

ANÁLISIS GENÉTICOS EN GRAMÍNEAS NATIVAS DEL GÉNERO *Paspalum* A PARTIR DE DATOS ISOENZIMÁTICOS Y RAPD

Pereira¹, J.; Sabbía, V.; Fajardo¹, A. y Speranza, P. R.

Recibido: 17 de mayo de 2000. Aceptado: 28 de agosto de 2000.

RESUMEN

Dentro del género *Paspalum*, el grupo *Dilatata* tiene especial importancia para el área subtropical, por su valor como gramínea forrajera y amplia distribución en la región. Este grupo está formado por cuatro especies y siete biotipos. Han sido descritos diferentes niveles de ploidía y comportamiento reproductivo para este grupo. Utilizando marcadores isoenzimáticos y RAPD, se examinó la diversidad genética y relaciones filogenéticas de 23 accesiones de diferentes especies de éste género. Se detectaron 25 loci putativos codificados por 6 isoenzimas, siendo 21 polimórficos a nivel interespecífico, y 4 a nivel intraespecífico. Se generaron 224 fragmentos RAPD con 24 «primers» aleatorios de 10 pares de bases cada uno. A nivel interespecífico, 98.5% de éstos fragmentos fueron polimórficos, mientras que entre las accesiones intraespecíficas éste porcentaje fue de 72.3%. Los análisis filogenéticos usando los datos generados por ambas técnicas fueron mayormente coherentes con los niveles de ploidía y origen evolutivo. Los datos RAPD mostraron mayor poder discriminatorio que las isoenzimas entre especies de la misma ploidía y en análisis intraespecíficos. No se encontró congruencia completa entre los datos isoenzimáticos y RAPD. Usando información tanto de isoenzimas como de RAPD se generó información más acorde tanto con diversidad genética como relaciones filogenéticas dentro y entre especies de gramíneas.

PALABRAS CLAVE: *Paspalum*, Isoenzimas, ADN, RAPD, PCR, filogenia, ACP, poblaciones,

SUMMARY

GENETIC ANALYSIS IN NATIVE GRASSES OF GENUS *Paspalum* USING ISOZYME AND RAPD DATA

Among the *Paspalum* genus, the *Dilatata* group is very important for the sub-tropical region because of its value as a forage grass and wide distribution in the region. This group has four species and seven biotypes. Different levels of ploidy and reproductive performance were studied. By using isoenzymatic markers and RAPDs, the genetic diversity and the phylogenetic relationships of 23 different species accessions were examined. 25 putative loci coded by 6 isoenzymes were detected, 21 of which were polymorphic at the interespecific level and only 4 were variable at the intraspecific level. 224 RAPD fragments were obtained with 24 random «primers» of 10 bp each. At the interespecific level, 98.5% of these fragments were polymorphic whereas among the intraspecific level, this amount was 72.3%. The phylogenetic analysis using the data obtained by the two techniques were related to ploidy level and evolutionary origin. RAPD data were more segregating power than isoenzymes among species with same ploidy and in intraspecific analysis. Complete congruence has not been found between isozyme and RAPD data sets. The use of two techniques, both isoenzymes and RAPDs as well, gave more information not only on the genetic diversity but also on the relationships within and among grass species.

KEY WORDS: *Paspalum*, Isozyme, ADN, RAPD, PCR, phylogeny, PCA, populations.

INTRODUCCIÓN

Información de la diversidad genética y relaciones dentro y entre especies nativas es esencial para una eficiente utilización de las colecciones de recursos genéticos vegetales. Varios enfoques moleculares han sido empleados para conocer la diversidad y relaciones genéticas, pero los datos

generados por isoenzimas o los polimorfismos al azar de ADN (RAPD) son más rápidos y menos trabajosos que otros, tales como RFLP y microsatélites. No obstante, los estudios isoenzimáticos están limitados por el número de enzimas y loci que pueden ser revelados, aportando sólo información de cambios en regiones codificantes del genoma que han resultado en alteraciones en la secuencia de aminoácidos. En muchos casos la falta de polimorfismo en aloenzimas puede restringir bastante su aplicación en colecciones de germoplasma vegetal. En contraposición,

¹ 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 3 3093004 - E-mail: jeep@fagro.edu.uy.

los análisis RAPD permiten la detección de marcadores genéticos que aportan información de un número de loci que corresponden a regiones codificantes y no codificantes del genoma (Williams *et al.*, 1990). No obstante la naturaleza dominante de los marcadores RAPD requiere que mas individuos y loci sean estudiados, comparados con los marcadores codominantes tales como los RFLP e isoenzimas (Lynch and Milligan, 1994), y la baja homología entre fragmentos co-migrantes de diferentes especies podría limitar su aplicación en estudios filogenéticos a nivel interespecifico (Thormann *et al.*, 1994; Rieseberg, 1996). Por tales motivos en el presente trabajo se utiliza un enfoque complementario usando tanto isoenzimas como RAPD para generar estimaciones aproximadas de la diversidad genética y relaciones, para mejorar la discriminación de materiales analizados por características morfológicas o cada una de las técnicas individualmente.

En el Uruguay y regiones vecinas la disponibilidad de forraje en cantidades suficientes a lo largo de todo el año constituye uno de los principales problemas de la producción ganadera. Es particularmente notoria la ausencia de gramíneas estivales C4 entre las especies disponibles a nivel comercial lo cual restringe la estabilidad, persistencia y sustentabilidad de las pasturas convencionales. *Paspalum dilatatum* es una especie perenne estival altamente promisorio, originada probablemente en nuestro país.

P. dilatatum presenta varios biotipos y citotipos diferentes, siendo la forma apomítica pentaploide natural la más promisorio desde el punto de vista agronómico. La estrategia disponible para la utilización de la variabilidad genética es la resíntesis de materiales pentaploides a partir del cruzamiento entre tetraploides sexuales y hexaploides apomíticos. Debido a la escasa variabilidad naturalmente presente en los hexaploides, los materiales tetraploides constituyen el principal reservorio de recursos fitogenéticos.

