

## CARACTERIZACION GENETICA Y FILOGENETICA DEL GENERO *Paspalum* A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES

J. Pereira<sup>1</sup>, A. Fajardo<sup>1</sup> y V. Sabbía<sup>1</sup>.

Recibido: 28 de mayo de 1999. Aceptado: 13 de julio de 1999.

### RESUMEN

*Paspalum* es un importante género de la familia Gramíneas que incluye algunas gramíneas útiles como forrajeras. Varias de las especies son poliploides y no se ha encontrado variabilidad en poblaciones naturales de importancia. Con la finalidad de investigar la diversidad, ploidía, relaciones filogenéticas y caracterizar nuevos híbridos, se aplicaron 24 «primers» de 10 pb para amplificar al azar vía PCR segmentos polimórficos de ADN (RAPD). Diez y seis de ellos se encontraron que fueron capaces de producir perfiles de bandas discretos y distinguieron entre materiales di, tetra, penta y hexaploides. Como fuente de ADN se utilizó tejido de hojas individuales de tal forma que el valor taxonómico de cada material fuera conservado. Los perfiles RAPD en las plantas estudiadas, permitieron distinguir entre las especies di, tetra, penta y hexaploides. Clones sexuales e híbridos interespecíficos fueron distinguidos de sus progenitores. Todos los resultados fueron consistentes al ser analizados mediante distancias genéticas, análisis filogenéticos y multivariados. A nivel intraespecífico *P. dilatatum* ssp. *flavescens* mostró variabilidad entre las accesiones estudiadas lo que está en concordancia con sus características fenotípicas. La metodología descrita y los resultados que se presentan en este trabajo pueden ser aplicados para caracterizar poblaciones de *P. dilatatum*, identificar progenies provenientes de programas de cruzamiento en *Paspalum* y explorar mas en profundidad otras relaciones filogenéticas dentro de este género.

**PALABRAS CLAVE:** *Paspalum*, ADN, RAPD, PCR, filogenia, análisis multivariado, poblaciones.

### SUMMARY

#### GENETIC AND PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION IN THE GENUS *Paspalum* USING MOLECULAR MARKERS.

*Paspalum* is an important genus of the family Gramineae which includes several valuable forage grasses. Many of the species are polyploid and no important levels of variability have been found in naturally occurring populations. In order to investigate the diversity, ploidy, phylogenetic relationships and characterize new hybrids, 24 decameric primers were applied for random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Sixteen primers were found to be suitable to produce discrete profiles and distinguished among, di, tetra, penta and hexaploid materials. Leaf tissue of individual plants was used as the source of DNA so that the taxonomic value of each species was conserved. RAPD profiles, with the plants tested, distinguished among species di, tetra, penta and hexaploids. Sexual clones and interspecific hybrids were distinguished from progenitors. All the results were consistent in the genetic distances, phylogenetic, and multivariate analysis. At the intraspecific level, *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, showed genetic variability among accessions which is in agreement with phenotypic characters. The methodology described and the results presented in this study can be applied to the characterization of *P. dilatatum* populations, to identify hybrid progenies in *Paspalum* breeding programs and to explore further phylogenetic relationships within this genus.

**KEY WORDS:** *Paspalum*, ADN, RAPD, PCR, phylogeny, multivariate analysis, populations.

<sup>1</sup> Cátedra de Genética. Area Ciencias Biológicas. Facultad de Agronomía.

Correspondencia: Jorge Pereira, Cátedra de Genética. Area Ciencias Biológicas. Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780 CP 12900 Montevideo - Uruguay. Fax. 0598 2 3093004 E-mail:jeep@fagro.edu.uy.

## INTRODUCCION

El conocimiento de especies forrajeras nativas en sus aspectos básicos, debe dejar de ser visto como una formalidad y ser considerado de vital importancia. Si se pretende aumentar los niveles de productividad de la pecuaria uruguaya, el primer elemento a tener en cuenta es mejorar la alimentación del ganado. En algunos casos el uso de especies nativas con fines de mejoramiento puede tener mejores resultados que los obtenidos con la introducción de plantas exóticas. Esta situación ha sido probada durante el invierno, cuando se han introducido materiales tropicales en regiones de clima más frío, como es el caso de nuestro país.

En Uruguay, país agrícola-ganadero, el estudio del potencial productivo y sistema de reproducción de gramíneas y leguminosas nativas es de capital importancia ya que más del 85% de la superficie útil del país está ocupado por pasturas naturales. Algunas gramíneas como *Paspalum* y *Panicum* constituyen complejos agámicos; como en estos grupos algunos de los materiales promisorios son apomícticos, el uso de líneas sexuales son fundamentales como forma de romper esas barreras reproductivas e introducir características deseadas. Varias gramíneas forrajeras tienen su centro de diversidad en una región donde está comprendido nuestro país. Uno de los géneros con alto potencial económico y productivo es *Paspalum*, particularmente el grupo **Dilatata**, que incluye especies de alto valor forrajero reconocido a nivel mundial. Dentro de éstas se encuentra *P. dilatatum* Poir., especie que puede ser incluida en mezclas forrajeras, capaz de reducir el ingreso de malezas y limitar la competencia de leguminosas en primavera y verano (Santiñaque, 1979). Considerándose que entre los materiales con mayor potencial forrajero del género *Paspalum* muchos son apomícticos, otros presentan baja producción y viabilidad de semillas, además de susceptibilidad a fitopatógenos, resulta imprescindible estudiar la variabilidad genética de los mismos y principalmente establecer su filogenia con vista a futuros trabajos de mejoramiento.

*Paspalum dilatatum* Poir. es una especie anfiploide natural de origen híbrido, cuyo citotipo «Común» tiene 50 cromosomas (Bashaw y Forbes, 1958) y su probable fórmula genómica es **IIJX** ( $10\Pi+10JJ+10X$ ) (Burson 1983). Este mismo autor (op. cit) planteó las relaciones filogenéticas de diferentes especies de *Paspalum* de acuerdo a los datos citogenéticos y taxonómicos que se poseían, haciendo hincapié en su relación con el posible origen de *P. dilatatum* Poir. «Común».

