup>	14,9 <sup>cdefg</sup>
8	46,2 <sup>abcde</sup>	6,1 <sup>a</sup>	37,5 <sup>abcdefg</sup>
9	45,4 <sup>abcde</sup>	3,1 <sup>a</sup>	58,7 <sup>abc</sup>
10	61,1 <sup>ab</sup>	4,9 <sup>a</sup>	43,3 <sup>abcdefg</sup>
11	35,4 <sup>abcde</sup>	8,1 <sup>a</sup>	48,4 <sup>abcde</sup>
12	55,3 <sup>abcd</sup>	2,4 <sup>a</sup>	19,5 <sup>bcdefg</sup>
13	61,5 <sup>ab</sup>	3,6 <sup>a</sup>	45,8 <sup>abcdef</sup>
14	27,3 <sup>abcde</sup>	0,3 <sup>a</sup>	15,0 <sup>cdefg</sup>
15	49,2 <sup>abcde</sup>	12,8 <sup>a</sup>	69,0 <sup>a</sup>
16	47,0 <sup>abcde</sup>	4,8 <sup>a</sup>	63,6 <sup>ab</sup>
17	64,9 <sup>ab</sup>	18,0 <sup>a</sup>	63,9 <sup>ab</sup>
18	44,6 <sup>abcde</sup>	5,4 <sup>a</sup>	28,2 <sup>abcdefg</sup>
19	8,9 <sup>e</sup>	0,6 <sup>a</sup>	22,2 <sup>bcdefg</sup>
20	58,7 <sup>abc</sup>	0,7 <sup>a</sup>	17,4 <sup>cdefg</sup>
21	43,4 <sup>abcde</sup>	3,1 <sup>a</sup>	25,9 <sup>abcdefg</sup>
22	11,1 <sup>de</sup>	3,8 <sup>a</sup>	3,7 <sup>efg</sup>
23	22,3 <sup>bcde</sup>	0,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>g</sup>
24	29,3 <sup>abcde</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,2 <sup>g</sup>
25	25,0 <sup>abcde</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,8 <sup>g</sup>
26	32,9 <sup>abcde</sup>	0,0 <sup>a</sup>	1,7 <sup>fg</sup>
27	27,7 <sup>abcde</sup>	0,0 <sup>a</sup>	3,7 <sup>fg</sup>
<b>MEDIA</b>	40,8	4,0	28,1
<b>CV*</b>	38,3	117,2	38,3
<b>RANGO</b>	(8,9-69,5)	(0,0-18,0)	(0,2-69,0)
<b>MEDIA 4X</b>	43,3 <sup>a</sup>	5,1 <sup>a</sup>	34,5 <sup>a</sup>
<b>RANGO 4X</b>	(8,9-69,6)	(0,3-18)	(3,7-69,0)
<b>MEDIA 6X</b>	26,2 <sup>b</sup>	0,0 <sup>b</sup>	1,5 <sup>b</sup>
<b>RANGO 6X</b>	(22,3-32,9)	-	(0,2-3,7)

**\*CV: coeficiente de variación. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tuckey.**

Hubo tres genotipos 4x (6, 15 y 17) que mostraron valores superiores al 10 % de producción de semillas en autopolinización (Figura 2. 10, Tabla 2. 6). En polinización abierta hubo diferencias significativas en la producción de semillas entre genotipos y además, el citotipo tetraploide presentó porcentajes de llenado de semilla significativamente superiores que los observados para el citotipo hexaploide ( $p$  valor de  $<0,0001$ ) con valores en un rango de 3,7 % a 69 % y una media de 34,5 % frente al rango de 0,2 % a 3,7 % y el valor medio de 1,5 % para la producción de semillas llenas observada en el citotipo 6x (Figura 2. 10, Tabla 2. 6). El 63,6 % de los genotipos tetraploides (1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 21) supera el 25 % de producción de semillas en polinización abierta y para cinco genotipos 4x (4, 9, 15, 16 y 17) se observaron porcentajes superiores al 50 % (Figura 2. 10, Tabla 2. 6).



**Figura 2. 10. Variación en la producción de semillas, a finales del verano 2013, para 27 genotipos de *Acroceras macrum*. Las barras en color verde representan a los genotipos 4x y en color rosado a los 6x. Los tonos más oscuros representan los porcentajes obtenidos en polinización abierta y los más claros en autopolinización. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

La producción de semillas en autopolinización presentó una correlación positiva y altamente significativa con la producción de semillas en polinización abierta. El valor del coeficiente de Pearson fue de 0,47 (Tabla 2. 7). La viabilidad de los granos de polen presentó una correlación positiva altamente significativa con la producción de semillas en autopolinización (coeficiente de Pearson=0,46) y con la producción de semillas en polinización abierta (coeficiente de Pearson=0,51) (Tabla 2. 7). La variable porcentaje de anthesis (informado en el Capítulo 1), presentó una correlación altamente significativa con el

porcentaje de polen viable (coeficiente de Pearson=0,34) y con el porcentaje de semillas producidas en polinización abierta (coeficiente de Pearson=0,51) (Tabla 2. 7).

**Tabla 2. 7. Correlaciones según Pearson de algunas características relacionadas a la fertilidad de 27 genotipos de *A. macrum*.**

	% GRANOS VIABLES	% SEMILLAS AUTOPOLINIZACIÓN (AP)	% SEMILLAS POLINIZACIÓN ABIERTA (PA)	% ESPIGUILLAS ABIERTAS
% GRANOS VIABLES	1			
% SEMILLAS AP	0,46**	1		
% SEMILLAS PA	0,51**	0,47**	1	
% ESPIGUILLAS ABIERTAS	0,34**	N/S	0,51**	1

N/S: *p*-valor mayor a 0,05. \*\*: *p*-valor menor o igual a 0,01. El porcentaje de antesis fue estudiado y discutido en el Capítulo 1.

### *Producción de semillas por cruzamientos controlados*

El rango de variación de la producción de semillas fue similar para ambas metodologías utilizadas para evaluar la producción de semillas mediante cruzamientos controlados (0 a 32,8 % en el ensayo con emasculación y 0 a 39,5 % en el ensayo sin emasculación) en las 37 combinaciones ensayadas (Tabla 2. 8). La media general para los cruzamientos homoploides entre tetraploides también fue similar al comparar ambos tratamientos. La producción de semillas para los cruzamientos heteroploides resultó nula al emasculación previamente pero aunque en baja cantidad, produjo semillas en el tratamiento sin emasculación (Tabla 2. 8) y esa cantidad fue comparable a la producción del progenitor femenino en autopolinización (Tabla 2. 6). Los valores medios, según el tipo de cruzamiento, presentaron diferencias significativas según el test de LSD-Fisher. Por otro lado, los valores medios de los distintos tipos de cruzamientos fueron en general significativamente mayores para los cruzamientos homoploides entre tetraploides, respecto a los heteroploides con madre tetraploide y padre hexaploide y a todos los cruzamientos que involucraron madres hexaploides (Tabla 2. 8). La eficiencia reproductiva estuvo relacionada con el porcentaje de semilla producida, pero no en todos los casos tuvieron valores coincidentes, resultando en todos los casos igual o menor a la producción de semillas (Tabla 2. 8). Se obtuvieron en total 236 cariósides a partir de 1700 espiguillas polinizadas, de las cuales 173 (73 %) germinaron produciendo plántulas; esto resultó en una eficiencia reproductiva general del 10,2 % (Tabla 2. 8). El rango de variación de la eficiencia reproductiva de los cruzamientos analizados estuvo entre 0 % y 34,2 %, encontrándose 8 cruzamientos donde no germinó ninguna de las cariósides y otros 2 donde la única cariósida obtenida no germinó (Tabla 2. 8). El mejor de

los casos fue el cruzamiento 12 x 8 que de las 76 espiguillas polinizadas resultaron en 27 semillas (de las cuales 26 generaron plántulas) (Tabla 2. 8). El mayor número de plántulas obtenidas por cruzamiento fueron 29 generadas a partir de 37 semillas resultantes del cruzamiento 9 x 16 (134 espiguillas polinizadas) (Tabla 2. 8). Porcentajes del 100 % de la germinación se obtuvieron en los cruzamientos 17 x 1, 13 x 4 y 10 x 1 pero los números de semillas (y plántulas) fueron bajos (5, 2, y 1, respectivamente) (Tabla 2. 8). El porcentaje promedio de carióspsides germinadas fue de 75,3 % para los cruzamientos previa emasculación y de 70,8 % para los sin emasculación (Tabla 2. 8).

**Tabla 2. 8. Combinaciones genotípicas para la evaluación de la producción de semillas de *Acroceras macrum* en cruzamientos controlados.**

	CRUZAMIENTOS C/ E ♀x♂	% DE SEMILLAS	ER (%)	CRUZAMIENTOS S/ E ♀x♂	% DE SEMILLAS	ER (%)
<b>HOMOPLOIDES TETRAPLOIDES</b>	1 x 16	32,8	22,4	2 x 3	9,1	0
	3 x 16	23,5	17,6	4 x 9	4,3	0
	6 x 1	6,4	2,1	5 x 13	2,9	0
	6 x 17	15,6	8,7	11 x 5	14,4	6,1
	8 x 1	0,8	0	12 x 2	22,6	0
	8 x 3	4,3	2,8	12 x 8	39,5	34,2
	9 x 16	28,3	21,6	14 x 6	0	0
	10 x 1	2,7	2,7	14 x 8	17,8	0
	13 x 4	4,4	4,4	15 x 4	12,8	7,4
	16 x 4	8,5	6,8	20 x 5	25,8	21,2
	17 x 1	13,3	11,1	<b>MEDIA 4x-4x</b>	<b>14,9 (S/E)</b>	
	18 x 17	27,0	22,5			
	21 x 13	29,4	20,6			
<b>MEDIA 4x-4x</b>	<b>15,2 (C/E)</b>					
<b>HOMOPLOIDES HEXAPLOIDES</b>				25 x 26	0	
				26 x 27	0	
				<b>MEDIA 6x-6x</b>	<b>0 (S/E)</b>	
<b>HETEROPLOIDES</b>	9 x 23	0		4 x 24	1,2	1,2
	27 x 13	0		4 x 25	10,5	7,0
	<b>MEDIA heteroploide</b>	<b>0 (C/E)</b>		5 x 24	2,4	0,5
				22 x 24	5,4	0
				23 x 5	0	
				23 x 7	0	
				24 x 3	0	
				25 x 8	0	
				25 x 9	0	
				27 x 1	0	
			<b>MEDIA heteroploide</b>	<b>1,9 (S/E)</b>		
	<b>MEDIA 4X-4X</b>			15,1 <sup>a</sup>		
	<b>MEDIA 4X-6X</b>			3,9 <sup>b</sup>		
	<b>MEDIA 6X-4X</b>			0,0 <sup>b</sup>		
	<b>MEDIA 6X-6X</b>			0,0 <sup>b</sup>		

C/E: con previa emasculación. S/E: sin emasculación. ER: eficiencia reproductiva (100 x plantas logradas/espiguillas polinizadas). Letras distintas indican diferencias significativas en las medias, según el test LSD-Fisher.