Los trabajos de caracterización genética actualmente en curso, junto con la información que se está generando desde el punto de vista molecular (Pereira *et al.*, 1999), han permitido evaluar el nivel de similitud genética que presentan parte de los materiales disponibles actualmente. Estas herramientas desarrolladas, generan información que posibilitarán el diseño de nuevas estrategias para la elección de los mejores progenitores para realizar la resíntesis de *Paspalum dilatatum*. En el presente trabajo se propone aplicar la tecnología molecular descrita anteriormente (Pereira *et al.*, op. Cit) y comparar los resultados obtenidos con esta técnica con los obtenidos mediante la aplicación de isoenzimas (Pereira *et al.*, 1997^a y datos no publicados) en la caracterización de las coleccio-

nes existentes en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía. La información generada aportarán nuevos elementos para diseñar posteriormente programas de mejoramiento que tomen en cuenta los aspectos biológicos y genéticos y permitiendo así mejorar su eficiencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales vegetales

Se analizaron 23 plantas/accesiones representando los taxa que se detallan en el Cuadro 1. Cada muestra fue analizada según los procedimientos diferenciales de cada una de las técnicas aplicadas.

1) Electroforesis de Isoenzimas

a) Preparación de muestras: De cada planta a analizar se colectó la última hoja emergida (asumiéndose que estaban en las mismas condiciones fisiológicas). Se preparó un extracto proteico a partir del macerado, (en tubo «ependorf» de 1,5 ml -bajo temperatura controlada-aprox. 4°C), de 2 cm de hoja en 300ul de tampón de extracción de proteínas (De Souza, 1992). (Cuadro 2).

b) Análisis Isoenzimático: la migración electroforética de las muestras a analizar se realizó en placas de Acetato de Celulosa (Helena Laboratories, Beaumont, TX). El posterior revelado de las placas de electroforesis se efectuó sobre matriz de agarosa detectándose actividad de las siguientes isoenzimas: Fosfoglucomutasa (PGM), Isocitrato deshidrogenasa (ICD), Malato deshidrogenasa (MDH), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), Fosfoglucoisomerasa (GPI), Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), Superóxido dismutasa (SOD), Peroxidasa (PER) y 6 Fosfo gluconato deshidrogenasa (6-PGDH) (De Souza, op.cit; Casa, 1995).

2) Análisis RAPD

a) Extracción y cuantificación de ADN genómico total: Se extrajo ADN de hojas frescas de las 23 plantas a estudio para el análisis RAPD, según el protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1996). La cuantificación se realizó en gel de agarosa (0,8%) preparado con tampón TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) agregándose 0,4 ug/ml de bromuro de etidio, comparándose la intensidad del ADN extraído de cada muestra con un ADN patrón (10, 50, 200 ug/ml).

b) Amplificación de ADN via PCR y visualización: El protocolo para RAPD-PCR fue basado en Williams *et al.*, (1990) con modificaciones realizadas para el material a estudio en este trabajo (Pereira *et al.*, op. Cit). Los “primers” utilizados y sus secuencias correspondientes se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 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. jurgnensii</i>	7200	<i>P.jurg_v</i>	Brasil-EMBRAPA
3	<i>P. dilatatum</i> Virasoro	7207	<i>P.dil_{vir}</i>	Argentina
4	<i>P. urvillei</i>	7199	<i>P.urv_s</i>	R 10 km 0,200. Solís-Maldonado Uruguay
5	<i>P. proliferum</i>	7355	<i>Prolif_{Fac}</i>	Fac. Agronomía - Montevideo-Uruguay
6	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i>	7550	<i>Pdf₅₂</i>	R8 km 102,4, Solís Maldonado-Uruguay
7	" "	7552	<i>Pdf₆₀</i>	Sitio de Yasú, Dpto. de Lavalleja-Uruguay.
8	" "	7219	<i>Pf₁*U_s</i>	R 10 km 0,200. Solís-Maldonado-Uruguay
9	" "	7554	<i>Pdf_{66B}</i>	R. 77 km 22,900, Florida-Uruguay
10	" "	7548	<i>Pdf_{Araz}</i>	R1 Arazatí, Colonia-Uruguay
11	" "	7217	<i>Pdf_{Ari}</i>	Balneario Artilleros, Colonia-Uruguay
12	" "	7549	<i>Pdf_{PLecq}</i>	Parque. Lecocq. Montevideo-Uruguay
13	" "	7384	<i>Pdf_{PBat}</i>	Parque. Battlle, Montevideo-Uruguay
14	" "	7218	<i>Pdf_{IS}</i>	R 10 km 0,200. Solís, Maldonado-Uruguay
15	" "	7204	<i>Pdf₂</i>	Millán y Sayago, Montevideo-Uruguay
16	" "	7385	<i>Pdf_{LaPaz}</i>	La Paz, Canelones-Uruguay.
17	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	7404	<i>Pdd_{Melilla}</i>	Melilla. Hamilton y Las Pitas, Montevideo-Uruguay
18	<i>P. dilatatum</i>	7536	<i>Pd_{Chiri}</i>	R26 km 113, Paysandú-Uruguay
19	" "	7196	<i>Pd_{Torres}</i>	CENARGEN V13121-Brasil
20	" "	7195	<i>Pd_{Urug}</i>	CENARGEN V12388-Brasil
21	" "	7210	<i>Pd_{LE69122}</i>	LE69.12-Clon Sexual-Colonia-Uruguay
22	<i>P. dilatatum</i> Cundidor	7155	<i>Pd_{Cund}</i>	L.E. 69.12xP. proliferum (Híbr. de J.C. Millot)-Uruguay
23	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> x <i>P. dilatatum</i> Virasoro	7383	<i>Pf_{IS}xV</i>	<i>Pd.ssp.f</i> (7218) x <i>P. d. Virasoro</i> (7207)

Cuadro 2. Lista de Enzimas Estudiadas y el número de Bandas Obtenidas.