En Uruguay el Ing. Agr. J.C. Millot introdujo en La Estanzuela (INIA) plantas del ecotipo «Molles Grande» (Paysandú) del cual obtuvo el cultivar «Chirú» que posee apomixis facultativa (Millot, 1977) y 60 cromosomas (Albicette, 1980). En plantas «fuera de tipo» descendientes de «Chirú», se detectó por pruebas de progenie y estudio de

sacos embrionarios el comportamiento sexual de las mismas (Izaguirre y Ziliani, 1979). De estas plantas se obtuvieron nuevas fuentes de sexualidad y nuevos clones apomícticos. En un programa de cruzamientos se obtuvo el híbrido «Cundidor» (*P. dilatatum* L.E.69.12 x *P. proliferum*) que presenta 80 cromosomas. Por su parte Dighiero (1989) encontró en este material una fertilidad alta, comparada con otros materiales afines. La promisoriedad de este híbrido que reúne ventajas de ambos progenitores, señala las amplias posibilidades de intercambio de material genético y mejoramiento en el género *Paspalum*.

En los hechos *Paspalum dilatatum* «Común» es el centro de interés de varios programas de mejoramiento en función de su potencial forrajero. Se han realizado investigaciones tendientes a desarrollar la tecnología apropiada para la producción de semilla (García, 1971; Coll, 1991), así como estudios sobre su comportamiento reproductivo en distintos medios ambientes del País (Millot et al., 1990). No obstante, este biotipo continúa siendo poco usado por los productores, por su relativamente baja calidad (fertilidad) de semilla.

Múltiples metodologías han sido empleadas para caracterización genética en gramíneas: embriología, citogenética, isoenzimática, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) y últimamente análisis de Repetidos de Secuencia Simple (SSR-Microsatélites). Las técnicas de caracterización genética a partir de marcadores isoenzimáticos son aplicadas con gran frecuencia en gramíneas. Trabajos con enfoques filogenéticos y poblacionales se han realizado anteriormente tanto en *Bromus* (Ainouche et al. 1995) como en *Paspalum dilatatum* (Hickenbick, et al. 1992; De Souza-Chies, 1992; Casa, 1995; Ortiz, et al. 1997; Pereira et al. 1997a, b, 1998). Cada una de éstas técnicas han mostrado su potencialidad como generadora de marcadores genéticos, pero las limitantes que presentaban las más clásicas (embriología, citogenética, isoenzimas) hacen imprescindible el desarrollo de otras metodologías con mayor poder de resolución. Esto sucede, sobre todo a nivel intraespecífico, en las especies apomícticas y los clones sexuales. Las técnicas moleculares alternativas muestran diferentes particularidades. Si bien la caracterización con microsatélites (SSR) resulta promisoriosa en *Paspalum vaginatum*, ( $2n = 2X = 40$ ) (**IIJJ**) (Liu et al., 1995), su alto costo y falta de especificidad con algunos genotipos presentes en los grupos que se desea caracterizar, han llevado a decidir la aplicación de RAPD. Esta técnica ya ha sido desarrollada para especies del grupo **Dilatata** y otras afines (Casa 1995; Ortiz et al. 1997), existiendo además una amplia gama de «primers» que se comercializan y permiten analizar amplias regiones del genoma vegetal.

En el presente trabajo se presenta el desarrollo de marcadores moleculares, como herramienta para determinar la información genética por la que están constituidos los ma-

teriales más comunes en el Uruguay del grupo *Dilatata*. También se analizan materiales que están en la base de la evolución de dicho grupo. A partir de los resultados obtenidos con esta técnica se aplicarán variados métodos de análisis que permitan dilucidar relaciones genéticas y evolutivas entre especies. Por otro lado se presenta información sobre los sistemas reproductivos de los distintos materiales y su herencia en cruzamientos de interés.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales Vegetales

#### 1-Extracción y cuantificación de ADN genómico total:

Se extrajo ADN de hojas frescas de las 44 plantas que representan los taxa del análisis RAPD (Tabla 1), según el protocolo de Ferreira y Grattapaglia (1996). La cuantifica

**Tabla 1.** Especies y accesiones de *Paspalum* estudiadas

Nº	Especie	Acces	Abrev	Origen
1	<i>P. intermedium</i>	7201	<i>P.interm</i>	Brasil-EMBRAPA
2	<i>P. jurgensii</i>	7200	<i>P.jurg<sub>v</sub></i>	Brasil-EMBRAPA
3		7019	<i>P.jurg<sub>19</sub></i>	R30 km 109,5 Bajada de Pena-Rivera Uruguay
4		7022	<i>P.jurg<sub>22</sub></i>	R30 km 108,4 Bajada de Pena-Rivera Uruguay
5	<i>P. dilatatum Virasoro</i>	7207	<i>Pdil<sub>vir</sub></i>	Argentina
6	<i>P. urvillei</i>	7199	<i>P.urv<sub>s</sub></i>	R 10 km 0,200. Solís-Maldonado Uruguay
7	<i>P. dilatatum ssp. pauciciliatum</i>	7533	<i>Pauci<sub>LA</sub></i>	Rocha, Est. Los Ajos- Uruguay.
8		7534	<i>Pauci<sub>P</sub></i>	Potrero EEFAS, Paysandú-Uruguay
9	<i>P. proliferum</i>	7354	<i>Prolif<sub>Rel</sub></i>	Est. El Relincho, San José-Uruguay
10		7355	<i>Prolif<sub>Fac</sub></i>	Fac. Agronomía - Montevideo-Uruguay
11	<i>P. dilatatum ssp. flavescens</i>	7550	<i>Pdf<sub>52</sub></i>	R8 km 102,4, Solís Maldonado-Uruguay
12		7552	<i>Pdf<sub>60</sub></i>	Sitio de Yasú, Dpto. de Lavalleja-Uruguay.
13		7219	<i>Pf<sub>1</sub><sup>*U<sub>S</sub></sup></i>	R 10 km 0,200. Solís-Maldonado-Uruguay
14		7554	<i>Pdf<sub>66B</sub></i>	R. 77 km 22,900, Florida-Uruguay
15		7548	<i>Pdf<sub>Araz</sub></i>	R1 Arazatí, Colonia-Uruguay
16		7217	<i>Pdf<sub>Art</sub></i>	Balneario Artilleros, Colonia-Uruguay
17		7549	<i>Pdf<sub>Lecq</sub></i>	Parque. Lecocq. Montevideo-Uruguay
18		7384	<i>Pdf<sub>Bat</sub></i>	Parque. Battle, Montevideo-Uruguay
19		7218	<i>Pdf<sub>1S</sub></i>	R 10 km 0,200. Solís, Maldonado-Uruguay
20		7204	<i>Pdf<sub>7</sub></i>	Millán y Sayago, Montevideo-Uruguay
21		7385	<i>Pdf<sub>1aPaz</sub></i>	La Paz, Canelones-Uruguay.
22	<i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i>	7404	<i>Pdd<sub>Melilla</sub></i>	Hamilton y Las Pitás, Melilla. Montevideo-Uruguay
23		7367	<i>Pdd<sub>59C</sub></i>	R8 km 145, Lavalleja-Uruguay.
24		7528	<i>Pdd<sub>63</sub></i>	Pta. Espinillo, Montevideo-Uruguay
25		7542	<i>Pdd<sub>31</sub></i>	Quebrada de los Cuervos, Cerro Largo-Uruguay
26		7529	<i>Pdd<sub>42</sub></i>	R8 km 34,4, Lavalleja-Uruguay
27	<i>P. dilatatum</i>	7536	<i>Pd<sub>Chirú</sub></i>	R26 km 113, Paysandú-Uruguay
28		7196	<i>Pd<sub>Torres</sub></i>	CENARGEN V13121-Brasil
29		7195	<i>Pd<sub>Urug</sub></i>	CENARGEN V12388-Brasil
30		7210	<i>Pd<sub>LE69122</sub></i>	LE69.12-Clon Sexual-Colonia-Uruguay
31		7208	<i>Pd<sub>LE691231</sub></i>	LE69.12.31-Clon Sexual-Colonia-Uruguay
32	<i>P. dilatatum Cundidor</i>	7155	<i>Pd<sub>Cund</sub></i>	L.E. 69.12xP. proliferum (Hib. de J.C. Millot)-Uruguay
33	<i>P. dilatatum ssp. flavescens x</i> <i>P. dilatatum Virasoro</i>	7383	<i>Pf<sub>1s</sub>xV</i>	<i>Pd.ssp.f</i> (7218) x <i>P. d. Virasoro</i> (7217)
34	<i>P. dilatatum Virasoro x</i> <i>P. dilatatum "Chirú"</i>	7382	<i>(VxCh<sub>4</sub>)1</i>	<i>(P. d. Virasoro</i> (7217) x <i>P.d. Chirú</i> (7536)-Clon4) Hib. 1
35	<i>P.dilatatumx Pd.spp. dilatatum</i>		<i>H<sub>1</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H1
36			<i>H<sub>2</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H2
37			<i>H<sub>3</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H3
38			<i>H<sub>4</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H4
39			<i>H<sub>5</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H5
40			<i>H<sub>6</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H6
41			<i>H<sub>7</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H7
42			<i>H<sub>8</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H8
43			<i>H<sub>9</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P. dilatatum ssp. dilatatum</i> H9
44			<i>H<sub>10</sub></i>	<i>P. dilatatum</i> LE 69.12 x <i>P.dilatatum ssp. dilatatum</i> H10