**Tabla 2. 9. Medias de producción de semillas de los genotipos de *Acroceras macrum* como progenitor masculino o femenino, para distintas combinaciones de cruzamientos controlados.**

<b>PROGENITOR (GENOTIPO)</b>	<b>FEMENINO (% SEMILLAS)</b>	<b>MASCULINO (% SEMILLAS)</b>
1	32,8 <sup>a</sup>	4,6 <sup>b</sup>
2	9,1 <sup>abcd</sup>	22,6 <sup>ab</sup>
3	23,5 <sup>abcd</sup>	4,5 <sup>b</sup>
4	5,3 <sup>bcd</sup>	8,6 <sup>b</sup>
5	2,7 <sup>cd</sup>	13,4 <sup>ab</sup>
6	11,0 <sup>abcd</sup>	0,0 <sup>b</sup>
7		0,0 <sup>b</sup>
8	2,6 <sup>cd</sup>	19,1 <sup>ab</sup>
9	14,2 <sup>abcd</sup>	2,1 <sup>b</sup>
10	2,7 <sup>cd</sup>	
11	14,4 <sup>abcd</sup>	
12	31,1 <sup>a</sup>	
13	4,4 <sup>bcd</sup>	10,8 <sup>ab</sup>
14	8,9 <sup>abcd</sup>	
15	12,8 <sup>abcd</sup>	
16	8,5 <sup>abcd</sup>	28,2 <sup>a</sup>
17	13,3 <sup>abcd</sup>	20,0 <sup>ab</sup>
18	24,3 <sup>abcd</sup>	
19	-	-
20	25,8 <sup>abc</sup>	
21	29,4 <sup>ab</sup>	
22	5,4 <sup>bcd</sup>	
23	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>b</sup>
24	0,0 <sup>d</sup>	3,0 <sup>b</sup>
25	0,0 <sup>d</sup>	10,5 <sup>ab</sup>
26	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>b</sup>
27	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>b</sup>

**Letras distintas indican medias significativamente diferentes, según el test LSD-Fisher.**

Algunos progenitores en las distintas combinaciones ensayadas, presentaron un llenado de semillas que fue significativamente superior a las que involucraron algunos otros progenitores femeninos o masculinos. Los cruzamientos que mayor llenado de semilla produjeron fueron los que involucraron el genotipo 16 como progenitor masculino y los que involucraron el genotipo 12 (4x) como progenitor femenino (C/E: con previa emasculación. S/E: sin emasculación. ER: eficiencia reproductiva (100 x plantas logradas/espiguillas polinizadas). Letras distintas indican diferencias significativas en las medias, según el test LSD-Fisher.

Tabla 2. 9). Algunos progenitores en las distintas combinaciones ensayadas, presentaron un llenado de semillas que fue significativamente inferior a las que involucraron

algunos otros progenitores femeninos o masculinos. Los cruzamientos que menor llenado de semilla produjeron fueron los que involucraron el genotipo 1 (4x), el #3 (4x) o el #4 (4x) como progenitor masculino y los que involucraron el #4 (4x) o #5 (4x) o los genotipos hexaploides #23, 24, 25, o 27 como progenitor femenino (C/E: con previa emasculación. S/E: sin emasculación. ER: eficiencia reproductiva (100 x plantas logradas/espiguillas polinizadas). Letras distintas indican diferencias significativas en las medias, según el test LSD-Fisher.

Tabla 2. 9).

Los valores de los coeficientes de Pearson para las correlaciones entre la producción de semillas (fertilidad) para los cruzamientos homoploides 4x x 4x y la distancia genética, obtenida tanto por el enfoque molecular como el fenotípico (estudiados en el Capítulo 1) se detallan en la Tabla 2. 10. El *p-valor* obtenido en el caso del enfoque molecular fue de 0,64 y para el enfoque fenotípico fue de 0,38; es decir que en ambos casos fue muy superior a 0,05 y que por lo tanto, no se puede considerar que exista una correlación estadísticamente significativa entre estas variables.

**Tabla 2. 10. Correlaciones según Pearson para las distancias genéticas de los progenitores y la fertilidad de los cruzamientos, en 13 combinaciones homoploides (con emasculación) entre genotipos 4x de *Acroceras macrum*.**

	% SEMILLAS	DISTANCIA (J-1)	EUCLÍDEA PROM
% SEMILLAS	1		
DISTANCIA (J-1)	0,14 <sup>N/S</sup>	1	
EUCLÍDEA PROM	0,27 <sup>N/S</sup>	0,30 <sup>N/S</sup>	1

N/S: *p-valor* mayor a 0,05.

### ***Determinación del origen híbrido de la progenie***

Las cariósides tardaron entre 12 y 21 días en germinar. De 235 cariósides obtenidas, 173 germinaron originando plántulas.

Se obtuvieron entre 7 y 11 marcadores de ISSR informativos para cada familia (Tabla 2. 11).



Tabla 2. 11. Iniciadores utilizados para la determinación del origen híbrido de la progenie obtenida por cuatro cruzamientos: 20 x 5, 12 x 8, 15 x 4 y 11 x 5. En las columnas, bajo los cruzamientos: número de bandas informativas obtenidas con cada iniciador.

Iniciador	Ta	20 x 5 (8)	12 x 8 (9)	15 x 4 (7)	11 x 5 (9)
		♀x♂	♀x♂	♀x♂	♀x♂
(GA) <sub>8</sub> C	48	1	-	-	-
(AG) <sub>8</sub> GC	52	-	1	-	1
(AG) <sub>8</sub> T	46	4	-	1	-
(CT) <sub>8</sub> G	48	2	-	-	2
(TC) <sub>8</sub> A	46	-	-	3	2
(CA) <sub>8</sub> G	48	-	-	1	1
(GA) <sub>8</sub> T	46	-	-	1	-
(GA) <sub>8</sub> G	48	-	1	-	-
(CTC) <sub>6</sub> AC	60	-	1	-	-
(AC) <sub>8</sub> T	46	-	-	-	3
(AT) <sub>5</sub> GA	42	1	1	1	1
(AG) <sub>8</sub> T	46	1	1	-	-
(CA) <sub>8</sub> T	46	-	1	-	1
<b>Nº bandas totales</b>		<b>9</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>11</b>

Ta: temperatura de annealing. Paréntesis: número de individuos que integra la progenie de cada cruzamiento.

La elección y análisis de marcadores informativos se ilustra en la Figura 2. 11. En la misma se señalan dos marcadores presentes en el progenitor masculino que no están presentes en el progenitor femenino y que se han detectado en 6 de los 8 individuos de la progenie. El descendiente “H” tiene los dos marcadores, por lo cual el iniciador (AG)<sub>8</sub> T del ejemplo fue suficiente para corroborar su origen híbrido. El resto de los descendientes sólo presentan uno o ninguno de los marcadores y requirieron de más iniciadores para confirmar su origen.

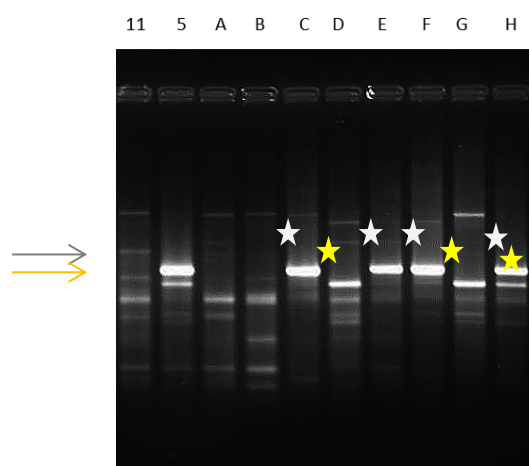


Figura 2. 11. Identificación de descendientes de origen híbrido en *A. macrum*, por medio de marcadores moleculares. Patrón de amplificación separado electroforéticamente en gel de agarosa de marcadores de ISSR generados por el iniciador (AG)<sub>8</sub> T, en la familia resultante del

**cruzamiento 11 x 5 (♀ x ♂). Las flechas indican dos marcadores específicos del progenitor masculino y las estrellas del mismo color indican los híbridos en los cuales están presentes.**

Los resultados del test en la progenie se informan en la Tabla 2. 12. Para que un individuo de la progenie sea corroborado como híbrido se requirió de la amplificación de al menos dos marcadores informativos, este requisito no se cumplió en sólo una de las plántulas que integraban la progenie del cruzamiento 20 x 5 y otra de la progenie del cruzamiento 15 x 4; ambas amplificaron sólo un marcador informativo de los 9 marcadores informativos para la familia 20 x 5 y de los 7 para la familia 15 x 4 ( Tabla 2. 11). Del total de la progenie, compuesta de los 33 individuos que en total fueron estudiados, el 93,93 % fueron corroborados como híbridos (Tabla 2. 12).

**Tabla 2. 12. Determinación del porcentaje de descendientes de origen híbrido de cuatro familias de *A. macrum*. La familia se indica como el cruzamiento ♀ x ♂ y los individuos que integran su progenie se indican con letras. El número de marcadores informativos (marcadores específicos del progenitor masculino) amplificados por cada individuo se indica a la derecha del mismo. En la columna final se indica el porcentaje de híbridos corroborados entre la progenie para cada familia (% de individuos que amplifican 2 o más marcadores informativos).**

<b>Familia</b>	<b>Progenie</b>	<b>Nº</b>	<b>% Híbridos</b>
<b>20 x 5</b>	A	3	<b>87,5</b>
	B	1	
	C	3	
	D	7	
	E	3	
	F	5	
	G	4	
	H	7	
<b>12 x 8</b>	A	2	<b>100</b>
	B	3	
	C	4	
	D	4	
	E	3	
	F	4	
	G	2	
	H	5	

	I	3	
<b>15 x 4</b>	A	4	<b>87,5</b>
	B	1	
	C	2	
	D	2	
	E	3	
	F	5	
	G	6	
<b>11 x 5</b>	A	6	<b>100</b>
	B	5	
	C	4	
	D	4	
	E	5	
	F	5	
	G	5	
	H	6	
	I	3	

## DISCUSIÓN

---

El presente capítulo se ha enfocado al estudio de las características reproductivas de *Acroceras macrum*, incluyendo el modo de reproducción, el sistema de polinización y la fertilidad de sus gametofitos. Si bien ningún trabajo antecedente puede realmente fundamentar alguna conclusión sobre las características de esta especie en los aspectos reproductivos, tradicionalmente se ha catalogado a *A. macrum* como estéril y lo que trajo como consecuencia una escasa adopción de la especie en los sistemas ganaderos pese a los demostrados atributos nutricionales y productivos que varios autores se han abocado a estudiar.

En el presente trabajo se han hecho observaciones de la megaesporogénesis y de la megagametogénesis. Ambos procesos parecen seguir el mismo esquema en genotipos tetraploides y hexaploides (Figura 2. 6). Durante estos procesos se genera una célula madre de la megáspora (CMM) que se divide por meiosis, originando megasporocitos, de los cuales sólo el más calazal sobrevive (megáspora funcional) (Figura 2. 6 a-d) y cumple la función de originar, mediante tres divisiones mitóticas sucesivas, las células que se organizarán en un saco embrionario (Figura 2. 6 e-g). Por su secuencia ontogénica, este saco es reducido y su estructura es del tipo *Polygonum* (Figura 2. 6 h). Luego, continúa la proliferación de las antípodas por cariocinesis y citocinesis, según el modelo *Poaceae* descrito por Anton y Cocucci (1984), de modo que en los sacos maduros se encuentra un mayor número de antípodas, algunas mononucleadas y otras con dos o más nucléolos (Figura 2. 6 i-k). En cada óvulo estudiado se encontró un único saco y todos los sacos observados parecen haberse originado según el esquema descrito, lo que representa un indicio de sexualidad (obligada) para ambos niveles de ploidía en *Acroceras macrum*.

En otras especies pertenecientes a la familia de las Poaceas, frecuentemente se han descrito sacos embrionarios que se desarrollan según el modelo *Polygonum* y también sacos embrionarios apospóricos y diplospóricos. En el tipo *Polygonum*, la ultraestructura de la ovocélula y de la célula central son similares para distintos miembros de la familia, mientras que las sinérgidas y las antípodas son descritas con algunas variaciones (Rutishauser, 1982). Anton y Cocucci (1984) describieron dos tipos de megagametófitos femeninos maduros para *Poaceae*: el tipo *Polygonum*, con su variante *Poaceae* y el tipo Drusa. En cuanto a la reproducción asexual de las *Poaceae*, varios autores han trabajado sobre la citoembriología y han reportado la ocurrencia de apomixis en numerosas especies con valor forrajero; ejemplos

de ellas son el género *Paspalum* (Quarin y col., 2001), *Panicum* (Savidan, 1982), *Pennisetum* (Wen y col., 1998) y *Brachiaria* (do Valle y col., 1989).