ENZIMAS	Zonas de Actividad	Bandas
Glutamato-Oxalacetato transaminasa (GOT). E.C. NUMBER 2.6.1.1	2	5
Malato deshidrogenasa (MDH). E.C. NUMBER 1.1.1.37.	1	4
Peroxidasa (PER)	7	16
Fosfo gluco isomerasa (GPI). E.C. NUMBER 5.3.1.9.	2	4
Fosfo gluco mutasa (PGM). E.C. NUMBER 2.7.5.1.	1	1
6 fosfo gluconato deshidrogenasa (6-PGDH). E.C. NUMBER 1.1.1.44	1	3
Super óxido dismutasa (SOD). E.C. NUMBER 1.15.1.1.	x	x
Iso Citrato deshidrogenasa (ICDH) E.C. NUMBER 1.1.1.42	x	x
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) E.C. NUMBER 1.1.1.49	x	x

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 Isoenzimática o RAPD). Para cada muestra, ana-

lizada con todos las isoenzimas y "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 frag-

Cuadro 3. 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

mentos 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, op. cit).

RESULTADOS

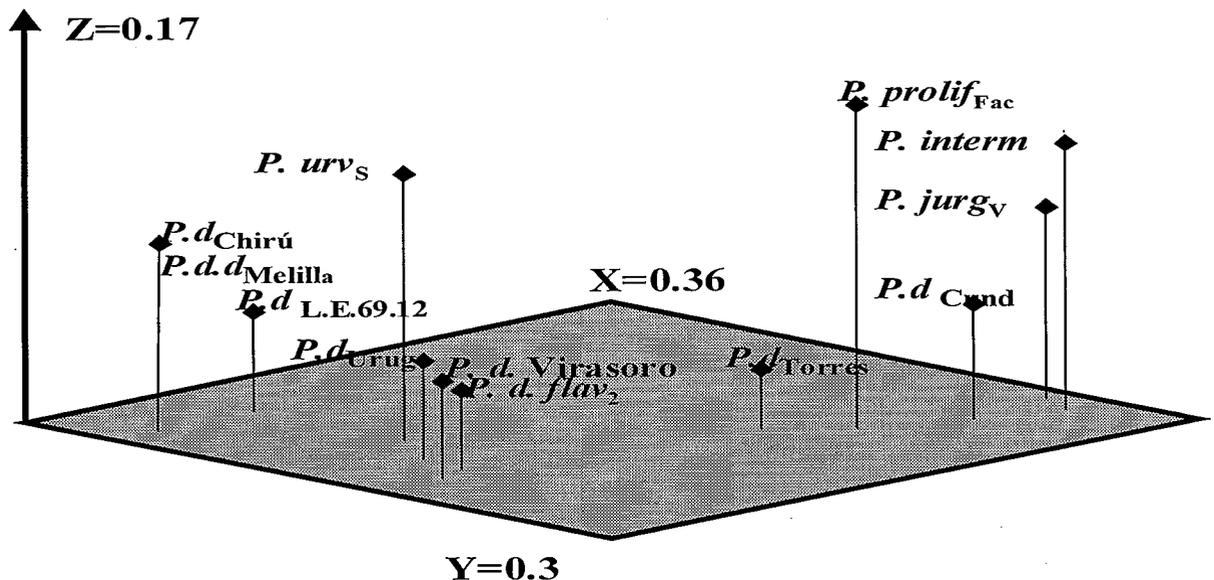
a) Isoenzimáticos: Altos niveles de diversidad isoenzimática fueron encontrados tanto dentro como entre las especies estudiadas. Fueron identificadas 33 bandas diferentes correspondientes a 14 zonas de actividad isoenzimática (loci putativos) (Cuadro 4). En estos 14 loci resueltos 26 bandas fueron polimórficas a nivel interespecífico (79%). A nivel intraespecífico en *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, 5 loci fueron detectados polimórficos (Sabbía, 1998) (36%). Las especies diploides que han sido reportadas como las originarias del grupo Dilatata muestran 17 bandas de las cuales 8 son compartidas (47%), y 9 únicas (53%) (presente en sólo una de ellas). Las tetraploides, originadas a partir de las diploides primarias, muestran 19 bandas, 13 compartidas (68%), 4 presentes en una sola de ellas (21%) y 2 bandas se encuentran en 2 de ellas (11%). La especie *P. proliferum* (4X) perteneciente al grupo Livida, presenta 15 bandas de las cuales 10 (67%) son comunes con las otras especies 4X, 4 (27%) están presentes en alguna especies tetraploide y una banda (7%) es completamente diferente a las otras del grupo Dilatata. Las especies que varían entre 5X y 8X presentan las 32 bandas de las cuales 12 se encuentran en todas las especies (38%) y solo 3 (9%) están presentes en una sola especie. A nivel intraespecífico *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, mostró 25 bandas diferentes de las cuales 12 estuvieron presentes en todas las accesiones estudiadas (48%) y 3 se encontraron en una sola de ellas (12%).

Los análisis isoenzimáticos con Isocitrato deshidrogenasa, Super Oxido Dismutasa (SOD) y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), no mostraron resultados reproducibles, por lo que fueron deshechados para los estudios realizados. Salvo Fosfo gluco Isomerasa (PGM), todos los sistemas resueltos mostraron polimorfismo en los patrones obtenidos.