ción se realizó en gel de agarosa (0,8%) preparado con tampón TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) agregándose 0,4  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio, comparándose la intensidad del ADN extraído de cada muestra con un ADN patrón (10, 50, 200  $\mu\text{g/ml}$ ).

## 2- Amplificación de ADN via PCR y visualización:

El protocolo para RAPD-PCR fue basado en Williams et al. (1990) con modificaciones menores. La mezcla de reacción (10  $\mu\text{l}$ ) contiene 3.42  $\mu\text{l}$  de agua destilada autoclavada, 1,30  $\mu\text{l}$  de tampón 10x con  $\text{MgCl}_2$ , 1,04  $\mu\text{l}$  de de dNTP (2,5mM), 1.04  $\mu\text{l}$  de BSA (Stratagene, 10 mg/ml), 3  $\mu\text{l}$  de "primer" (5-7 ng/ml), 1U de Taq DNA polimerasa (LIFE TECHNOLOGIES) y 10 ng de la muestra de ADN a estudio. Las reacciones fueron contenidas en tubos Eppendorf de 0.5 ml y recubiertos con 50  $\mu\text{l}$  de aceite mineral. La amplificación vía PCR fue realizada en Termociclador de placa con 96 pocillos PTC-100, MJ Research Inc. usando el siguiente perfil de ciclos: : **Paso 1)** 92°C/1min, **Paso 2)** 35°C/1 min, **Paso 3)** 72°C/2 min, 40 Ciclos, **Extensión)** 72°C/7 min. Una centena de primers de 10 pb de secuencia arbitraria fueron aplicados del Kit de serie Operon Technologies, Inc., Alameda California. Veinticuatro de la centena utilizada dieron bandas reproducibles y fueron seleccionados para el uso (Tabla 2). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y visualizados usando el método de tinción del bromuro de etidio 0,4  $\mu\text{g/ml}$ . El tamaño de los fragmentos amplificados fue calculado por comparación con el marcador Ladder 1 kb entre 300 y 1500 pb (Gibco BRL). Todos los geles fueron fotografiados sobre luz ultravioleta con filme Polaroid. La repetitividad de los patrones de bandas RAPD fue controlada, así como los factores que afectaban el número de bandas generadas por primer. En un rango de concentración de ADN molde, p.ej: 5, 30, 70, 100, 150, 200, 250, y 30 ng/ $\mu\text{l}$ , concentraciones  $>/ 200$  ng/ $\mu\text{l}$  resultaron en

**Tabla 2.** Secuencia de nucleótidos de los 24 primers usados en este estudio. Los números y series corresponden a las referencias de OPERON Technologies, Inc., Alameda California

Primer	Secuencia	Primer	Secuencia
A10	GTGATCGCAG	R3	ACACAGAGGG
B19	ACCCCGAAG	R4	CCCGTAGCAC
D5	GGTCTACACC	R16	CTCTGCGCGT
G1	CTACGGAGGA	U15	ACGGGCCAGT
G5	CTGAGACGGA	W11	CTGATGCGTG
G6	GTGCCTAACC	X2	TTCCGCCACC
G11	TGCCCGTCGT	X4	CCGCTACCGA
G15	ACTGGGACTC	X12	TCGCCAGCCA
G18	GGCTCATGTG	X13	ACGGGAGCAA
G19	GTCAGGGCAA	X17	GACACGGACC
J5	CTCCATGGGG	Y4	GGCTGCAATG
K12	TGGCCCTCAC	Y15	AGTCGCCCTT
N12	CACAGACACC	Z12	TCAACGGGAC

un bajo número de bandas amplificadas, mientras que 5, 30 y 70 ng/ $\mu\text{l}$  de ADN dan el mismo número de bandas reproducibles. Entonces se seleccionó 10 ng/ $\mu\text{l}$  de ADN molde para todas las amplificaciones. Controles negativos fueron usados rutinariamente para chequear posibles contaminaciones.