Características del saco embrionario similares a las observadas en *A. macrum* se han observado muy frecuentemente en muchas otras gramíneas. A modo de ejemplo, se puede citar su observación en ciertas accesiones diploides ( $2n=2x=18$ ) (pero no en las tetraploides, las cuáles fueron apospóricas) de *Brachiaria decumbens* nativas de Kenia y Ruanda (do Valle y col., 1989), en diploides ( $2n=2x=20$ ) (pero no en tetraploides naturales) de *Paspalum notatum* (Quarin y col., 2001), en algunas especies tetraploides ( $2n=4x=36$ ) de la sección *Trichachne* del género *Digitaria* (Caponio, 2002), en diploides ( $2n=2x=36$ ) (los poliploides son apomícticos facultativos) de algunas especies del género *Tripsacum* nativas de México, Colombia y Venezuela (Leblanc y col., 1995), en *Setaria pflanzii*, una especie tetraploide ( $2n=4x=36$ ) nativa de Argentina, Bolivia y Paraguay (Caponio y Pensiero, 2002). En algunas poaceas se observó el desarrollo de megagametófitos diplospóricos en poliploides, por ejemplo en tetraploides del género *Tripsacum* (Leblanc y col., 1995), poliploides de *Eragrostis curvula* (Echenique y col., 2012) y pentaploides de *Paspalum arundinellum* (Honfi y Quarin, 2012).

En especies tropicales y subtropicales como *Paspalum* y *Panicum*; la autopoliploidía y no la alopoliploidía, está en estrecha relación con la apomixis (Quarin y col., 1998). Por esto, la comprobación del origen alopoliploide para los dos citotipos estudiados ( $4x$  y  $6x$ ) es un importante apoyo a los resultados de los estudios de la megaesporogénesis, megagametogénesis y sacos embrionarios, en los cuales no se encontró ningún indicio de procesos apomícticos.

Las observaciones de la ontogenia del megagametofito así como la de los sacos embrionarios maduros de *A. macrum*, dan un importante sustento pero no resultan por sí solas concluyentes para descartar la reproducción apomíctica por diplosporia, dado que requieren de ajustar todos los factores que aseguren una uniformidad de resultados (Borges do Valle y Savidan, 1998) y una gran experiencia en la identificación de las estructuras gametofíticas.

El estudio del origen híbrido de la progenie mediante marcadores moleculares basados en el ADN puede considerarse una de las pruebas más robustas para el análisis del modo de reproducción, no obstante, si sólo se utiliza esta metodología, hubiera sido recomendable analizar progenies más numerosas o un número mayor de familias para descartar la ocurrencia de procesos apomícticos o autopolinización. Sin embargo, los

resultados obtenidos en esta tesis (con cuatro familias de entre siete y nueve integrantes, donde en ninguna de ellas se pudo probar que algún individuo no tuviera un origen híbrido, tras analizar entre siete y once marcadores informativos), pueden considerarse como una prueba contundente del modo de reproducción sexual obligado en *A. macrum*. Esto es porque la comprobación del origen híbrido de las progenies estudiadas, provenientes de diferentes combinaciones entre genotipos distintos, se suma a la comprobación del origen aloploiploide para ambos citotipos y está en estrecha coincidencia con los estudios de los procesos de megasporogénesis y megagametogénesis, así como con el resultado de la fertilidad de los cruzamientos con los diferentes condicionamientos para la polinización. De esta manera, el análisis de las huellas genéticas proporciona la prueba definitiva de que las carióspsides de *A. macrum* se generan mediante un proceso sexual obligado.

En dos especies de gramíneas exitosas en la reproducción asexual por estolones y que además son miembros de la subfamilia *Panicoidae* (*Stenotaphrum secundatum*, *Paspalidium geminatum*), Lovisolo (2011) informa una baja producción de semillas de origen sexual y un alto porcentaje de megasporocitos anormales (abortivos), pero a su vez los megasporocitos normales y fértiles tuvieron características similares a las encontradas en *A. macrum*. Sin embargo la especie *Glyceria multiflora* que si bien se reproduce asexualmente por el gran desarrollo de rizomas, también lo hace exitosamente de manera sexual; ésta es una muy buena especie forrajera de suelos inundados cuyos rizomas mueren cuando el suelo se seca por períodos prolongados, pero la semilla puede germinar cuando las condiciones vuelven a ser favorables permitiendo la supervivencia de la especie (Lovisolo, 2011). El desarrollo de los órganos vegetativos en los vegetales compite por los nutrientes con el de los órganos reproductivos (Salisbury y Ross, 2000). Estos sistemas se regulan mediante fitohormonas que disminuyen el crecimiento vegetativo para favorecer la fructificación (Salisbury y Ross, 2000). De hecho, las mutilaciones de los órganos vegetativos, la poda severa, y los inhibidores de crecimiento en algunos casos estimulan la floración (Salisbury y Ross, 2000). *Acroceras macrum* suma a su importante desarrollo rizomatoso y estolonífero (favorecido por su hábito de crecimiento decumbente), una alta persistencia que permite su rebrote cuando las condiciones hídricas del suelo vuelven a serle favorables (Ferrari, observación personal). Además, la reproducción vegetativa es un mecanismo más económico que la reproducción sexual y es muy eficiente para perpetuar especies altamente adaptadas a su ambiente (Mandujano Sánchez, 2007). Estos motivos podrían estar influyendo en que los

sistemas que estimulan el desarrollo de los órganos reproductivos en detrimento de los vegetativos no estén evolutivamente muy desarrollados en *A. macrum*. Todo esto puede ser la causa de que el sistema de reproducción sexual no sea la opción reproductiva que la especie tome con mayor frecuencia para asegurar su supervivencia y además, cuando ocurre en la naturaleza, puede fácilmente pasar desapercibida, contribuyendo a la clásica opinión de que la especie es estéril.

La manera en que los cromosomas se aparean es considerada un indicador confiable de su homología y la frecuencia de asociaciones sinápticas polivalentes ha sido un criterio muy utilizado para distinguir aloploidos de autoploidos, aunque hay que tener en cuenta que algunos poliploides de origen híbrido pueden exhibir apareamiento multivalente y la formación bivalente suele ser frecuente en híbridos no poliploides (Ramsey y Schemske, 1998). Entre los arreglos cromosómicos observados durante diacinesis y prometáfase del proceso de microesporogénesis se encontró una proporción de tetravalentes en el citotipo tetraploide y de hexavalentes en el hexaploide baja (Jackson y Casey, 1982; Jackson, 1982). El amplio predominio de asociaciones bivalentes en el citotipo 4x y de trivalentes en el 6x apoya la hipótesis de la aloploidía en la especie (Jackson y Casey, 1982; Jackson, 1982). El número máximo de cromosomas asociados (cuatro en tetraploides y seis en hexaploides) da sustento extra a las conclusiones acerca de los niveles de ploidía resultantes del conteo cromosómico (Jackson, 1982).

Similar resultado en cuanto al tipo y proporción de las asociaciones cromosómicas observadas en el citotipo tetraploide se han encontrado en otras especies alotetraploides de gramíneas como es el caso de *Setaria pflanzii* ( $2n = 36$  cromosomas) (Caponio, 2000; Caponio y Pensiero, 2002); *Brachiaria bovonei* ( $2n = 4x = 36$  cromosomas) (Risso-Pascotto y col., 2009).

Similar resultado en cuanto al tipo y proporción de las asociaciones cromosómicas observadas en el citotipo hexaploide se han encontrado en otras especies alohexaploides de gramíneas como es el caso de accesiones de *Brachiaria brizantha* ( $2n = 6x = 54$  cromosomas) (Pagliarini y col., 2012) y *Brachiaria subulifolia* ( $2n = 6x = 54$  cromosomas) (Risso-Pascotto y col., 2009).

Al analizar la microesporogénesis se encontró un alto porcentaje de células con problemas meióticos, las cuales posiblemente no alcanzan a formar polen fértil. Las aberraciones meióticas fueron más frecuentes en el citotipo hexaploide que en el tetraploide,

esto puede deberse al menos en parte, a la mayor complejidad que presentan las asociaciones en el citotipo hexaploide, las cuales presentaron mayores dificultades para la correcta orientación y disyunción de los cromosomas que las asociaciones bivalentes predominantes en el citotipo tetraploide.

De cualquier manera en un cierto porcentaje de microsporocitos se logra una meiosis regular; y al comparar los porcentajes de irregularidades meióticas observadas (47,5 % en  $4x$  y 78,1 % en  $6x$ ) con las viabilidades del polen (43,3 % en promedio en los  $4x$ , 26,2 % en promedio en los  $6x$ ), se observa una relación casi perfectamente inversa. En relación a esto podría afirmarse que los porcentajes de fertilidad del polen, de bajos a medios, se deben a los problemas meióticos observados en la microsporogénesis. La presencia de cromosomas desapareados, adheridos, rezagados o que segregan prematuramente durante la anafase I o II de la meiosis podría estar produciendo microsporocitos aneuploides con cromosomas que se pierden durante la cariocinesis o cariocinesis desbalanceadas. Los microsporocitos aneuploides en muchos casos no serán funcionales y cuando lo sean originarán cigotos o embriones aneuploides en gran medida inviables (Ramsey y Schemske, 2002) y también pueden resultar en los diferentes tamaños de granos de polen observados principalmente en el citotipo  $6x$ .

Si bien muchos autores relacionan similares resultados en cuanto al tipo y proporción de las aberraciones cromosómicas en poliploides con el modo de reproducción apomítico, por ejemplo Pagliarini y col. (2012) en su trabajo con *Brachiaria brizantha* ( $2n=4x=36$  y  $2n=6x=54$  cromosomas), Gupta y Yashvir (1973) en su trabajo con *Setaria verticillata* ( $2n=6x=54$  cromosomas), han reportado algunas otras especies poliploides de gramíneas que también tuvieron dificultades comparables durante la microesporogénesis y sin embargo resultaron ser sexuales, como es el caso de algunas accesiones de *Setaria pflanzii* con  $2n=4x=36$  cromosomas y viabilidades de polen por tinción con lugol superiores al 95 % (Caponio, 2000; Caponio y Pensiero, 2002); una accesión de *Brachiaria dictyoneura* con  $2n=4x=24$  cromosomas (Risso-Pascotto y col., 2006) y en el citotipo aneuploide ( $2n=9x=90$ ) de *Andropogon gerardii* (Norrman y col., 1997). En el presente estudio de la microesporogénesis de *A. macrum* se ha observado además la presencia de cromosomas pequeños supernumerarios (podría tratarse de cromosomas B) en algunas CMP en diacinesis del citotipo tetraploide. Observaciones similares se han reportado también en otras especies de gramíneas como dentro del genotipo tetraploide de *Digitaria eriantha* ( $2n=4x=36+1$ )



(Toniolo Pozzobon y col., 2006) donde se observó un predominio de asociaciones bivalentes, como las observadas en el presente trabajo en *A. macrum*, pero escasas irregularidades meióticas. En ese trabajo de *D. eriantha* los autores reportan altas viabilidades de polen (superiores a 90 %) y sacos embrionarios reducidos y fértiles (Toniolo Pozzobon y col., 2006).

Los porcentajes de aberraciones meióticas observadas en el presente trabajo durante la microesporogénesis son considerablemente mayores que los porcentajes promedio de abortos y detenciones en la macroesporogénesis y megagametogénesis para ambos citotipos. Esto indica que la fertilidad femenina tendría, en principio, una mayor capacidad buffer con respecto a los problemas relacionados a la meiosis. Sin embargo se observó en este trabajo una correlación positiva medianamente alta entre la fertilidad del polen y el llenado de semillas obtenidos por autopolinización y principalmente en polinización abierta. Esto indica que la fertilidad masculina está en cierta forma relacionada a la fertilidad femenina. Los porcentajes de semillas producidas en autofecundación estuvieron significativamente correlacionados con los porcentajes de semillas en polinización abierta en un 47 % (positivo), indicando que la fertilidad de ambos sistemas parece depender de los mismos factores, pero siempre la autopolinización fue baja y mucho menor a los valores obtenidos por polinización cruzada. También hubo una importante correlación positiva del porcentaje de espiguillas que efectivamente se abren en la panícula con la producción de semillas en polinización abierta y con la viabilidad del polen, sin embargo esa variable no se correlacionó con las producción de semillas en autopolinización; estas observaciones estarían sugiriendo que (1) no es necesaria la apertura de la flor para que ocurra la autopolinización (podría estar involucrado algún proceso de cleistogamia) y/o (2) las plantas más fértiles (en principio, las que menos limitaciones meióticas presentan) tienden a presentar una antesis más completa en sus panículas, por lo cual una de las causas de que en algunas espiguillas no llegue a producirse la antesis podría ser que ésta contenga un ovario con un saco embrionario aberrante.