Los diferentes perfiles de bandas al efectuar los ACP, (Fig. 1) se agruparon en los ejes X, Y y Z (que explicaban 83% de la variación observada) se mostraron mayormente de acuerdo a los niveles de ploidía. El eje X (que explica 36% de la variabilidad) separaba claramente las especies diploides. El eje Y (30% de la variabilidad) separaba a la mayoría de las especies tetraploides del grupo Dilatata, aunque el eje Z (17% de la variabilidad explicada) separa a *P. urvillei* del resto. La otra especie tetraploide pertene-

Cuadro 3. Cuantificación de variabilidad isoenzimática y RAPD en las accesiones estudiadas.

Tipo Marcador	Especies	Todas las Especies	Diploides	Tetraploides Dilatata	<i>P.dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i>	Tetraploide Livida	Penta, Hexa y Octoploides
ISOENZIMAS							
Total Bandas		33	17	19	25	15	32
Zonas de Actividad		14					
Polimorfismo interespecífico		11 (79%)					
Polimorfismo intraespecífico		5 (36%)					
Bandas Unicas			9 (53%)	4(21%)	3 (12%)	1(7%)	3(9%)
Bandas Parcialmente Compartidas				2(11%)		4 (27%)	
Bandas Totalmente Compartidas			8(47%)	13(68%)	12(48%)	10(67%)	12(38%)
RAPD							
Total Bandas		189	80	87	224	59	126
Zonas de Actividad		98					
Bandas Polimórficas		186(98%)					
Polimorfismo intraespecífico		162(72.3)					
Bandas Unicas			57(71%)	4(5%)	24(15.2%)	25(42.4%)	34(27%)
Bandas Parcialmente Compartidas				18(20.7%)		15(25%)	
Bandas Totalmente Compartidas			23(29%)	36(41%)	62(27.7%)	19(32.2%)	17(13.5%)

**Figura 1.** Distribución de 12 accesiones de *Paspalum* en función de los tres primeros componentes principales obtenidos a partir de datos isoenzimáticos. Los porcentajes de variación explicados por cada uno de los componentes principales se indican en los ejes.

ciente al grupo Livida se ubica más próxima a las especies diploides. Asimismo el híbrido "Cundidor" (8X) (*P. dilatatum* L.E. 69.12 x *P. proliferum*) se ubicó muy próximo a uno de sus progenitores. Las especies penta y hexaploides se agruparon bastante próximas, aunque *P. dilatatum* Torres se ubicó alejado del resto.

El análisis fenético basado en las distancias de Jaccard agrupadas según el método UPGMA (Fig. 2a) y el filogenético a partir de las redes de Wagner (Fig. 3) mostró a nivel interespecífico resultados similares. Aparecieron dos grandes grupos con una similitud próxima de 0.3. En uno de ellos las especies diploides se agruparon juntas formando un brazo separado en el dendrograma (similitud próxima a 0.6). En el otro grupo las especies tetraploides del grupo Dilatata se ubicaron juntas en un solo agrupamiento conjuntamente con el biotipo hexaploide *P. dilatatum* Torres (similitud de 0.82). Las especies y biotipos penta y hexaploides aparecieron juntas en el mismo brazo del dendrograma, pero sin lograr diferenciar al biotipo hexaploide *P. dilatatum* Chirú del biotipo pentaploide *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* Melilla. La especie tetraploide del grupo Livida *P. proliferum* se aproximó a este último agrupamiento (similitud de 0.5). Los resultados del análisis filogenético interespecífico (Fig. 3) permitieron separar en un brazo separado y en el centro del árbol filogenético a las especies diploides (100% de robustez con el análisis bootstrap). Hacia uno de los lados aparecieron las especies tetraploides (4X del grupo

dilatata) (32% de robustez) y las penta y hexaploides se separaron en dos grupos. En uno de ellos se encontró al biotipo *P. dilatatum* Chirú junto a un clon sexual descendiente *P. dilatatum* L.E. 69.12 y al Melilla de *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* (60% de fortaleza). En el otro extremo del árbol se ubicó al híbrido "Cundidor" y a su progenitor *P. proliferum*, y al biotipo hexaploide *P. dilatatum* Torres (45% de bootstrap).

El análisis fenético basado en las distancias de Jaccard agrupadas según el método UPGMA en la accesiones de *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, (Fig. 4a) separó en tres grupos mayoritarios con niveles de similitud cercanos a 0.7. Para comparar el grado de discriminación de la técnica electroforética se ubicó en el análisis intraespecífico a una accesión de la especie tetraploide *P. urvillei* Solis que en el estudio interespecífico era la más próxima. Se agrupó en un brazo separado del resto, conjuntamente con tres accesiones de *P. dilatatum* ssp. *flavescens* y un híbrido interespecífico entre *P. urvillei* Solis y *P. dilatatum* ssp. *flavescens* Solis.

b) RAPD: las accesiones empleadas amplificaron exitosamente para los siguientes «primers»: B19-D10-G5-G11-G18-J5-K12-R3-R4-R16-W11-X2-X4-X12-X17-Y15. A nivel inter e intraespecífico fueron identificadas 224 bandas diferentes correspondientes a 98 zonas de amplificación (loci putativos). Los análisis interespecíficos mostraron 189 bandas de las cuales 186 fueron