## 3- Interpretación y análisis de resultados.

Cada muestra se caracterizó por su fenotipo multiloci (FML), representado por las diferentes combinaciones de bandas encontradas en todos los supuestos loci (cada zona de banda RAPD). Para cada muestra, analizada con todos los "primers", se obtuvo un FML determinado. Tanto las bandas débiles como de intensidad imperceptible y bandas de arrastre fueron excluidas del análisis final de datos. Las bandas con el mismo peso molecular y movilidad fueron tratadas como fragmentos idénticos. En la matriz de datos, la presencia de una banda fue codificada como 1, mientras la ausencia de banda fue codificada como 0. La falla en la amplificación de una muestra o dato faltante fue codificada como 9.

3.1.) *Análisis cladístico:* Nos basamos en el método de la máxima parsimonia (redes de Wagner) de Farris (1970), usándose el paquete estadístico PHYLIP 3.57c (Felsenstein, 1995), aplicándose el algoritmo MIX. Cada banda RAPD obtenida se usó como un carácter, y los estados de ese carácter son su presencia o ausencia. Para evaluar la robustez de las distancias entre biotipos en las redes de Wagner se usó el procedimiento "bootstrap" de Felsenstein (1985).

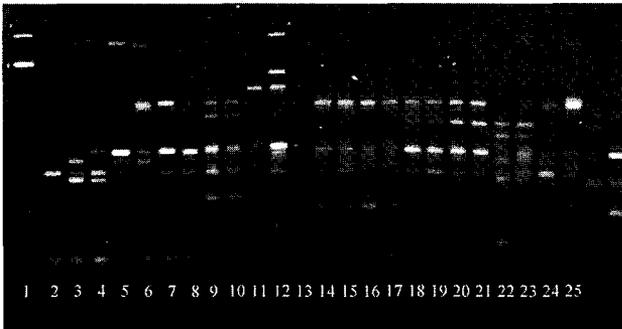
3.2.) *Análisis fenético:* Las matrices de datos fueron analizadas por el programa SIMQUAL de NTSYS, y las similitudes entre accesiones fueron estimadas usando el coeficiente de Jaccard (1908), calculado como  $J = a / (n - d)$  donde **a** es el número de coincidencias positivas (p.ej. la presencia de una banda en ambas muestras) **d** es el número de coincidencias negativas (p. ej. la ausencia de una banda en ambas muestras) y **n** el total de la muestra, incluyendo el número de coincidencias y discordancias (Rohlf 1993). Los dendrogramas fueron producidos del resultado de las matrices de similitud usando el método UPGMA:

3.3.) *Análisis multivariado:* se realizaron **Análisis de Componentes Principales (ACP)** a partir de la matriz binaria generada con los FML resultantes. Se obtuvieron representaciones gráficas tridimensionales sobre la cual son situados todos los biotipos, lo cual permitió resaltar lo más esencial de la información contenida en estos datos. Este método se aplicó para controlar la validez de los grupos determinados por los otros tipos de análisis. El análisis se efectuó con el programa NTSYS 1.8 (Rohlf, 1993).

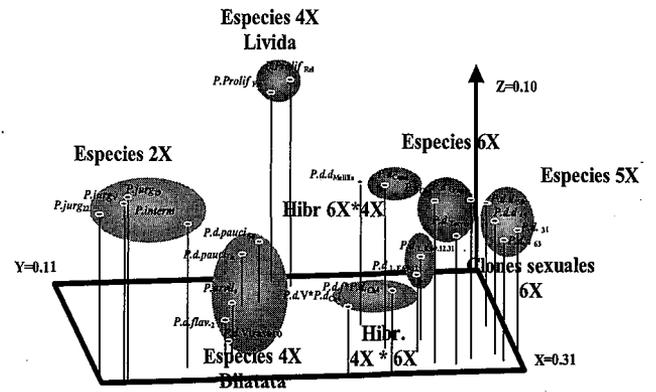
**RESULTADOS**

Las especies empleadas en el análisis filogenético (di, tetra, penta, hexa y octoploides) amplificaron exitosamente para los siguientes «primers»: B19-D10-G5-G11-G18-J5-K12-R3-R4-R16-W11-X2-X4-X12-X17-Y15. Los patrones de bandas obtenidos mostraron una gran variabilidad a nivel interespecífico, siendo para este caso los más resolutivos: K12-R4-R16-W11(Fig. 1)-X4-X12. Los diferentes perfiles de bandas al efectuar los ACP, se agruparon en los ejes X, Y y Z (que mostraban 52% de la variabili-

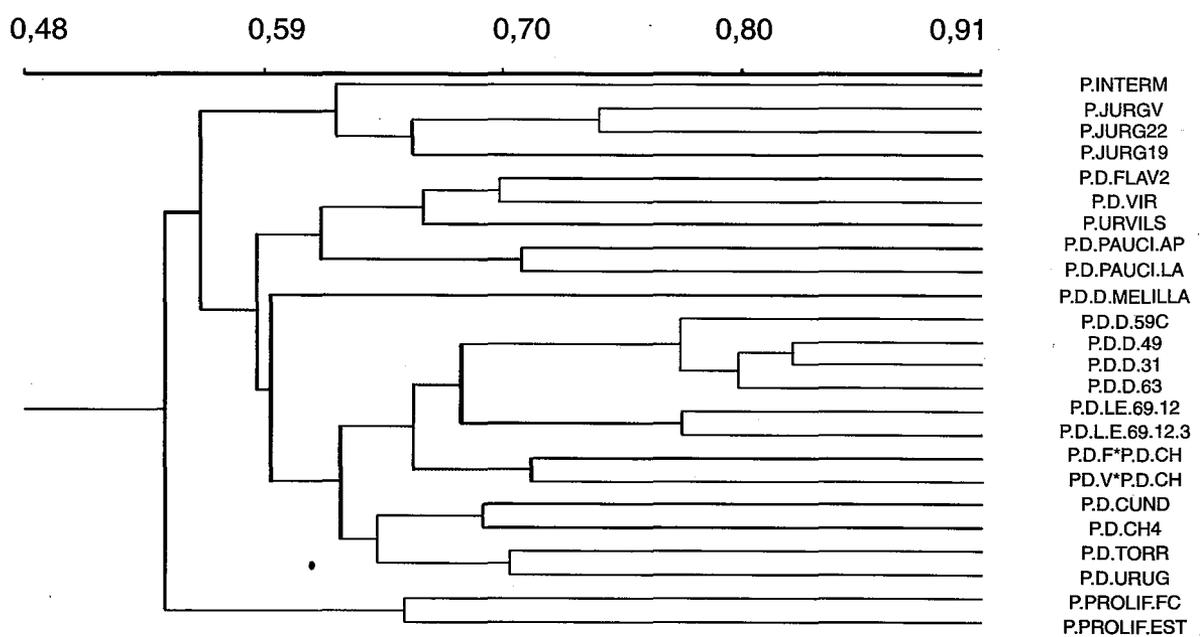
dad observada) de acuerdo a los niveles de ploidía y ubicación sistemática (Fig. 2). Las accesiones diploides (2x) se agruparon conjuntamente aunque pertenecieran a diferentes especies (*Paspalum intermedium*, *P. jurgensii*<sub>v</sub>, *P. jurgensii*<sub>19</sub> y *P. jurgensii*<sub>22</sub>). Las especies tetraploides (4X) se agruparon en dos núcleos: uno con las especies del grupo **Dilatata** y otro con las del grupo **Livida**. Las accesiones correspondientes a *P. dilatatum dilatatum* (5x) se agruparon conjuntamente a excepción del biotipo *P. dilatatum ssp dilatatum Melilla* considerado a priori como fuera del tipo "Común" aunque posea 50 cromosomas. Las subes