En los cruzamientos controlados se observó un rango similar para el llenado de semillas con y sin emasculación previa, y una media para ambos tratamientos también muy similar si se tienen en cuenta los cruzamientos  $4x-4x$  o  $6x-6x$ . Sin embargo si se tienen en cuenta los cruzamientos  $4x-6x$  la producción de semillas fue nula en el tratamiento con emasculación pero no lo fue al no emasculación. El porcentaje residual de semillas producida en los cruzamientos  $4x-6x$  es comparable a los valores observados en condiciones de

autofecundación forzada. Todas estas observaciones suman indicios que apoyan las hipótesis de la esterilidad o muy baja fertilidad de los hexaploides, la baja capacidad de autofecundación (para algunos genotipos se trata de verdadera de autoesterilidad) en la especie y que ciertas combinaciones homoploides entre tetraploides son aceptablemente fértiles. Las observaciones además llevan a inferir que la fertilidad depende de varios factores: se da en relación al tipo de combinación (la combinación homoploide tetraploide es superior a los otros tipos de combinaciones y la combinación homoploide hexaploide es infértil), al progenitor femenino (por ejemplo los cruzamientos que involucraron el genotipo 12 presentaron altos porcentajes de fertilidad), al masculino (por ejemplo los que involucraron los genotipos (4x) #1, 3 y 4 presentaron bajos porcentajes de fertilidad y los que involucraron el genotipo 16 (4x) presentaron altos porcentajes de fertilidad) y además a la combinación entre ambos (por ejemplo la combinación 21 x 13 presentó una fertilidad de 29,4 % mientras que la combinación 5 x 13 presentó una fertilidad 10 veces inferior, del 2,9 %, aunque ambas son combinaciones homoploides entre tetraploides que involucran el genotipo 13 como progenitor masculino). De estos resultados también se puede destacar que la viabilidad del polen del progenitor masculino tiene poca influencia en la fertilidad de las diferentes combinaciones, ya que los porcentajes de viabilidad del polen de los genotipos (4x) 1, 3 y 4 (con medias en el rango de 36 a 47 %) no son significativamente diferentes de la media de viabilidad obtenida para el polen del genotipo 16 (47 %) y sin embargo las combinaciones que involucraron los tres primeros fueron poco fértiles y las que involucraron el genotipo 16 presentaron una fertilidad alta (Tabla 2. 6, C/E: con previa emasculación. S/E: sin emasculación. ER: eficiencia reproductiva (100 x plantas logradas/espiguillas polinizadas). Letras distintas indican diferencias significativas en las medias, según el test LSD-Fisher.

Tabla 2. 9).

El efecto de la combinación sobre la fertilidad de los cruzamientos podría tener relación con la distancia genética entre los genotipos involucrados, de esta manera podría explicarse la esterilidad de los cruces 6x-6x por la escasa distancia genética observada entre los hexaploides. Esto aún tiene posibilidades de ser cierto para el caso de los 6x, los cuales pueden poseer algún sistema de autoincompatibilidad que se active en casos de mucha cercanía

genética. Sin embargo, al analizar la correlación entre las distancias genéticas y la fertilidad de los cruzamientos, se descarta esa hipótesis en las combinaciones homoploides tetraploides. Así por ejemplo, en las combinaciones 21 x 13 y 5 x 13 el progenitor femenino #5 y el #21 están a distancias genéticas Jaccard muy similares del progenitor masculino 13 (0,67 y 0,68 unidades respectivamente) y no obstante eso la combinación con el genotipo 21 es 10 veces más fértil que la involucra el genotipo 5.

Los ensayos de la germinación de las cariósides obtenidas muestran que la eficiencia reproductiva de *A. macrum* es menor, en la mayoría de los cruzamientos evaluados, que el porcentaje de semilla producido. En el peor de los casos sólo se obtuvo una cariósida, la cual no germinó; en el mejor de los casos se obtuvieron 37 semillas de las cuales 29 germinaron, otros casos de buena eficiencia reproductiva fueron la obtención de 26 plántulas a partir de 27 cariósides, 25 plántulas a partir de 30 cariósides, y 14 de 16; hubo casos en que todas las cariósides germinaron pero su escaso número resultó en una baja eficiencia reproductiva. Las causas por la cual algunas cariósides fallaron en germinar pueden ser varias, desde embriones mal desarrollados o abortados, o dañados por causas diversas no detectadas externamente. Una de las causas de aborto podría ser la menor supervivencia de los embriones fruto de autopolinización reportada especialmente en especies facultativamente autógamas (Charlesworth, 2006; Barret y col., 1996). Curiosamente los menores porcentajes de semillas provenientes de cruzamientos sin emasculación que germinaron provenían de cruzamientos que involucraban progenitores femeninos con porcentajes de autopolinización relativamente altos (11, 15) (Tabla 2. 6, C/E: con previa emasculación. S/E: sin emasculación. ER: eficiencia reproductiva (100 x plantas logradas/espiguillas polinizadas). Letras distintas indican diferencias significativas en las medias, según el test LSD-Fisher.

Tabla 2. 9) y los mayores porcentajes se obtuvieron con progenitores femeninos con bajos porcentajes de autopolinización (12, 20) (Tabla 2. 6, C/E: con previa emasculación. S/E: sin emasculación. ER: eficiencia reproductiva (100 x plantas logradas/espiguillas polinizadas). Letras distintas indican diferencias significativas en las medias, según el test LSD-Fisher.

Tabla 2. 9) o en el tratamiento con emasculación. Las semillas obtenidas de cruzamientos heteroploides sin emasculación tuvieron menores porcentajes de germinación (70,8 % contra 75,3 % de germinación de la semilla obtenida por cruzamientos previa emasculación). Si bien la diferencia en el porcentaje de germinación entre los tratamientos es sólo de un 4,5 %, ese porcentaje es similar al porcentaje promedio de autofecundación obtenido para la colección de *A. macrum*. La falta de la humedad requerida para el desarrollo de la semilla (Salisbury y Ross, 2000) se descarta como causa de aborto porque las plantas madre estuvieron bajo riego durante todo el periodo de llenado y maduración de sus semillas.

Los resultados obtenidos de producción de semillas en autopolinización, polinización abierta y los cruzamientos controlados, todo ello apoyado en el estudio del origen de los híbridos, indican que los genotipos estudiados de *A. macrum* se comportan como alógamos. Que el sistema de fecundación predominante parece ser la polinización cruzada, es también apoyado por la biología floral de la especie que tiene una mayor inversión en órganos masculinos para la reproducción (Zuloaga y col., 1987). Una observación de Rhind y Goodenough (1976), fue que ciertas combinaciones dentro de un mismo nivel de ploidía producen altos porcentajes de semilla, ésto se confirma para los genotipos 4x, sin embargo los genotipos 6x se comportaron como estériles, tanto en autopolinización como en polinización abierta; por otro lado, en cruces controlados fueron estériles siempre que se utilizaron como progenitor femenino. Las diferencias entre ambos niveles de ploidía podrían deberse a una menor fertilidad general de los 6x; como consecuencia de un mayor desbalance cromosómico producido en la meiosis de estos citotipos.

Es probable que *A. macrum* sea un poliploide de reciente formación. La fertilidad en muchos neopoliploides, según Ramsey y Schemske (2002), en general es baja, como consecuencia de diferentes alteraciones en el número de cromosomas, la dosis génica, el número de alelos, el contenido de ADN, el tamaño celular, el crecimiento y el desarrollo. Las aberraciones meióticas son consideradas como el factor más general en la infertilidad de los poliploides, pero también se han planteado otras posibles causas de infertilidad, particularmente en el caso de los alopoliploides, una de ellas son las incompatibilidades génicas que se producen a nivel gamético, intra-*locus* o inter-*loci* y en forma independiente a la meiosis (Ramsey y Schemske, 2002).

Las plántulas cuyo origen híbrido fue estudiado fueron el fruto de cruzamientos entre tetraploides, dicha progenie fue uniformemente tetraploide por conteo cromosómico

(resultado no mostrado), por lo cual se puede descartar infertilidad en el caso de los tetraploides. Los hexaploides nunca produjeron semillas en forma aislada, se puede proponer que esto se debe a algún sistema de autoincompatibilidad presente en hexaploides, a una baja fertilidad de su polen y a una fertilidad femenina también reducida (aunque en menor medida que la fertilidad masculina); las dos últimas causas, pero principalmente la reducida fertilidad masculina, posiblemente sean resultado de las irregularidades en los procesos meióticos. Sin embargo, todas las plantas estudiadas tienen cierto grado de fertilidad masculina (suficiente para polinizar y obtener plántulas) y al menos los genotipos 26 y 27 (cuyos ovarios han sido estudiados) también pueden formar sacos reducidos con las mismas características que los sacos observados en plantas tetraploides.

Aun así, los 6x parecen tener mayores dificultades para la reproducción sexual que los 4x y puede que preponderantemente tiendan a perpetuarse de manera vegetativa. Esto podría explicar una menor participación de los genomios hexaploides en el flujo génico en esta especie, lo cual pudo haber estado contribuyendo a la menor diversidad genética observada en el citotipo 6x. En cualquier caso, el germoplasma hexaploide puede contener genes altamente valiosos e interesantes de incorporar mediante cruzamientos u otros métodos utilizados en los programas de mejoramiento.

El porcentaje de híbridos obtenidos, cuyo origen ha sido corroborado mediante marcadores moleculares ISSR es lo suficientemente alto como para afirmar que *Acroceras macrum* se reproduce sexualmente mediante semillas. Además se puede afirmar que su sistema de polinización es predominantemente la polinización cruzada con la posibilidad de un pequeño porcentaje de autopolinización residual, al menos dentro de los genotipos tetraploides estudiados. Los resultados informados en este capítulo confirmaron un mínimo de 87,5 % de progenie híbrida en las familias estudiadas, el 12,5 % restante no pudo ser confirmado como híbrido con los iniciadores disponibles para el desarrollo del presente trabajo pero no necesariamente son el producto de la autopolinización del progenitor femenino. Dado que presentaron una banda del progenitor masculino no presente en la madre, es probable que sean híbridos también, aunque en este punto no hay pruebas suficientes para confirmarlo.

A partir de estos resultados se abren perspectivas a futuro, sobre la posibilidad de generar nuevas variantes genéticas dentro del germoplasma de *A. macrum*, de tal manera de

poder obtener genotipos o poblaciones superiores que sean fértiles para poder multiplicarlos por semillas.

Ahora estamos en condiciones de decir que se ha encontrado evidencia de sexualidad y alogamia en esta especie. Las plantas alógamas son fuertemente heterocigóticas, esto ofrece la posibilidad de realizar selección contra los genes desfavorables y aumentar la frecuencia de los favorables, modificando así la media de la población hacia el sentido que interese, y el método más apropiado para lograrlo es la selección masal en sus diferentes variantes (Cubero, 2003). La introducción de características deseables en una población híbrida adecuada para determinadas necesidades agronómicas (como rendimiento de biomasa y resistencia a frío o mejor tolerancia a sequías estacionales), se puede lograr con relativa facilidad en las especies alógamas; eligiendo convenientemente las líneas parentales, los híbridos o poblaciones resultantes pueden tener un vigor muy superior a cualquiera de las poblaciones existentes (Cubero, 2003). La información generada indica que la especie podría ser mejorada siguiendo la metodología habitual para gramíneas alógamas, la cual se basa en la selección de poblaciones que permitan obtener poblaciones híbridas que se caractericen por poseer una mayor frecuencia de alelos deseables y menor frecuencia de los no deseados, es decir, una población con características medias superiores. Otra posibilidad, la cual está menos popularizada en el caso de gramíneas alógamas, sería la de obtener híbridos que se generen por el cruzamiento de dos líneas heterocigotas con una buena aptitud combinatoria. La producción de semilla híbrida por este camino involucra propagar en forma vegetativa grandes extensiones de ambos progenitores, que a su vez queden físicamente habilitados para realizar la polinización cruzada, para posteriormente cosechar la semilla de generada por ambos.