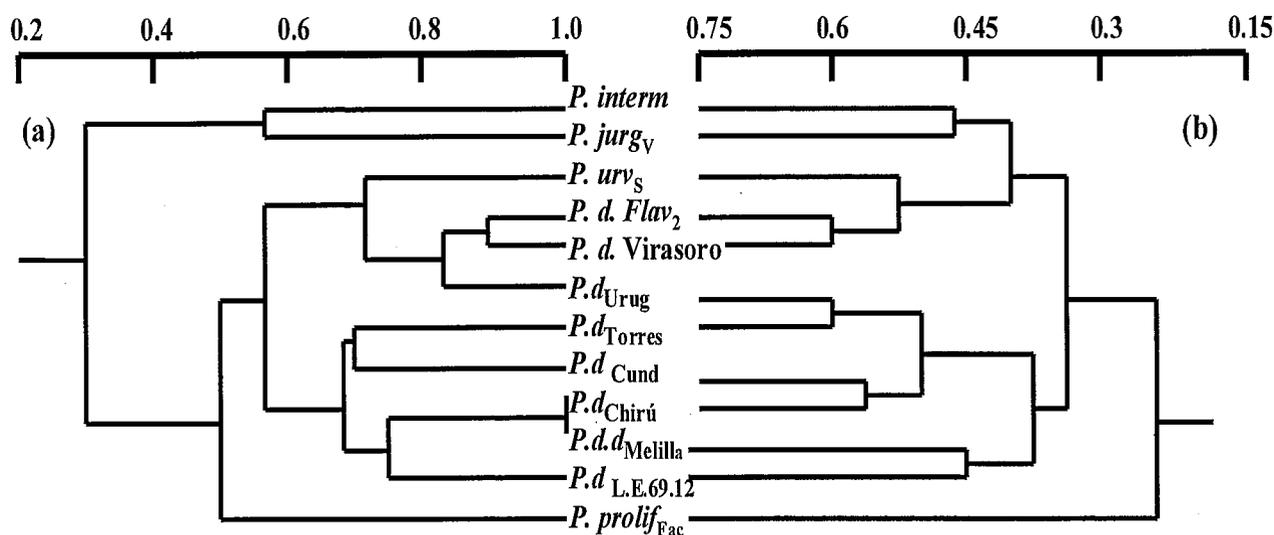


Figura 2. Dendrograma UPGMA usando la matriz de coeficiente de similitud de Jaccard en 12 accesiones de *Paspalum* usando datos isoenzimáticos (a) y RAPD (b).

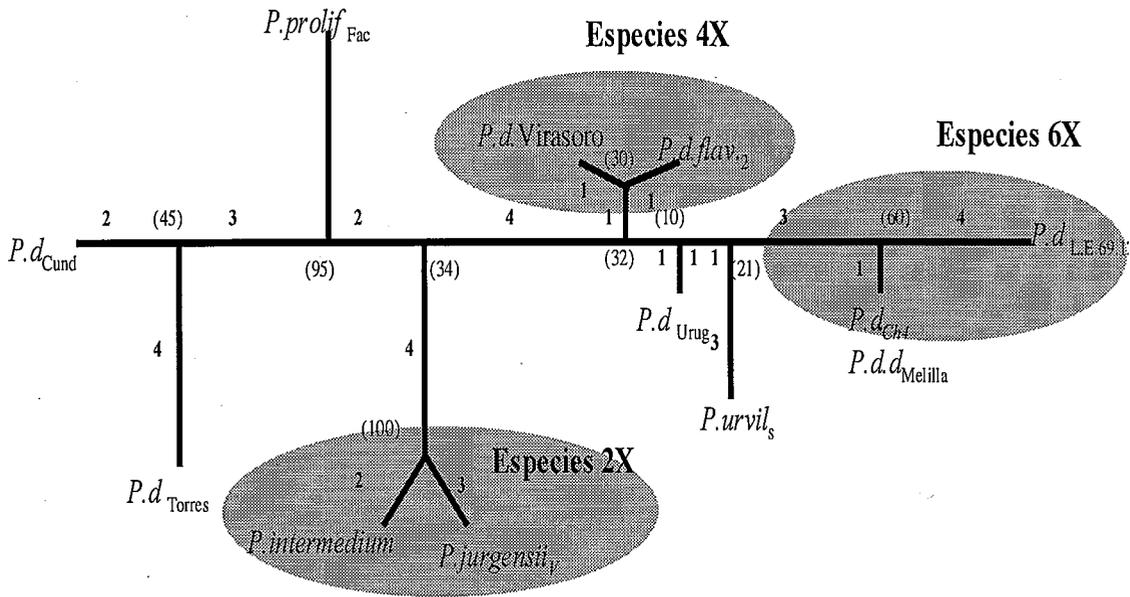


Figura 3. Análisis filogenético usando redes de Wagner en 12 accesiones de *Paspalum* a partir de Isoenzimas. Los números representan las distancias patrísticas o evolutivas entre las especies. Las cifras entre paréntesis representan las veces que se dio el agrupamiento mostrado, en 100 replicaciones usando el procedimiento «bootstrap».

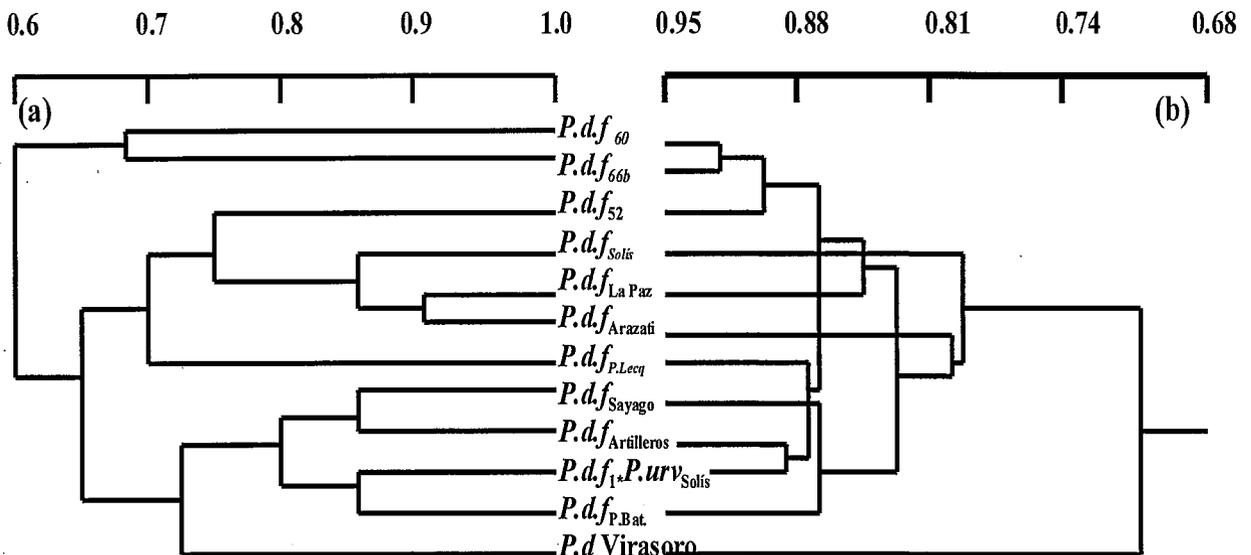


Figura 4. Dendrograma UPGMA usando la matriz de coeficiente de similitud de Jaccard en accesiones de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* usando datos isoenzimáticos (a) y RAPD (b).