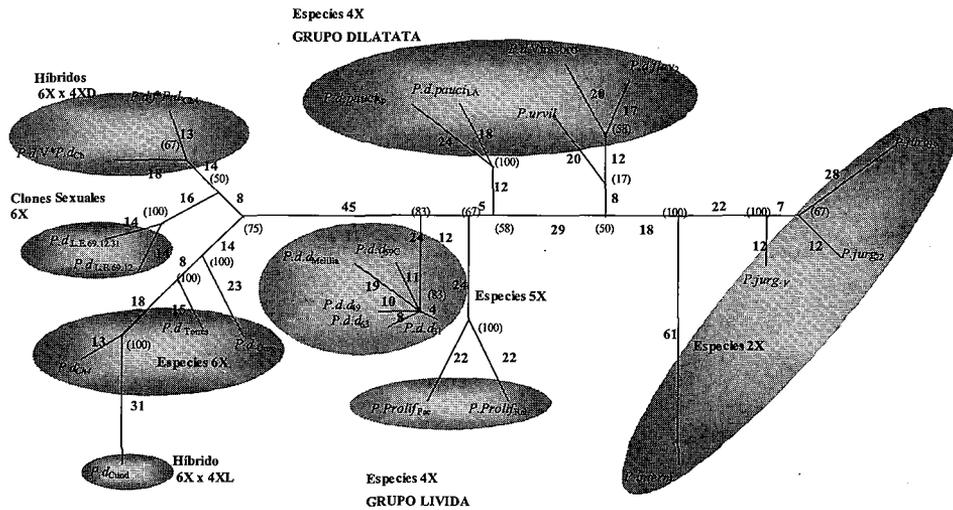
**Figura1.** Patrones de bandas RAPD en diferentes especies de *Paspalum*, generados con el primer OPW11. (2) *P.interm.* (3) *P.jurg.*<sub>v</sub> (4) *P.jurg.*<sub>22</sub> (5) *P.jurg.*<sub>19</sub> (6) *P.d.f*<sub>2</sub> (7) *P.d.*<sub>v</sub> (8) *P.urv.* (9) *Pauci*<sub>p</sub> (10) *Pauci*<sub>LA</sub> (11) *Prolif*<sub>Fac</sub> (12) *Prolif*<sub>Rel</sub> (13) *P.d.d.*<sub>Melilla</sub> (14) *P.d.d.*<sub>59c</sub> (15) *P.d.d.*<sub>49</sub> (16) *P.d.d.*<sub>31</sub> (17) *P.d.d.*<sub>63b</sub> (18) *P.d.f\**<sub>P.d.</sub> (19) *P.d.V\**<sub>P.d.</sub> (20) *P.d.*<sub>LE.69.12</sub> (21) *P.d.*<sub>LE.69.12.31</sub> (22) *P.d.*<sub>Cund</sub> (23) *P.d.*<sub>Ch4</sub> (24) *P.d.*<sub>Torres</sub> (25) *P.d.*<sub>Urug.</sub> (1) Fragmentos de ADN digerido con *Hind*III de tamaños conocidos.



**Figura 2.** Análisis de Componentes Principales de 24 accesiones de *Paspalum* obtenido a partir de RAPD mostrando la variación obtenida en los tres principales ejes X, Y y Z.

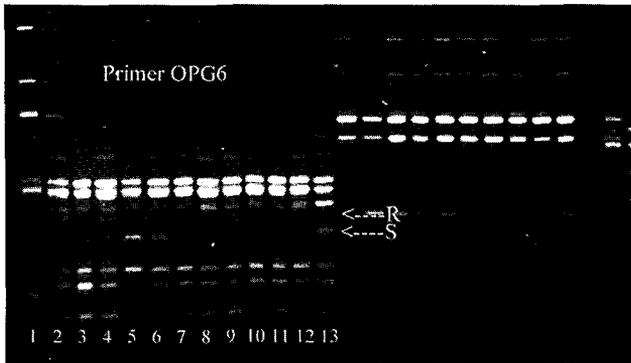


**Figura 3.** Análisis fenético basado en distancia de Jaccard obtenidas a partir de RAPD en 24 accesiones de *Paspalum*.



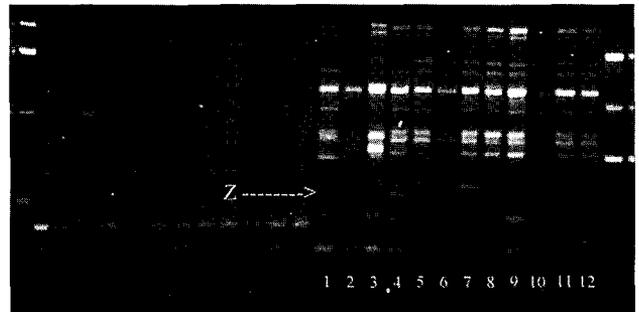
\* Los números representan las distancias patristicas o evolutivas entre las diversas accesiones.  
 \*\* Las cifras entre paréntesis representan las veces que se dio el agrupamiento mostrado, en 100 repeticiones, usando el procedimiento "bootstrap"

**Figura 4.** Análisis filogenético usando redes de Wagner en diversas especies de *Paspalum* a partir de marcadores RAPD



**Figura 5.** Patrones de bandas RAPD en el cruzamiento interespecífico, generados con el primer OPW11 (1) *Paspalum dilatatum* LE 69.12 a (2) *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* (3-12) Descendientes. Variación en zona Z.