*A. macrum* presenta por lo tanto importantes características que la hacen apropiada para el mejoramiento genético. Sin la información generada en el presente trabajo no se estaría en condiciones aún de ir planificando ese paso que es el próximo dentro de un programa de mejoramiento para esta especie, y esto puede expandir la utilización de la especie en mayor número de territorios.

## **CONCLUSIONES**

---

*Acroceras macrum* se reproduce sexualmente. Esto queda en evidencia a partir de la observación de que forma sacos embrionarios únicos de la variante del tipo *Polygonum* común en gramíneas de reproducción sexual y que las combinaciones de ciertos genotipos generan una alta proporción de progenie que son híbridos confirmados. Por otra parte no se encontró evidencia de reproducción apomíctica. Aun así, el principal modo de reproducción de la especie es clonal por estolones y rizomas aunque es posible obtener en ciertas condiciones porcentajes aceptables de semilla.

El principal sistema de fecundación de *A. macrum* es la polinización cruzada pudiéndose afirmar que la especie es básicamente alógama. Esto se ha evidenciado por la obtención de semillas en polinización abierta en proporciones mayores que las que pudieron obtenerse por autopolinización forzada y principalmente en los altos porcentajes de híbridos (confirmados) obtenidos mediante cruzamientos sin emasculación. Este sistema de fecundación se manifiesta también en una biología floral que beneficia la reproducción masculina con una alta relación polen-ovarios. Aunque algunos genotipos se comportan como autoestériles, otros son autógamos facultativos capaces de sustentar ciertos niveles de autofecundación, siempre más bajos y al parecer menos eficientes que el del cruzamiento con otros genotipos.

El citotipo hexaploide tiene una fertilidad mucho menor que la del citotipo tetraploide. Es posible que incluso sea estéril, puesto que no se encontró evidencia que realmente sustente la fertilidad de los hexaploides. En los casos en que la progenie obtenida puede haberse originado de un progenitor hexaploide, este origen no ha sido constatado. Lo que si ha podido comprobarse es que los cruzamientos homoploides entre tetraploides resultan de una fertilidad muy superior a la de cualquier cruzamiento que involucre un progenitor hexaploide. La mayor justificación de la baja fertilidad de los 6x está dada por los problemas meióticos observados durante la microesporogénesis y megametogénesis, los cuales son más frecuentes en los 6x que en los 4x. Por otro lado, los porcentajes de abortos y detenciones durante la megasporogénesis y megagametogénesis también son superiores en los 6x.

# Comentarios finales

---

Como primer paso, en el presente trabajo, se obtuvo una colección de material de la especie *Acroceras macrum* a partir de un antiguo conjunto de híbridos de origen africano que fueron importados en la región del nordeste de Argentina y llevan un importante tiempo de adaptación a los terrenos anegados de esta región; a partir de la misma, se realizaron los estudios preliminares necesarios para dar inicio a un plan de mejora en la especie. En el primer capítulo se ha descrito la diversidad de dicha colección y los niveles de ploidía de los diferentes genotipos. En el segundo capítulo se ha estudiado el modo de reproducción, la fertilidad masculina y femenina, el modo de polinización y el tipo de poliploidía del material, así como también se ha analizado el origen híbrido de plántulas resultantes de cruzamientos controlados realizados sin la emasculación del progenitor femenino.

La colección de trabajo estuvo integrada por 22 genotipos tetraploides y 5 genotipos hexaploides. La diversidad de la misma fue evaluada con marcadores moleculares basados en ISSR y también mediante marcadores morfológicos y agronómicos, encontrándose por ambas metodologías, una importante variabilidad representada principalmente dentro del citotipo tetraploide y un citotipo hexaploide menos diverso cuyos genotipos podrían haberse originado a partir de un ancestro común (algunos, sino todos ellos). La diversidad de los caracteres morfológicos y agronómicos estudiados se presenta en rangos de diversa amplitud y con diferentes coeficientes de variación entre genotipos, pero todas las variables estudiadas presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y esto abre la posibilidad de hacer una selección para cualquiera de ellas. La mayor diversidad genética se encontró entre un genotipo perteneciente al citotipo tetraploide y uno perteneciente al de los hexaploides, por su parte, la menor diversidad genética se encontró entre genotipos pertenecientes al citotipo hexaploide. Los rasgos morfológicos agruparon los genotipos pertenecientes al citotipo hexaploide en un grupo compacto, el cual fue intermedio entre dos grupos de genotipos tetraploides; las variables que más contribuyeron en esta separación fueron Crecimiento Inicial (CI), Largo de Lámina foliar (LL), rendimiento en Biomasa (B), Altura de la planta (A), Periodo Vegetativo (PV), Largo del Entrenudo (LEn), Cobertura de Suelo (CS); Largo de la Espiguilla (LEs), Ancho de la Espiguilla (AEs), Pico de Floración (PF), Ancho de Lámina foliar (AL). Muchas de estas variables presentaron diferencias significativas entre el citotipo tetraploide y hexaploide, presentándose en los hexaploides



mayores valores en el tamaño de estructuras como LL, LEn, LEs, AEs, y AL. Los tetraploides, por su parte, presentaron matas más compactas de menor A pero mayor CS (que en diámetro no presentó diferencias significativas del diámetro medio de los hexaploides) y llegaron más tempranamente a su pico de floración, también presentaron valores significativamente superiores para otras variables que tuvieron que ver con características de la inflorescencia como el Largo de la Panícula (LP), Longitud del Racimo Basal (LRB), el Número total de Espiguillas por panícula (NEs) y la proporción de Espiguillas de la panícula que entraban en Antesis (EsA). CI y B, si bien estuvieron entre las variables que mayor diversidad en el conjunto de genotipos presentaron, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el citotipo tetraploide y hexaploide; estas dos, junto a CS son características agronómicas muy importantes desde el punto de vista de la selección. Características como NEs y EsA pueden estar en relación a la fertilidad y mayor número de plántulas posibles de obtener mediante cruzamientos y serán importantes a la hora de seleccionar las líneas progenitoras. Todas estas variables permitan trabajar dentro del conjunto de genotipos tetraploides a partir de hibridación y selección lo cual es importante dado que en ese citotipo es donde mayor diversidad se ha observado (y donde, como se demuestra en el Capítulo 2, mayor fertilidad se ha encontrado; mientras que los cruzamientos heteroploides presentaron muy baja fertilidad y los homoploides hexaploides resultaron infértiles), de modo de no disminuir en demasía el acervo genético inicial en un programa de mejoramiento por cruzamientos.

Fue importante también conocer el tipo de poliploidía del material, éste puede describirse como alopoliploide mediante el tipo de asociaciones encontradas en la meiosis masculina. Los cromosomas homólogos de los tetraploides se asociaron fundamentalmente como bivalentes indicando la presencia de dos genomas diferentes, cada uno con dos copias de cromosomas. En los hexaploides, por su parte, predominaron las asociaciones trivalentes, univalentes, bivalentes y tetravalentes indicando nuevamente que hay presentes dos genomas diferentes, uno con dos copias de cromosomas y uno con cuatro pero que puede haber mayores dificultades para el encuentro y la asociación entre homólogos en grupos de tetravalentes, por lo cual algunos no llegan a formarse y quedan por ejemplo como trivalentes más un univalente o dos bivalentes. Esta mayor complejidad de los hexaploides también se ve reflejada en la mayor frecuencia de problemas para la correcta división meiótica masculina; la cual tiene una fuerte relación con la menor fertilidad general del polen y también extrapolado

a lo que sucedería en la meiosis femenina puede explicar un mayor grado de gineceos que no logran formar un saco embrionario maduro y fértil.

El modo de reproducción es sexual. Esto queda demostrado principalmente mediante el aporte de dos resultados. En una primera instancia, el modo en que se desarrollan los sacos embrionarios siguiendo el camino característico del tipo *Polygonum* y terminando con la formación de sacos maduros típicos o en la variante *Poaceae*, sumado al hecho de que no se encontraran otros tipos de sacos; son importantes evidencias de que de formarse embriones viables, estos tendrían que originarse mediante el camino de la sexualidad. Luego la evidencia definitiva de que esto realmente ocurre, fue la obtención de híbridos que han podido corroborarse como tales mediante el test de progenie, realizado con marcadores moleculares.

La especie ha demostrado también ser alógama, esto queda en evidencia luego de analizar y comparar las proporciones de llenado de semilla en condiciones de polinización abierta, autopolinización forzada y en los cruzamientos controlados con y sin castración previa. Las bajas proporciones de llenado de semilla en autofecundación forzada, superados siempre por los obtenidos en polinización abierta, y las similares proporciones generales de llenado de semillas obtenidas mediante cruzamientos con y sin castración previa en los diferentes tipos cruzamientos controlados, son todos indicios de alogamia y baja incidencia de autopolinización. La evidencia final y definitiva de alogamia vino tras el test de la progenie obtenida en los cruzamientos controlados sin castración previa, donde la progenie resultó tener fundamentalmente un origen híbrido.

La fertilidad de los tetraploides resultó siempre superior a la de los hexaploides. Los genotipos tetraploides, tuvieron un mayor porcentaje de sacos embrionarios fértiles en gineceos maduros, mayor proporción de polen fértil y originaron mayor número de semillas llenas al ser utilizados como progenitor femenino en los distintos tipos de cruzamiento. Los hexaploides por su parte, no sólo tuvieron menor fertilidad femenina y masculina sino que presentaron niveles bajos de llenado de semilla cuando se los dejó polinizarse libremente y no produjeron semillas en autopolinización ni al utilizarse como madre en cruzamientos controlados; aproximándose bastante a la infertilidad. Los tetraploides sin embargo lograron niveles buenos de fertilidad en algunos cruzamientos homoploides y también se observó buena fertilidad en polinización abierta para algunas de las plantas. En este punto cabe mencionar la posibilidad de ensayar cruzamientos interespecíficos dentro del género

*Acroceras*, considerando que además del material de *A. macrum* recuperado, durante el desarrollo de este trabajo de Tesis ha sido posible recolectar material nativo del NEA perteneciente a las especies *A. zizanioides* y *A. oryzooides*, en las cuales se ha reportado (como se discute en el Capítulo 1) el mismo número cromosómico que el citotipo 4x de *A. macrum*.

En los diferentes pasos del procedimiento de mejora será por lo tanto, conveniente trabajar con plantas tetraploides. Esto es debido a que los hexaploides presentaron una baja fertilidad en cruzamientos y resultaron infértiles en autopolinización lo cual dificultará aplicar cualquiera de las metodologías que involucran la obtención de semillas y el cruzamiento. Como tampoco hubo una fertilidad aceptable en cruzamientos heteroploides entre tetraploides y hexaploides, tampoco conviene diseñar un plan de mejoramiento basado en el cruzamiento de líneas de diferente ploidía. La diversidad presente en el citotipo hexaploide es mucho más reducida que para el tetraploide, y no siendo factible ampliar esta base genética por cruzamientos, tampoco es recomendable plantear la selección de un cultivar de propagación vegetativa utilizando sólo este citotipo, pero si podría incluir (como se expone más arriba) el citotipo hexaploide en una población mayor conteniendo los dos niveles de ploidía y a partir de la cual se seleccione el mejor genotipo de propagación clonal. Por otro lado la mayor diversidad de los tetraploides abre mayor número de posibilidades para combinar genes por cruzamiento obteniendo nuevos genotipos con posibilidad de ser superiores, y por lo tanto una selección dentro de este citotipo mediante metodologías que involucren cruzamientos resulta especialmente interesante, más aún porque permite seleccionar de un modo más eficiente para una característica como la producción de semillas que es el principal foco de atención para un programa de mejoramiento en *A. macrum*.