polimórficas (98.5%). A nivel intraespecífico en *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, 162 bandas fueron detectados polimórficos (72.3%). Las especies diploides del grupo Dilatata mostraron 80 bandas de las cuales 23 son compartidas (29%), y 57 únicas (71%) (presente en sólo una de ellas). Las tetraploides, originadas a partir de las diploides primarias, muestran 87 bandas, 36 compartidas (41%), 4 presentes en una sola de ellas (5%) y 18 bandas se encuentran en 2 de ellas (20.7%). La especie *P. proliferum* (4X) perteneciente al grupo Livida, presenta 59 bandas de las cuales 19 (32.2%) son comunes con las otras especies 4X y 25 bandas (42.4%) son completamente diferentes de las otras del grupo Dilatata. Las especies que varían entre 5X y 8X presentan las 126 bandas de las cuales 17 se encuentran en todas las especies (13.5%) y 34 (27%) están presentes en una sola especie. A nivel intraespecífico *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, mostró 224 bandas diferentes de las cuales 62 estuvieron presentes en todas las accesiones estudiadas (27.7%) y 24 se encuentran en una sola de ellas (15.2%). (Cuadro 4).

Los diferentes perfiles de bandas al efectuar los Análisis de Componentes Principales, se agruparon en los ejes X, Y y Z (que mostraban 52% de la variabilidad observada) de acuerdo a los niveles de ploidía y ubicación sistemática (Fig. 5). Las accesiones diploides (2x) se agruparon conjuntamente separándose mayormente por el eje X

(explica 31% de la variación) y el eje Y (11% de la variación). Las especies tetraploides del grupo Dilatata (4X) se agruparon en un solo núcleo separándose de las diploides del mismo grupo mayormente por el eje X. La especie 4X del grupo Livida sola, completamente separada del resto de las tetraploides, separada por cualquiera de los tres ejes. La accesión pentaploide (5x) correspondiente al biotipo *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* Melilla se ubicó separada del resto pero más próximas a las hexaploides. Las sub especies hexaploides aunque de diversos orígenes (Uruguiana y Torres-Brasil, Chirú-Uruguay) se agruparon en un solo bloque separadas de las tetraploides mayormente por el eje Y (que explica 11% de la variación). El análisis de accesiones obtenidas en forma artificial a partir de cruza-mientos inter e intraespecíficos, realizados en invernáculo en Uruguay, mostraron asociaciones de acuerdo con su origen. El clon hexaploide sexual obtenido en la Fac. de Agronomía (*P. dilatatum* L.E 69.12) se agrupan conjuntamente pero muy próximas a las especies hexaploides de origen "natural" y al biotipo «Chirú» de la especie sexual hexaploide *P. dilatatum*, del cual deriva aunque separadas de las de origen brasileño por el eje Z (explica 10% de la variación observada). Finalmente el clon sintético *P. dilatatum* "Cundidor" obtenido artificialmente de la hibridación de *P. dilatatum* L.E 69.12 (6X) x *P. proliferum* (4X) se ubicó más próximo a su progenitor hexaploide. El

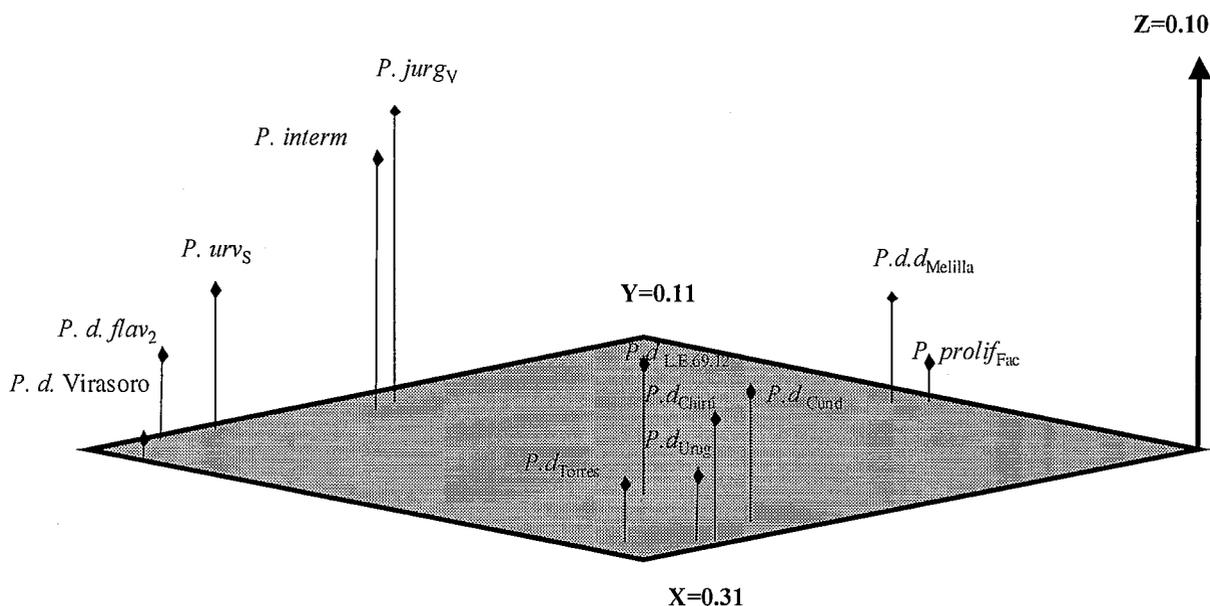


Figura 5. Distribución de 12 accesiones de *Paspalum* en función de los tres primeros componentes principales usando como criterio de clasificación los datos RAPD.