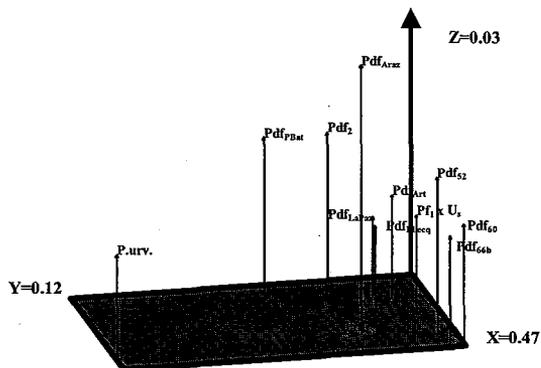
pecies hexaploides aunque de diversos orígenes (Uruguaiana y Torres-Brasil, Chirú-Uruguay) se agruparon en un solo bloque. El análisis de accesiones obtenidas en forma artificial a partir de cruzamientos inter e intraespecíficos, realizados en invernáculo en Uruguay, mostraron asociaciones de acuerdo con su origen. Los clones hexaploides sexuales obtenidos en la Fac. de Agronomía (*P. dilatatum* L.E 69.12 y *P. dilatatum* L.E 69.12.31 se agrupan conjuntamente pero muy próximas a las especies hexaploides de origen "natural". Los híbridos entre especies tetraploides (*P. urvillei* y *P. d. ssp. flavescens*) con el biotipo «Chirú» de la especie sexual hexaploide *P. dilatatum*, se agruparon conjuntamente pero en una ubicación intermedia entre las especies tetra y hexaploides. Finalmente el clon sintético *P. di-*



**Figura 6.** Patrones de bandas RAPD en diversas accesiones de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*, generados con el primer OPG6. (2) *P.d.f*Arazati(3) *P.d.f*Solis(4) *P.d.f*52(5) *P.d.f*66-b(6) *P.d.f*60(7) *P.d.f*La Paz (8) *P.d.f*1\* *P.urv*s(9) *P.d.f*Artill (10) *P.d.f*P.Leco(11) *P.d.f*Sayago(12) *P.d.f*P.Bar(13) *P.urv.* (1) Fragmentos de ADN digerido con *Hind*III de tamaños conocidos.

*latatum* "Cundidor" obtenido artificialmente de la hibridación de *P. dilatatum* L.E 69.12 (6X) x *P. proliferum* (4XL) se ubicó equidistantemente de sus progenitores. El mismo resultado se observó tanto en el análisis basado en las distancias de Jaccard agrupadas según el método UPGMA (Fig. 3) y el filogenético a partir de las redes de Wagner (Fig. 4). Este último análisis mostró además el grado de fortaleza de los diversos agrupamientos por el método «bootstrap» (con 100 repeticiones). Los agrupamientos con mayor grado de «fortaleza» fueron los de las especies diploides (100), pentaploides (83) y hexaploides (75). Fue algo menor para las especies tetraploides, tanto del grupo **Dilatata** (50 y 58) como **Livida** (67).

En el estudio de la descendencia de híbridos interespe-

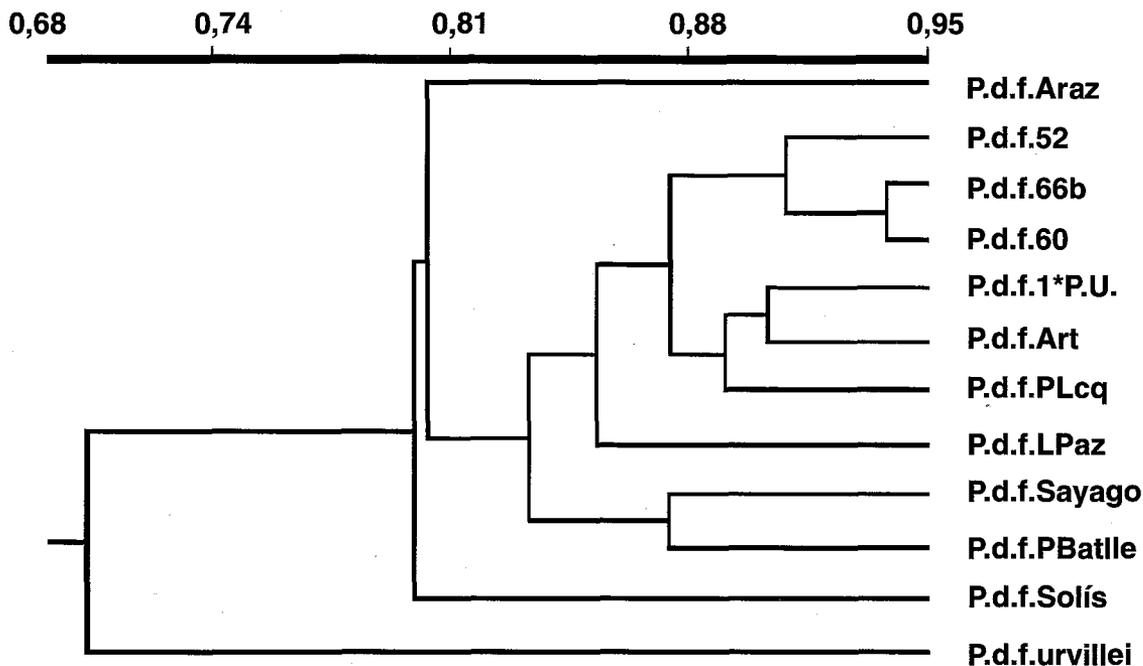


**Figura 7.** Análisis de Componentes Principales de 11 accesiones de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* obtenido a partir de RAPD mostrando la variación obtenida en los tres principales ejes X, Y y Z

cíficos entre *P. dilatatum* LE 69.12 x *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* en el que se pretendía determinar si había ocurrido hibridación, los «primers» que mostraron diferencias entre ambos padres fueron: A10-J5-R3-R16-U15-W11-X17-Y15. Entre ellos, 3 «primers» (A10, R3, W11-Fig. 5) mostraron bandas que estaban presentes en el padre y ausentes en la madre lo cual aseguraba que los individuos de la descendencia con esta banda eran seguros híbridos. De

los descendientes estudiados, 3 fueron catalogados como verdaderos híbridos (H2, H3, H9) y ya han sido introducidos en nuevos programas de mejoramiento genético.