En una visión global, a partir de este trabajo es posible finalmente concluir que se ha logrado obtener la información necesaria para iniciar el mejoramiento genético de la especie siguiendo un programa de cruzamientos adecuado para plantas aloploidoides que se reproducen sexualmente y son alógamas. No hay un método que el mejorador deba considerar “mejor” para aplicar en un programa de mejoramiento, sin embargo cuenta con diferentes posibilidades y variantes metodológicas y debe aplicar su criterio para proponer aquella que sea más adecuada no sólo a los fines buscados en su programa y al material vegetal, sino también a los recursos (recursos humanos, la información disponible, recursos económicos, instalaciones y espacio) y el tiempo del que dispone para alcanzar sus objetivos. (Pérez Grajales y col., 1997).

Como *Acroceras macrum* tiene eficientes mecanismos de propagación vegetativa, se puede orientar la selección a la obtención de un cultivar de propagación vegetativa que reúna las mejores características agronómicas. Esta selección puede hacerse a partir de la población conformada por los 27 genotipos o partiendo de una población mayor, con una base genética más amplia, constituida por los progenitores y las plantas obtenidas de una mezcla de semillas obtenidas de polinización abierta.

Otra metodología de mejora que podría ser considerada apropiada podría involucrar la selección seguida de hibridación. En este contexto quizá la técnica más apropiada podría ser la descrita por Burton (1982) de selección fenotípica recurrente y restringida. En el caso de *A. macrum*, consistiría en la generación de una población inicial a nivel tetraploide lo más diversa posible, posterior selección de los mejores plantas a partir de su fenotipo, cultivo en forma aislada de los mismos conformando una parcela de policruzamiento, cosecha de la semilla en la nueva generación y siembra de la misma. El sistema se debería repetir por sucesivos ciclos hasta obtener una población con las características deseadas. Entre las mismas se debería priorizar la producción de semilla fértil y en particular la retención de semillas después de su madurez.

# Bibliografía

---

- Abdel-Fatah, B. E., Ali, E. A., Tag El-Din, A. A., Hessein, E. M. (2013). Genetic Diversity among Egyptian Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Landraces in Agro-morphological Traits and Molecular Markers. *Asian Journal of Crop Science*, 5, 106-124.
- Acquaah, G. (2012). *Principles of Plant Genetics and Breeding*. Wiley-Blackwell, Sussex, Inglaterra.
- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L. E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, *Ecología molecular* (págs. 541-566). Instituto Nacional de Ecología, Semarnat; Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). D. F., México.
- Altuve, E. M., Royo Pallares, O., Pizzio, R. M. (1994). Pasto Nilo (*Acroceras macrum* S.). Una buena forrajera para campos bajos subtropicales. *INTA: Noticias y Comentarios*, 293, 1-3.
- Altuve, S. M., Bendersky, D. (2003). Pasturas y verdeos en Corrientes, establecimiento y producción. *INTA: Noticias y Comentarios*, 379, 1-3.
- Anderson, M., Cameron, D. G., Dear, B. S., Halling, M., Hoare, D., Frame, J., y otros. *www.fao.org*. Recuperado el 1 de Agosto de 2014, de Grassland and Pasture Crops Web Site: <http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/gbase/data/Pf000173.HTML>
- Anton, A. M., Cocucci, A. E. (1984). The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 146, 117-121.
- Armando, L. V., Carrera, A. D., Tomas, M. A. (2013). Collection and morphological characterization of *Panicum coloratum* L. in Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 1737-1747.
- Assefa, K., Merker, A., Tefera, H. (2003). Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Succ.) Trotter]. *Hereditas*, 139, 174-183.
- Aversano, R., Ercolano, M. R., Caruso, I., Fasano, C., Rosellini, D., Carputo, D. (2012). Molecular Tools for Exploring Polyploid Genomes in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 10316-10335.
- Balzarini, M., Di Rienzo, J. (2004). *Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos*. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Córdoba, Argentina.
- Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., Robledo, C. (2008). *Manual del Usuario*. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Barret, S. C., Harder, L. D., Worley, A. C. (1996). The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 351, 1271-1280.
- Barringer, B. C. (2007). Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany*, 94(9), 1527-1533.
- Becerra, V., Paredes, M. (2000). Marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad

genética. *Agricultura Técnica*, 60, 270-281.

Bedinger, P. (1992). The Remarkable Biology of Pollen. *The Plant Cell*, 4, 879-887.

thaud, J. (2001). Apomixis and the Management of genetic diversity. En Y. Savidan, J. G. Carman, T. Dresselhaus, *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering* (págs. 8-23). D. F., México.

ges do Valle, C., Savidan, Y. H. (1998). Genética, Citogenética y Biología Reproductiva de Brachiaria. En J. W. Miles, B. L. Maass, C. Borges do Valle, V. Kumble (Edits.), *Brachiaria: biología, agronomía y mejoramiento* (pp. 163-180). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC).

wn, W. V., Emery, W. H. (1958). Apomixis in the *Gramineae: Panicoideae*. *American Journal of Botany*, 45(4), 253-263.

Brugnoli, E. A., Urbani, M., Quarin, C. L., Zilli, A. L., Martínez, E. J., Acuña, C. A. (2014). Diversity in Apomictic Populations of *Paspalum simplex* Morong. *Crop Science*, 54(4), 1656-1664.

Budak, H., Shearman, R. C., Parmaksiz, I., Dweikat, I. (2004). Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 280-288.

Caponio, I. (2000). Estudios citoembriológicos en *Setaria pflanzii* Pensiero. *11º Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Caponio, I. (2002). Estudios citogenéticos de tres especies de *Digitaria* de la sección Trichachne. *13º Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas*. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Caponio, I., Pensiero, J. F. (2002). Comportamiento citológico y reproductivo de *Setaria pflanzii* (*Poaceae*). *Darwiniana*, 40(1-4), 17-23.

Carino, D. A., Daehler, C. C. (1999). Genetic variation in an apomictic grass, *Heteropogon contortus*, in the hawaiian islands. *Molecular Ecology*, 8(12), 2127-2132.

Carvalho, M. A., Quesenberry, K. H. (2009). Morphological characterization of the USA *Arachis pintoi* Krap. and Greg. collection. *Plant Systematics and Evolution*, 277, 1-11.

Castillo Cobían, A. (2007). La selección natural a nivel molecular. En L. E. Eguarte, V. Souza, X. Aguirre, *Ecología Molecular* (págs. 11-48). Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). D. F., México

Chalup, L., Seijo, G. (2005). Análisis meiótico en *Lathyrus nervosus* Lam. (*Viceae, Leguminosae*). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina*.

Charlesworth, D. (2006). Evolution of Plant Breeding Systems. *Current Biology*, 16, 726-735.

Chávez, J. L. (2003). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica. En T. L. Franco, R. Hidalgo (Edits.), *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. *Boletín técnico N° 8* (págs. 72-77). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. Editorial del IPGRI, Roma Italia.

- n, L., Guan, L. (2014). The apomixis-specific phenomenon: appearance of aposporous embryo sac initial cell (AIC), AIC-derived embryo sac formation and embryogenesis without fertilization in apomictic Guinea Grass (*Panicum maximum*). *International Journal of Development Research*, 4(3), 403-409.
- Cidade, F. W., Dall'Agnol, M., Bered, F., Souza-Chies, T. T. (2008). Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (*Panicaceae: Panicoideae*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 235–246.
- Cidade, F. W., Souza-Chies, T. T., Souza, F. H., Batista, L. A., Dall'Agnol, M., Valls, J. F., y otros. (2010). Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (*Poaceae*) and cross-amplification in other species. *American Journal of Botany*, 97, 107-110.
- Cidade, F. W., Vigna, B. V., Souza, F. H., Valls, J. F., Dall'Agnol, M., Zucchi, M. I., y otros. (2013). Genetic variation in polyploid forage grass: Assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. *BMC Genetics*, 14(50), 1-18.
- Cocucci, A. E., Hunziker, A. T. (1994). *Los ciclos biológicos del Reino Vegetal*. Academia Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- ne, C. F. (2001). Classification of Apomictic Mechanisms. En Y. Savidan, J. G. Carman, T. Dresselhaus, *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering* (págs. 25-43). D. F., México.
- Cubero, J. I. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Da Costa, M. L., Barbosa Amorim, L. L., Onofre, A. V., Tavares de Melo, L. J., de Oliveira, M. B., Carvalho, R., y otros. (2011). Assessment of Genetic Diversity in Contrasting Sugarcane Varieties Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *American Journal of Plant Sciences*, 2, 425-432.
- Darlington, C. D. (1937). *Recent advances in cytology*. P. Blakiston's Son & co., inc. Pensilvania, U.S.A.
- Daurelio, L. D., Espinoza, F., Quarin, C. L., Pessino, S. C. (2004). Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematics and Evolution*, 244, 189-199.
- Davidse, G., Phol, R. W. (1978). Chromosome numbers of tropical american grasses (*Poaceae*): 5. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 65, 637-649.
- De Lima, R. S., Daher, R. F., Gonçalves, L. S., Rossi, D. A., do Amaral, A. T., Pereira, M. G., y otros. (2011). RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of elephant grass. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1304-1313.
- Wet, J. M., Anderson, L. J. (1956). Chromosome Numbers in Transvaal Grasses. *Cytologia*, 21, 1-10.
- Detmann, E., Coelho da Silva, J. F., Maldonado Vásquez, H., Toledo Henriques, L., Ramalho Haddade, I. (2009). Cinética da degradação ruminal dos carboidratos de quatro gramíneas tropicais em diferentes idades de corte e doses de adubação nitrogenada: técnica de produção de gases. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(1), 149-158.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Robledo, C. *InfoStat*

versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- Do Valle, C. B., Savidan, Y. H., Jank, L. (1989). Apomixis and sexuality in *Bracharia decumbens* Stapf. XVI International Grassland Congress, (págs. 407-408). Nice, France.
- Echenique, V., Pessino, S. C., Meier, M., Selva, J. P., Ochogavía, A., Zappacosta, D., y otros. (2012). Apomixis en *Eragrostis curvula*. *Ciencias Agronómicas*, 20, 77.
- Equipo del área de Estudios de Suelos (2010). Claves para la Taxonomía de Suelos. (C. A. Ortiz-Solorio, M. d. Gutiérrez-Castorena, E. V. Gutiérrez-Castorena, Trads.) Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A.); Servicio de Conservación de Recursos Naturales (N.R.C.C.).
- Espinoza, F., Daurelio, L. D., Pessino, S. C., Valle, E. M., Quarín, C. L. (2006). Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution*, 258(3-4), 147-159.
- Farsani, T. M., Etemadi, N., Sayed-Tabatabaei, B. E., Talebi, M. (2012). Assessment of Genetic Diversity of Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) Using ISSR Markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 383-392.
- Ferrari, D. M., Pozzolo, O. R. (2009). *Desarrollo de un Software para Estimación de Cobertura Vegetal*. INTA. Concepción del Uruguay, Sitio Argentino de Producción Animal, Entre Ríos, Argentina.
- Ferreira, J. J., Garcia-González, C., Tous, J., Rovira, M. (2010). Genetic diversity revealed by morphological traits and ISSR markers in hazelnut germplasm from northern Spain. *Plant Breeding*, 129, 435-44.
- Filiz, E., Ozdemir, B. S., Budak, F., Vogel, J. P., Tuna, M., Budak, H. (2009). Molecular, morphological and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. *Genome*, 52, 876-890.
- Foy, C. D., Farina, M. P., Oakes, A. J. (1998). Iron-manganese interactions among clones of Nilegrass. *Journal Of Plant Nutrition*, 21(5), 987-1009.
- Fu, X. P., Ning, G. G., Gao, L. P., Bao, M. Z. (2008). Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Scientia Horticulturae*, 117, 263-270.
- Fufa, H., Baenziger, P., Beecher, B. S., Dweikat, I., Graybosch, R., Eskridge, K. (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*, 145, 133-146.
- Ganopoulos, I. V., Merkouropoulos, G., Pantazis, S., Tsipouridis, C., Tsiftaris, A. (2011). Assessing molecular and morpho-agronomical diversity and identification of ISSR markers associated with fruit traits in quince (*Cydonia oblonga*). *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 2729-2746.
- Ganopoulos, I., Konstantinos, K., chatzicharisis, I., Karayiannis, I., Tsiftaris, A. (2011). Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. *Euphytica*, 181(2), 237-251.
- Gertenbach, W. D., van H. Henning, P. W., van Schalkwyk, A. P. (1995). Performance of beef steers on Smuts finger grass and Nile grass pasture in northern Natal. 1. Effect of