mismo resultado se observó tanto en el análisis basado en las distancias de Jaccard agrupadas según el método UPGMA y el filogenético a partir de las redes de Wagner. El dendrograma obtenido del análisis fenético (Fig. 2b) mostró agrupamientos coincidentes con los niveles de ploidía que separaban en el rango de 0.45 para las especies diploides, 0.55 para las tetraploides del grupo Dilatata y 0.52 para las penta y hexaploides. Todas ellas fueron bien separadas de la especie 4X del grupo Livida, *P. proliferum*, que se ubicó en una posición alejada, con una similitud menor a 0.3.

El análisis (Fig. 6) filogenético mostró agrupamientos completamente coherentes con los niveles de ploidía. En un extremo del árbol aparecieron las especies diploides con un 100% confianza en este sector. Luego muy próximas las tetraploides del grupo Dilatata con una fortaleza del 50% en la ramificación: El árbol se completaba con otras dos ramificaciones: una con 100% de seguridad de las especies 6x con el híbrido "Cundidor" y otro con 80% de fortaleza en la que aparecía la especie tetraploide del grupo Livida, el clon sexual 6x *P. dilatatum* L.E. 69,12 y el biotipo pentaploide *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* Melilla.

DISCUSIÓN

Diversidad genética en especies de *Paspalum*

Existe variación inter e intraespecífica en especies de *Paspalum* tanto a nivel de isoenzimas como RAPD. El relativamente alto nivel de polimorfismo de RAPD (98%) en comparación a las isoenzimas (79%) es coincidente con las bases genéticas de cada una de las técnicas. Las isoenzimas analizan productos de expresión genética (proteínas) mientras que los polimorfismos de ADN analizan directamente variaciones en la secuencia de bases. Cambios en la información genética no siempre se reflejan en los productos de expresión.

Los bajos índices de polimorfismo intraespecífico (36% con isoenzimas y 72.3% con RAPD) es justificado por el modo de reproducción apomítico, mayoritario en las especies del grupo Dilatata. Los análisis en *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*, especie reportada anteriormente como sexual (Milot, 1977; Pereira & Speranza, 1997b) mostraron mayores índices de variabilidad con los marcadores aplicados que se reflejaron en menor proporción de

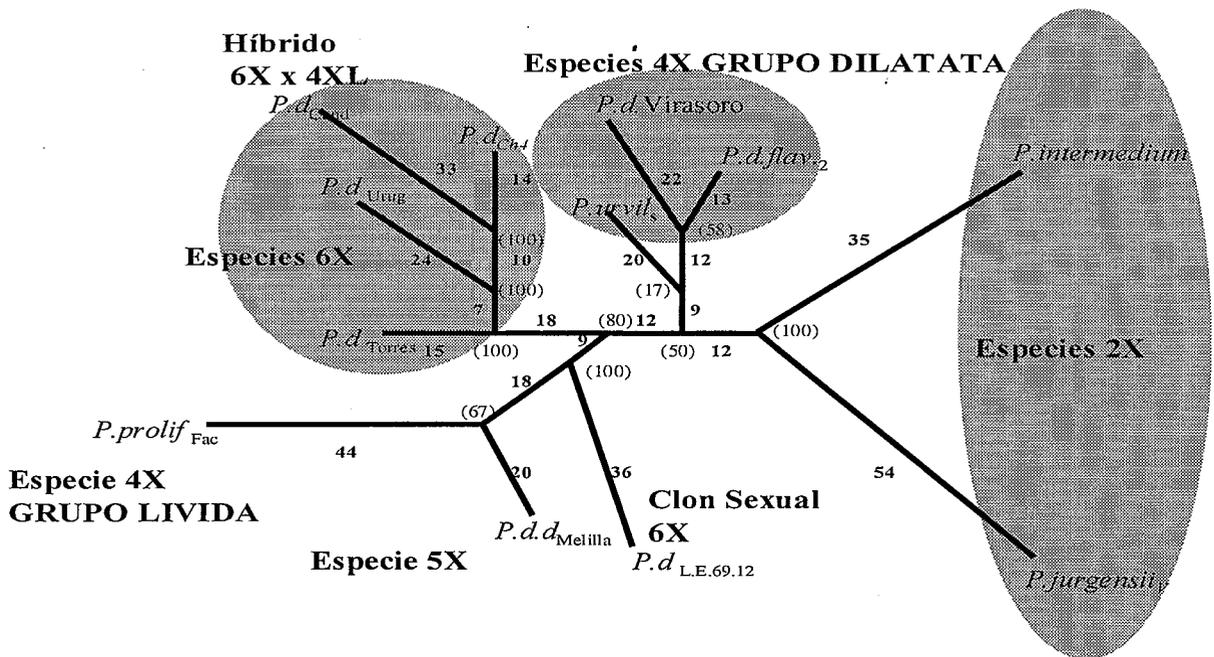


Figura 6. Análisis filogenético usando redes de Wagner en 12 accesiones de *Paspalum* a partir de marcadores RAPD. Los números representan las distancias patrísticas o evolutivas entre las especies. Las cifras entre paréntesis representan las veces que se dio el agrupamiento mostrado, en 100 replicaciones usando el procedimiento «bootstrap».

bandas únicas y compartidas que las otras especies tetraploides (Cuadro 4).