En el programa de cruzamiento que se realiza en la Fac. de Agronomía, se detectó la utilidad de *P. dilatatum* ssp. *flavescens* (4X) como progenitor, en función de su aparente variabilidad genética. Con las accesiones de esta subespecie procedentes de diferentes localidades de su área de distribución geográfica, se realizó un estudio preliminar en 11 de las mismas las cuales mostraban diferentes hábitos de crecimiento. Luego de analizar los primers aplicados a los dos experimentos anteriores, fueron seleccionados los siguientes: A10-B19-G6-G15-G19-J5-R3-R4-R16-U15-W11-X2-X12-X17-Y15-Z12. La Figura 6 muestra la variación observada con el primer OPG6 en las zonas R y S que permite detectar la variabilidad intraespecífica en las diversas accesiones de esta subespecie. En el análisis a partir de ACP (Fig. 7) se observa una clara diferencia entre las accesiones de hábito de crecimiento erecto, con la accesión Pdf<sub>15</sub> de hábito postrado (de *P. dilatatum* ssp. *flavescens* SOLÍS). Usando como referencia *P. urvillei*<sup>SOLÍS</sup>, especie también tetraploide y que en el estudio interespecífico era la más próxima, se observó una ubicación en los ejes X, Y y Z del ACP, (que mostraban 62% de la variabilidad detectada) completamente separada en las dos especies. Los mismos resultados se han observado en el análisis a partir de distancias de Jaccard y la correspondiente presentación mediante UPGMA (Fig. 8).



**Figura 8.** Análisis fenético basado en distancia de Jaccard obtenidas a partir de RAPD en 11 accesiones de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*

## DISCUSION

En cualquier estudio de caracterización genética de especies vegetales, ya sea con fines de mejoramiento o de evaluación de colecciones de germoplasma, la obtención de marcadores genéticos de buena sensibilidad resulta de vital importancia. Asimismo deben ser fácilmente interpretables desde el punto de vista genético en lo relativo a su modo de control y herencia.

El análisis filogenético interespecífico basado en las características de bandas RAPD, es concordante con las hipótesis planteadas anteriormente con respecto al origen y evolución de este grupo de especies (Burson, 1983, 1989). Las especies diploides (2X) propuestas como la base evolutiva del grupo Dilatata aparecieron en todos los análisis (UPGMA, ACP y redes de Wagner) agrupados conjuntamente y totalmente separadas del resto. Asimismo mostraron la mayor «fortaleza» en el análisis «bootstrap» lo que confirmaría que son la base evolutiva de este grupo de especies. Las especies tetraploides (4X) del grupo Dilatata, obtenidas según la teoría de Burson (op.cit) por duplicación cromosómica a partir de las diploides fueron las más próximas de las diploides lo que coincidiría con esta hipótesis. Las tetraploides del grupo Livida fueron similares a las del grupo Dilatata, pero más alejadas de las diploides. Los biotipos pentaploides (5X) de *P. dilatatum* ssp. *dilatatum*, se ubicaron más cerca de las especies hexaploides (6X) que las tetraploides (4X). Esto podría deberse al grado de diferenciación genética que aporta el genomio X, que habría sido aportado por alguna especie hexaploide y que no está presente en las tetraploides. A este genomio se le asigna el control de la apomixis, característica deseada en todo programa de cruzamiento para uno de los progenitores cuando se han detectado fenotipos «interesantes» desde el punto productivo. Los clones hexaploides sexuales *P. dilatatum* L.E. 69.12 y *P. dilatatum* L.E.69.12.31 se ubicaron conjuntamente pero separados de las apomícticas (6X). Todas las especies con el genomio X, (4X, 5X, 6X) mostraron agrupamientos muy consistentes con índices de «bootstrap» superiores a 75.

Con respecto a los cruzamientos interespecíficos el híbrido «Cundidor» apareció equidistante de sus progenitores *P. proliferum* (4X L) y *P. dilatatum* «Chirú» (6X) tanto en el análisis con ACP como en la filogenia mediante redes de Wagner y un índice «bootstrap» de 100. El análisis fenético basado en distancias de Jaccard mostró que las especies del grupo Livida se separaron del resto (Fig. 5) y los clones sexuales, muy próximos a su progenitor apomíctico. Esto se podría explicar porque el híbrido «Cundidor» tiene 80 cromosomas, de los cuales 60 son los mismos del padre hexaploide.

Los híbridos entre especies sexuales 4X y *P. dilatatum* «Chirú» (apomíctica) fueron más cercanos a las especies penta (5X) y hexa (6X) que a las tetraploides del grupo Dilatata. Esta ubicación se explicaría por poseer estos híbridos

características fenotípicas más cercanas a aquellas que poseen el genomio X (5X y 6X) que a las tetraploides que aportan solamente la fuente de sexualidad para este cruzamiento.

La fuente de sexualidad, y por tanto de variabilidad genética, es uno de los puntos a tener en cuenta en el programa de cruzamientos que tiene como finalidad la resíntesis de *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* de 50 cromosomas. El estudio de *P. dilatatum* ssp. *flavescentes*, presenta el interés de caracterizar una especie ampliamente distribuida en nuestro país y con variados hábitos de crecimiento, los cuales pueden ser muy interesantes a considerar en el programa de resíntesis. Los marcadores moleculares obtenidos permitieron diferenciar los biotipos de diferentes hábitos de crecimiento y procedentes de diferentes regiones de Uruguay, lo cual confirma la variabilidad obtenida a nivel fenotípico y la segregación detectada con otros marcadores genéticos (Pereira y Speranza, 1997b).

El cruzamiento realizado también con la finalidad de resíntesis entre especies que poseen el genomio X (*P. dilatatum* LE 69.12 -6X x *P. dilatatum* spp. *dilatatum*<sub>Melilla</sub> -5X) sirvió para confirmar el control dominante de los marcadores RAPD y su relación con el número cromosómico. Los tres híbridos que presentaban la banda del progenitor masculino (5X) eran de 50 cromosomas y el resto eran de un número superior y cercano a 60.

Los marcadores utilizados en este trabajo han permitido diferenciar con mayor facilidad y en menor tiempo, respecto a las técnicas citogenéticas y embriológicas, el carácter híbrido de los descendientes de diversos cruzamientos. Esta particularidad los hace de gran utilidad para analizar grandes descendencias de cruzamientos realizados para la resíntesis de *P. dilatatum* ssp. *dilatatum*. Al obtener semillas en la planta utilizada como madre en cada hibridación, se las hace germinar y con las hojas jóvenes obtenidas ya es posible identificar toda la progenie. Solamente serán tenidas en cuenta aquellas que sean «híbridos verdaderos» desechándose el resto con la consiguiente ganancia de tiempo y dinero.