- overwintering level and summer stocking rate. *South African Journal of Animal Science*, 25(4), 95-100.
- Goicoechea, P. G., Giraldez, R. (1996). Plant chromosomes at meiosis. In K. Fukui, S. Nakayama, *Plant chromosomes, Laboratory Methods* (págs. 19-33). CCR Press, Boca Raton, Florida.
- González, A., Aguirre, X. (2007). Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). En L. E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, *Ecología Molecular* (págs. 567-571). Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). D. F., México.
- Goulão, L., Valdivieso, T., Santana, C., Moniz Oliveira, C. (2001). Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48, 329-338.
- Gulsen, O., Sever-Mutlu, S., Mutlu, N., Tuna, M., Karaguzel, O., Shearman, R. C., y otros. (2009). Polyploidy creates higher diversity among *Cynodon* accessions as assessed by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics: International Journal of Plant Breeding Research*, 118, 1309–1319.
- Gupta, P. K., Yashvir, Y. (1973). Abnormal Meiosis in hexaploid *Setaria verticillata*. *Phyton*, 15, 31-36.
- Honfi, A., Quarin, C. L. (2012). Diplosporia concomitante con aposporia en *Paspalum* L. *Ciencias Agronómicas*, 20, 47.
- hino, T., Davidse, G. (1988). Chromosome numbers of grasses (*Poaceae*) from southern Africa. I. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75(3), 866-873.
- Hsu, S. H., Chang, F. R., Hong, K. Y. (2005). Effect of Cutting Stage on Forage Yield and Quality of Nilegrass and Pangolagrass. *Crop, Environment & Bioinformatics*, 2, 282-286.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. (2008). *Avances en la investigación agrícola, pecuaria, forestal y acuícola en el trópico mexicano, 2008. Libro Científico N° 5*. Veracruz, México.
- Jackson, R. C. (1982). Polyploidy and Diploidy: New Perspectives on Chromosome Pairing and Its Evolutionary Implications. *American Journal of Botany*, 69(9), 1512-1523.
- Jackson, R. C., Casey, J. (1982). Cytogenetic Analyses of Autopolyploids: Models and Methods for Triploids to Octoploids. *American Journal of Botany*, 69(4), 487-501.
- Jarret, R., Liu, Z., Webster, R. (1998). Genetic diversity among *Paspalum* spp. as determined by RFLPs. *Euphytica*, 104, 119–125.
- Jiménez, P., Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 9(2), 237-248.
- Johri, B. M. (1984). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- Jungmann, L., Vigna, B., Boldrini, K., Sousa, A., do Valle, C., Resende, M., y otros. (2010). Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits,

and geographical origin. *Genome*, 53, 698-709.

- Kalpana, D., Choi, S. H., Choi, T. K., Senthil, K., Lee, Y. S. (2012). Assessment of genetic diversity among varieties of mulberry using RAPD and ISSR fingerprinting. *Scientia Horticulturae*, 134, 79-87.
- Kang, S. Y., Lee, G. J., Lim, K. B., Lee, H. J., Park, I. S., Chung, S. J., y otros. (2008). Genetic diversity among korean Bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes characterized by morphological, cytological and molecular approaches. *Molecules and Cells*, 25(2), 163-171.
- Kosman, E., Leonard, K. J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology*, 14, 415-424.
- Lacadena, J. R. (1996). Variaciones cromosómicas numéricas I. Poliploidía. En J. R. Lacadena, *Citogenética*. Editorial Complutense. Madrid, España.
- Leblanc, O., Peel, M. D., Carman, J. G., Savidan, Y. (1995). Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (*Poaceae*). *American Journal of Botany*, 82(1), 57-63.
- Lee, Y. J., Yang, C. M., Hong, K. Y., Hsu, F. H. (2004). Modeling Climatic Effects on Forage Production of *Acroceras macrum*. *Crop, Environment & Bioinformatics*, 1, 39-46.
- Lee, Y. J., Yang, C. M., Hong, K. Y., Hsu, F. H. (2005). Using weather data to estimate forage production of Nilegrass. *crop, Environment, and Bioinformatics*, 2, 245-254.
- Li, H., Liu, L., Lou, Y., Hu, T., Fu, J. (2011). Genetic diversity of Chinese natural bermudagrass (*Cynodon dactylon*) germplasm using ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 127, 555-561.
- Ligarreto, G. (2003). Caracterización de germoplasma. En T. L. Franco, R. R. Hidalgo (Edits.), *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico N° 8* (págs. 77-79). Instituto internacional de recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. Editorial del IPGRI, Roma, Italia.
- Lin, J. B., Lee, M. C., Chang, S. R., Hsu, F. H. (2004). Comparison of digestibility and metabolizable energy between Nilegrass and pangola grass. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*.
- Lloyd, D. G., Schoen, D. J. (1992). Self and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Science*, 153(3), 358-369.
- Loidl, J. (1995). Meiotic Chromosome Pairing in Triploid and Tetraploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 139, 1511-1520.
- Lovisoló, M. R. (2011). *Estudios embriológicos sobre algunas gramíneas nativas útiles (Poaceae) presentes en la Depresión del Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.
- Lynch, M., Milligan, B. G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3, 91-99.

- Maheshwari, P. (1950). *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York, Estados Unidos de América.
- Mahmoud, A. M., Abdel-Fatah, B. E. (2012). Analysis of Genetic Diversity among Sunflower Genotypes using Agro-morphological Traits and Molecular Markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(13), 419-432.
- Mandagaran, F., Losada, M., Borrajo, C. I., Storti, M. I. (2008). Crecimiento de gramíneas subtropicales en el noreste correntino. *INTA: Noticias y Comentarios*, 440, 1-7.
- Mandujano Sánchez, M. C. (2007). La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En L. E. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre, *Ecología Molecular* (págs. 215-250). Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. D. F., México
- Manifeto, M. M., Schlatter, A. R., Hopp, H. E., Suárez, E. Y., Dubcovsky, J. (2001). Quantitative Evaluation of Genetic Diversity in Wheat Germplasm Using Molecular Markers. *Crop Science*, 41, 682-690.
- Matteucci, S. D., Morello, J. (11 de Abril de 2001). EcoPortal.net. Recuperado el 18 de Septiembre de 2014, de [www.ecoport.net/content/view/full/21385](http://www.ecoport.net/content/view/full/21385)
- Meirmans, P. G., Van Tienderen, P. H. (2004). Genotype and Genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 4, 792-794.
- Mesén, F. (1998). La variación natural como base para el mejoramiento genético forestal. En L. F. Jara, *Selección y manejo de fuentes semilleras en América Central y República Dominicana* (págs. 1-8). Danida forest Seed Center, DFSC-Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Mishra, S. (2005). *Plant Reproduction*. Discovery Publishing House Pvt. Ltd., Nueva Delhi, India.
- Mishra, S. R. (2009). *Understanding Plant Reproduction*. Discovery Publishing House Pvt. Ltd., Nueva Delhi, India.
- Moffett, A. A., Hurcombe, R. (1949). Chromosome numbers of South African grasses. *Heredity*, 3, 369-373.
- Mohammadi, S. A., Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. Review & interpretation. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
- Montoya Aramburu, M. A., Rodriguez, N., Pérez-Almeida, I., Marín, C. (2008). Identificación de descriptores morfológicos relevantes para la distinción de variedades y líneas élites de arroz venezolano con fines de protección intelectual. *Agronomía Tropical*, 58(3), 223-232.
- Morales-Nieto, C. R., Quero-Carrillo, A., Pérez-Pérez, J., Hernández-Garay, A., Le-Blanc, O. (2008). Caracterización morfológica de poblaciones nativas de Pasto Banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] en México. *Agrociencia*, 42(7), 767-775.
- Morrone, O., Zuloaga, F. O. (1995). *Poaceae*, parte 1. 18. Tribu *Panicaceae*, parte A. En *Flora Fanerogámica Argentina*. Programa Proflora. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

- Muniyamma, M. (1978). Variations in micro sporogenesis and the development of embryo sacs in *Echinochloa stagnina* (Gramineae). *Botanical Gazette*, 139(1), 87-94.
- Muthusamy, S., Kanagarajan, S., Ponnusamy, S. (2008). Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(3), 32-41.
- Nageswara-Rao, M., Stewart, C. N., Kwit, C. (2012). Genetic diversity and structure of natural and agronomic switchgrass (*Panicum virgatum* L.) populations. *Genetics Resources and Crop Evolution*.
- Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Mousapour Gorji, A., Hegedüs, G., Taller, J. (2012). PICcalc: An Online Program to Calculate Polymorphic Information Content for Molecular Genetic Studies. *Biochemical Genetics*, 50, 670–672.
- Tomova, T. M., Vielle-Calzada, J. P. (2001). Ultrastructural analysis of apomictic development. En Y. Savidan, J. G. Carman, T. Dresselhaus, *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering* (págs. 44-63). D. F., México.
- Nei, M., Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76, 5269-5273.
- Norrmann, A. G., Quarin, C. L., Keeler, K. H. (1997). Evolutionary Implications of Meiotic Chromosome Behavior, Reproductive Biology, and Hybridization in 6x and 9x Cytotypes of *Andropogon gerardii* (Poaceae). *American Journal of Botany* 84(2): 201–207. 1997, 84(2), 201-207.
- Oliveira, B. A., Faria, P. R., Souto, S. M., Carneiro, A. M., Dobereiner, J., Aronovich, S. (1973). Identification of tropical grasses with the C4 pathway of photosynthesis from leaf anatomy. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Serie Agronómica*, 8, 267-271.
- Ordoñez, B. (2014). *Determinación de la Viabilidad y Fertilidad del Polen*. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- Orrillo, M., Bonierbale, M. (2009). *Biología reproductiva y citogenética de la papa – Manual Técnico*. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- Ortiz, A. M., Seijo, J. G., Lavia, G. (2006). Mecanismos meióticos involucrados en la reducción de la viabilidad y en la variación de morfología de los granos de polen de *Arachis glabrata* Benth. (Sección *Rhizomatosae*). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina*.
- Ozias-Akins, P. (2006). Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 199–214.
- Pagliarini, M. S., Valle, C. B., Santos, E. M., Bernardo, Z. H., Mendes-Bonato, A. B., Silva, N., y otros. (2012). Microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) as a selection tool for breeding. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 1309-1318.
- Pandey, A., Mishra, R. K., Mishra, S., Singh, Y. P., Pathak, S. (2011). Assessment of Genetic Diversity among Sugarcane Cultivars (*Saccharum officinarum* L.) using Simple Sequence Repeats Markers. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 11(4), 105-111.
- Paplauskienė, V., Dabkevičienė, G. (2012). A study of genetic diversity in *Trifolium hybridum*