Los análisis filogenéticos permitirían la caracterización de nuevos progenitores, que como estrategia de trabajo se pretende que sean diferentes y lo más contrastantes posibles desde el punto de vista genético. Con la ayuda de marcadores moleculares se pueden utilizar individuos genéticamente caracterizados previamente, en forma segura, rápida y económica.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es fruto del Proyecto «Estudios genéticos y filogenéticos dentro del género *Paspalum* a partir de marcadores moleculares financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC Proy. N° 222) de la Universidad de la República. Los autores agradecen al Dr. Darío Grattapaglia de EMBRAPA-CENARGEN

Brasilia-Brasil, por la asistencia prestada en la puesta a punto técnica y enfoque teórico de este trabajo. Asimismo se agradece el Ing. Agr. Pablo R. Speranza por el apoyo prestado a este trabajo tanto por el aporte de materiales de estudio como de informaciones sobre los mismos.

## BIBLIOGRAFIA

- AINOUCHE, M.; MISSET, M.T. and HOUON, A. 1995. Genetic diversity in Mediterranean diploid and tetraploid *Bromus* L. (section *Bromus* Sm.) populations. *Genome* 38: 879-888.
- ALBICETTE, M.M. 1980. Estudio citogenético en biotipos de *Paspalum dilatatum* tipo Chirú e híbridos interespecíficos con *Paspalum proliferum*. Tesis Ing. Agr., Facultad de Agronomía, Montevideo, 69p.
- BASHAW, E.C. and J. FORBES, JR. 1958. Chromosome numbers and microsporogenesis in dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. *Agron. J.* 50:441-445.
- BURSON, B.L. 1979. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum* hybrids. *Crop Sci.* 19:534-538.
- BURSON, B.L. 1983. Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and Related Species. In: J.A.Smith and V.W.Hays, (ed.) Proc. 14th. Int. Grassl. Congr. Lexington, KY. 15-24 June. Westview Press, Boulder, CO.
- BURSON, B.L. 1989. Phylogenetic of apomictic *Paspalum dilatatum*. In: International grassland congress, XVI, Nice. Proceeding....Nice: The French Grassland Society 3: 413-414.
- CASA, A. M. 1995. Caracterização do germoplasma de espécies de *Paspalum* (Grupo Dilatata) pelo uso de marcadores bioquímicos e moleculares. Univ. Estadual Paulista «Julio de Mesquita Filho». Brasil. 102p.
- COLL, J. 1991. Producción de semilla de *Paspalum dilatatum*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie Técnica n° 4. 20p.
- DE SOUZA-CHIES, T. T. 1992. Relacionamiento isoenzimático entre entidades taxonômica do gênero *Paspalum* (Graminae). Dissertação Bach. em Ciências Biológicas. Porto Alegre, RS, Brasil, Universidade Federal do Rio Grando do Sul. 176p.
- DIGHIERO, M.J. 1989. Selección por calidad de semilla en materiales de *Paspalum* de origen híbrido. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 138p.
- FARRIS, J.S. 1970. Methods for computing Wagner trees, *Syst. Zool.* 19: 83-92.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach utilizing the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FELSENSTEIN, J. 1995. PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- FERREIRA, M. E. and GRATAPAGLIA, D. 1996. Marcadores moleculares utilizados na genética e melhoramento de plantas. EMBRAPA-CENARGEN, 2da. Ed. pp. 220.
- GARCÍA, J. 1971. Influencia de factores ambientales sobre el rendimiento y calidad de semillas en tres biotipos de *Paspalum dilatatum* Poir, Facultad de Agronomía, Montevideo.
- HICKENBICK, M.C.M.; PEREIRA FLORES, A. I.; CAVALLI-MOLINA, S.; HENRIQUE WEBER, L.; KERSTING, A.C.O.; SANTOS COSTA, L.; TEIXEIRA DE SOUSA-CHIES, T. and ALBARUS, M.C. 1992. Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* Poir Virasoro Biotype-Dilatata Group (Gramineae). *Rev. Brasil. Genet.* 15: 85-102.
- LIU, Z.U.; JARRET, R. L.; KRESOVICH, S. and DUNCAN, R.R. 1995. Characterization and analysis of simple sequence repeat (SSR) loci in seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). *Theor. Appl. Genet.* 91: 47-52.
- IZAGUIRRE, P. and ZILIANI, G. 1979. Tipos de megagametofito en *Paspalum dilatatum* Poir. ssp. *dilatatum* (Gramineae). Montevideo, Facultad de Agronomía. Boletín n°132, 15p.
- JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223-270.
- MILLOT, J.C. 1977. Sexualidad en *Paspalum dilatatum* Poir. ssp. *dilatatum* Roseng. Congreso Latinoamericano de Genética, Montevideo. 252p.
- MILLOT, J.C., RIVAS, M., SALDANHA, S., DE SOUZA, D., DARTAYETE, D., HUERTAS, M. and PIGOLA, P. 1990. Comportamiento reproductivo de *Paspalum dilatatum*. Efecto genotipo por localidad por condiciones ambientales. II Jornadas Técnicas de Investigación de la Fac. de Agronomía, p.125.
- ORTIZ, J.A. PESSINO, S.C. LEBLANC, O. HAYWARD, M.D. and QUARIN, C.L. 1997. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor. Appl. Genet.* 95 (5-6): 850-56.
- PEREIRA, J. and SPERANZA, P.R. 1997a. Identificación Mediante Isoenzimas de Pentaploides Sintéticos en *Paspalum dilatatum* Poir. Libro de Resúmenes de VIII Jornadas Científicas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Maldonado: 20.
- PEREIRA, J. and SPERANZA, P.R. 1997b. Inheritance of Peroxidase alleles in intraspecific hybrids of *Paspalum* (Gramineae). *Brazilian Journal of Genetica.* 20(3): 66.
- PEREIRA, J. and SPERANZA, P.R. 1998. Use of isozymes markers for detection of natural hybrids among grass species from Uruguay. Enviado a publicación.
- RIVAS, M., MAZZELLA, C. and SPERANZA, P.R. 1992. Estudio citogenético y evaluación agronómica primaria de un híbrido interespecífico del género *Paspalum*. Abstracts X Congreso Latinoamericano de Genética. Revista Brasileira de Genética 15:152.
- ROHLF, F. J. 1993. NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Publishers, New York.
- SANTIÑAQUE, F. 1979. Estudios sobre productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras. Tesis de Ing. Agr. Montevideo. Uruguay, Facultad de Agronomía, 86p.
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, L.A. and TINGEY, S.V. 1990. Dna polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.