- varieties using morphological characters and ISSR markers. *Žemdirbystė Agriculture*, 99(3), 313–318.
- Pareja Ordóñez, N. M., Santacruz Ordóñez, N. K., Ordóñez Jurado, H. R., Lagos Burbano, T. C. (2010). Comportamiento meiótico de diferentes especies de lulo, *Solanum* sp. *Acta Agronómica*, 59(4), 394-400.
- Peng, Y., Zhang, X., Ma, X. (2008). Evaluation of genetic diversity in wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) based on AFLP markers. *Hereditas*, 145, 174-181.
- Pereira da Silva, M. M., Maldonado Vasquez, H., Bressan-Smith, R., Coelho da Silva, J. F., D'Avila Erbesdobler, E., Cruz de Andrade, P. S. (2006). Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(1), 67-74.
- Pereira, A. V., Borges do Valle, C., Ferreira, R. P., Miles, J. W. (2001). Melhoramento de forrageiras tropicais. En L. Nass, A. Valois, I. De Melo, M. Inglis-Valadares, Recursos Genéticos e Melhoramento - Plantas (págs. 549-601). Fundação MT. Cuiabá, Brasil.
- Pizzio, R., Royo Pallarés, O., Sampedro, D., Aguilar, D., Cetrá, V., Zapata, P. (2004). *Unidad de cría y recría de bovinos en ambiente de Malezal*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Mercedes Corrientes.
- Poeaim, A., Sukhawat, S., Arananant, J., Pongtongkam, P. (2008). Induction embryogenic callus and plant regeneration of Nile grass (*Acroceras macrum*). *Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference*, (págs. 603-608). Tailandia.
- Pohelman, J., Sleper, D. A. (2003). *Mejoramiento Genético de las Cosechas*. Editorial Limusa S.A. D. F., Mexico
- Pohl, R. W., Davidse, G. (1971). Chromosome Numbers of Costa Rican Grasses. *Brittonia*, 23(3), 293-324.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., Siddiq, E. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
- Pupilli, F., Cáceres, M. E., Quarín, C. L., Arcioni, S. (1997). Segregation analysis of RFLP marker reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome*, 40, 822-828.
- Qian, W., Ge, S., Hong, D. Y. (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3), 440-449.
- Quarín, C. L., Norrmann, G. A., Espinoza, F. (1998). Evidence for autopolyploidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Hereditas*, 129, 119-124.
- Quarín, C. L., Espinosa, F., Martínez, E. J., Pessino, S. C., Bovo, O. A. (2001). A rice in ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*, 13, 243-249.
- Corro Carrillo, A. R., Enríquez Quiroz, J. F., Morales Nieto, C. R., Miranda Jiménez, L. (2010). Apomixis importance for tropical forage grass selection and breeding. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(1), 25-42.

- Rakoczy-Trojanowska, M., Bolibok, H. (2004). Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 221 – 238.
- Ramsey, J., Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 467–501.
- Ramsey, J., Schemske, D. W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Reviews in Ecology, Evolution and Systematics*, 33, 589-639.
- Rana, S. S., Kumar, S. (2014). *Research Techniques in Agronomy*. Department of Agronomy, College of Agriculture, CSK Himachal Pradesh Agricultural University, Palampur, India.
- Rebozzio, R. N., Rodríguez, M. P., Stein, J., Ortiz, J. P., Quarin, C. L., Espinoza, F. (2012). Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. *Molecular Breeding*, 29, 189-198.
- Rethman, N. F., de Witt, C. C. (1988). The yield potential and crude protein content of five rhizomatous and stoloniferous grass pastures in the escarpment areas of the eastern Transvaal. *South African Journal of Plant and Soil*, 5(4), 222-224.
- Reyno, R., Narancio, R., Speranza, P., Do Canto, J., López-Carro, B., Hernández, P., y otros. (2012). Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) native to Uruguay. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(8), 1823-1832.
- Rhind, J. M., Goodenough, D. C. (1979). *Acroceras macrum* stapf (Nile grass ) - A review. *Proceedings of the Annual Congresses of the Grassland Society of Southern Africa*, 14(1), 27-33.
- Rhind, J. M., Goodenough, D. C. (1979). *Acroceras macrum* Stapf (Nile grass)- A review. *Proceedings of the Grassland Society of Southern Africa*, 14, 27–36.
- Rhind, J., Goodenough, D. (1976). Assessment and breeding of *Acroceras macrum* Stapf. *Proceedings of the Annual Congresses of the Grassland Society of Southern Africa*, 11, 115-117.
- Richards, A. J. (1997). *Plant Breeding Systems*. Chapman & Hall, Londres, Inglaterra.
- Richards, A. J. (2003). Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 385, 1085–1093.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M. S., Borges do Valle, C. (2006). Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (*Poaceae: Paniceae*). *Genetics and Molecular Research*, 5(4), 837-845.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M. S., Borges do Valle, C. (2009). Microsporogenesis in *Brachiaria bovonei* (Chiov.) Robins and *B. subulifolia* (Mez) Clayton (*Poaceae*). *Science Agriculturae*, 66(5), 691-696.
- Rodrigues, R. C., Leite Reis, J. C., Coelho, R. W. (2004). Avaliação químico-bromatológica da silagem pré-secada de Capim Nilo (*Acroceras macrum*), cortado em três idades de corte e três tempos de emurchecimento. *Comunicado Técnico EMBRAPA*, 95, 1-2.

- Rodrigues, R. C., Leite Reis, J. C., Lopes da Costa, N. (2005). Qualidade do feno de capim nilo (*Acroceras macrum*) cortado em diferentes épocas. *Comunicado técnico EMBRAPA*, 108.
- Rojas, W. (2003). Análisis multivariado en estudios de variabilidad genética. En T. L. Franco, R. Hidalgo (Edits.), *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico N° 8* (págs. 85-87). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. Editorial del IPGRI, Roma, Italia.
- Royo Pallarés, O., Altuve, S. M. (2000). Forrajeras subtropicales para la provincia de Corrientes. *INTA: Noticias y Comentarios*, 337, 1-4.
- Royo Pallarés, O., Goldfarb, C. (2000). Experiencias con pasturas subtropicales cultivadas en la provincia de Corrientes. *Jornada de Actualización en Forrajeras Subtropicales*, (págs. 1-14). Estación Experimental Agropecuaria Mercedes, Corrientes, Argentina.
- Rustishausen, A. (1982). *Introducción a la embriología y al Biología de la reproducción en las Angiospermas*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Salisbury, F. B., Ross, C. W. (2000). *Fisiología de las plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Thomson Editores Spain-Paraninfo S. A. Madrid, España.
- Sampedro, D., Bendersky, D., Pizzio, R. (2007). Serie Técnica N° 41: Alternativas forrajeras para la integración de la recría o la terminación de novillos en los sistemas de cría del centro-sur de Corrientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), E.E.A. Mercedes (Corrientes.), Argentina.
- Sartor, M. E., Rebozzio, R. N., Quarin, C. L., Espinoza, F. (2013). Patterns of genetic diversity in natural populations of *Paspalum* agamic complexes. *Plant Systematics and Evolution*, 299(7), 1295-1306.
- Sarwat, M., Das, S., Srivastava, P. S. (2008). Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant Cell Reports*, 27, 519–528.
- Savidan, Y. H. (1982). Embryological Analysis of Facultative Apomixis in *Panicum maximum* Jacq. *Crop Science*, 22, 467-469.
- Segura, S. (2003). Divergencias morfológicas interespecíficas del subgénero *Tacsonia* (*Passiflora*). En T. L. Franco, R. Hidalgo (Edits.), *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico N° 8* (págs. 80-84). Instituto internacional de recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. Editorial del IPGRI, Roma, Italia.
- Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., Papa, R. (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding*, 124, 464-472.
- Singh, S., Kumar Panda, M., Nayak, S. (2012). Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 284–291.
- Skerman, P. J., Riveros, F. (1990). The Tropical Grasses Catalogue. *Acroceras macrum* Stapf. En P. J. Skerman, F. Riveros, *Tropical Grasses, FAO plant production and protection series; no. 23* (págs. 181-184). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia.

- Sollenberger, L. E., Cherney, D. J. (1995). Evaluating forage production and quality. En R. F. Barnes, D. A. Miller, C. J. Nelson, *Forages, Vol II: The Science of Grassland Agriculture* (págs. 97-110). Iowa Estate University Press. Ames, Iowa.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2009). The Role of Hybridization in Plant Speciation. *The Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Souza, E., Sorrells, M. E. (1991). Relationships among 70 North American Oat Germplasms: II. Cluster Analysis Using Qualitative Characters. *Crop Science*, 31, 605-612.
- Stebbins, G. L. (1947). Types of polyploids: Their classification and significance. *Advances in Genetics*, 1, 403-429.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A. F. (2004). *Tratado de Botánica* (Actualizada por P. Sitte, E. W. Weiler, J. W. Kadereit, A. Bresinsky, C. Korner.). Editorial Omega S. A. Barcelona, España.
- Sukhawat, S., Poeaim, A. (2008). Plant Regeneration from Cell Suspension Culture of Nilegrass (*Acroceras macrum*). *Agricultural Science Journal*, 39 (3.), 556-559.
- Sukhawat, S., Poeaim, A. (2009). Efficiency of gene transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in node tissue on nilegrass (*Acroceras macrum*). *Journal of ISSAAS*, 15(1), 233-234.
- Theron, E. P., Arnott, J. K. (1979). Notes on the performance of *Acroceras macrum* Stapf cv. Cedara select in natal. *Proceedings of the Annual Congresses of the Grassland Society of Southern Africa*, 14(1), 23-25.
- Tiessen Favier, A. (2012). *Fundamentos de mejoramiento genético vegetal-Conceptos básicos de genética, biología molecular, bioquímica y fisiología vegetal*. Editorial Académica Española. Madrid, España.
- nniessen, G. H. (2001). Feeding the World in the 21st Century: Plant Breeding, Biotechnology, and the Potential Role of Apomixis. En Y. Savidan, J. G. Carman, T. Dresselhaus, *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering* (págs. 1-7). CIMMYT, D. F., México.
- Toniolo Pozzobon, M., Glatze, A., Conterato, I. F., Schiffino-Wittmann, M. T., Grudsinske Smiderle, V. (2006). Variation in chromosome number and its relationship with agronomic characteristics in a germplasm collection of *Digitaria eriantha sensu lato*. *Tropical Grasslands*, 40, 157–164.
- Trognitz, B. R. (1991). Comparison of different pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids. *Euphytica*, 56(2), 143-148.
- Van Schalkwyk, A. P., Gertenbach, W. D. (2000). The effect of closing date on the performance of beef weaners grazing foggaged *Digitaria eriantha* and *Acroceras macrum*. *South African Journal of Animal Science*, 30(1), 82-86.
- Vogel, K. P., Burson, B. L. (2004). Breeding and genetics. En L. E. Moser, B. L. Burson, L. E. Sollenberger. *Warm-season (C4) grasses* (Vol. 45 in the series Agronomy). ASA, CSSA, SSSA. Madison, Wisconsin, USA.
- Wang, B. Y., Ruan, Z. Y. (2012). Genetic diversity and differentiation in *Camellia reticulata* (*Theaceae*) polyploid complex revealed by ISSR and ploidy. *Genetic and Molecular Research*, 11(1), 503-511.



- Wang, Z., Liao, L., Yuan, X., Guo, H., Guo, A., Liu, J. (2013). Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 108–115.
- Watson, L., Dallwitz, M. J. (1992). *The Grass Genera of the World*. C. A. B. International. Wallingford, Oxon, UK.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in plants. Principles, methods and applications*. Taylor & Francis Group CRC Press. New York, USA.
- Wen, C., Chen, T., Hsu, F., Lu, C., Lin, J., Chang, C. H., y otros. (2007). A high loading overland flow system: Impacts on soil characteristics, grass constituents, yields and nutrient removal. *Chemosphere*, 67, 1588-1600.
- Wen, X. S., Ye, X., Q., L. Y., Chen, Z. L., Xu, S. X. (1998). Embryological Studies on Apomixis in *Pennisetum squamulatum*. *Acta Botanica Sinica*, 40(7), 598-604.
- Wolff, K., Morgan-Richards, M. (1998). PCR markers distinguish *Plantago* major subspecies. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 282-286.
- Yang, C. M., Lee, Y. J., Hong, K. Y., Hsu, F. H. (2000). Estimation of Forage Production of Nilegrass Using Vegetation Reflectance. *Crop Science*, 47, 1647–1651.
- Young, B., Sherwood, R., Bashaw, E. (1979). Cleared pistil and thick sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1668-1672.
- Zuloaga, F. O., Morrone, O., Saenz, A. A. (1987). Estudio exomorfológico e histofoliar de las especies americanas del género *Acroceras* (*Poaceae: Paniceae*). *Darwiniana*, 28(1-4), 191-217.