A nivel de las especies diploides, reportadas como las originarias de todo el grupo Dilatata (Burson, 1983) se encontraron los menores niveles de variabilidad genética detectados a partir de los mayores índices de bandas únicas (53% con isoenzimas y 29% con RAPD) que las especies tetraploides. En el caso de las especies Penta, hexa y octoploides se observan menores índices de bandas compartidas (38% y 13.5% con ambos marcadores) que las diploides, resultado que puede ser atribuido a la existencia en tales especies de un tercer genomio (denominado X) de origen desconocido y que no se ha reportado en ninguna especie diploide.

Comparación entre los análisis isoenzimáticos y RAPD

En el presente estudio, la mayoría de las accesiones fueron agrupadas juntas en todos los dendrogramas en función del nivel de ploidía, independientemente de si los datos eran RAPD o isoenzimáticos. Este hecho es indicador que a nivel interespecífico la confiabilidad de los datos isoenzimáticos es similar a la de RAPD. Estudios comparativos usando RAPD, RFLP y/o marcadores isoenzimáticos han mostrado que los RAPD son una herramienta útil para conocer la variación genética a nivel inter como intraespecífico (Liu and Fournier, 1993) y se ha encontrado congruencia entre la estimación de diversidad genética derivada tanto de los datos RAPD como isoenzimáticos (Isabel *et al.*, 1995). Existen otros estudios que muestran coincidencia entre RAPD y RFLP en identificar accesiones o clasificar genotipos de la misma especie (N'goran *et al.*, 1994; Thormann *et al.*, 1994). Aunque en este estudio algunos de los agrupamientos de especies basados en RAPD difieren de los obtenidos con los datos isoenzimáticos, existen similitudes entre los dendrogramas, árboles filogenéticos y análisis de componentes principales. Las siguientes relaciones de agrupamiento pueden ser observadas tanto con datos RAPD como isoenzimáticos: las especies diploides (*P. intermedium*, *P. jurgensii*), tetraploides (*P. dilatatum* Virasoro, *P. dilatatum* ssp. *flavescens*). Una de las mayores diferencias entre ambas relaciones de agrupamiento se ubica a nivel de las especies penta y hexaploides. Es de destacar que los marcadores RAPD agrupan con mejor claridad en los niveles de ploidía 5X y 6X que las isoenzimas. Esto puede deberse al carácter apomítico de la mayoría de especies de este grupo y no haber encontrado marcadores isoenzimáticos diferenciales entre *P. dilatatum* ssp. *dilatatum*_{Melilla} y *P. dilatatum*_{Chirú}. También no ha estado

de acuerdo con el nivel de ploidía la ubicación de *P. dilatatum*_{Torres} en todos los análisis realizados a partir de los datos isoenzimáticos.

A nivel interespecífico los marcadores RAPD son considerados menos confiables para estudiar relaciones filogenéticas, comparados con los marcadores enzimáticos o RFLP, porque alguna de las bandas RAPD co-migrantes podrían no ser homólogas (Thormann *et al.*, 1994; Rieseberg 1996). La ubicación de *P. dilatatum* L.E 69.12 en este estudio podría en parte, ser causada por una falta de homología entre los fragmentos RAPD co-migrantes. Aunque parecería que los enfoques complementarios, como el uso de datos RAPD como isoenzimáticos, podría aportar información más exacta tanto de la diversidad genética como de las relaciones inter e intraespecífica en colecciones de *Paspalum* sp., los diferentes conjuntos de información necesitan ser analizados separadamente. Debido a la incongruencia entre el conjunto de datos isoenzimáticos y RAPD, la mayor parte del árbol de consenso, construido usando ambas fuentes de información, no logra discriminar las especies teniendo en cuenta su nivel de ploidía ni origen evolutivo (dendrograma no mostrado), sugiriendo que la combinación de ambos marcadores no es apropiada.

A nivel intraespecífico el estudio en *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*, fue coincidente en los resultados obtenidos con ambos tipos de datos. Se observaron variaciones en los agrupamientos de materiales, pero ambos diferenciaron claramente las accesiones de *P. d.* ssp. *flavescens*, de la especie que el análisis interespecífico ubicó mas próxima (*P. d.* Virasoro).

Resulta indudable que cuando la variación morfológica causa confusión o errores de identificación, los datos provenientes de RAPD pueden ayudar a una correcta identificación de especies en recursos genéticos de *Paspalum* (Pereira *et al.*, 1999; y el presente estudio). Los análisis RAPD son especialmente valiosos para clasificar colecciones de germoplasma que carecen de suficiente variación isoenzimática (Sun *et al.*, 1997). No obstante, los análisis isoenzimáticos parecer ser mas aconsejados para investigación filogenética o relaciones interespecíficas y en particular para estudiar el origen evolutivo de las especies.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es fruto de los proyectos: "Desarrollo y domesticación de gramíneas forrajeras nativas" financiado por BID - CONICYT (N° 194) y "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 Ing. Agr. Juan Carlos Millot por el apoyo académico y orientación científica prestado a lo largo del desarrollo de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- 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.
- 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 GRATTAPAGLIA, D. 1996. Marcadores moleculares utilizados na genética e melhoramento de plantas. EMBRAPA-CENARGEN, 2da. Ed. pp. 220.
- ISABEL, N.; BEAULIEU, J. and J. BOUSQUET. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 6369-6373.
- LIU, Z.U. and GR. FOURNIER. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. Theor. Appl. Genet. 87: 97-105.
- LYNCH, M. and B.G. MILLIGAN. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. 3: 91-99.
- 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.
- N'GORAN, J.A.K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M. and C. LANAUD. 1994. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. Using RFLP and RAPD markers. Heredity 73: 589-597.
- 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.; FAJARDO, A. and V. SABBIA. 1999. Caracterización genética y filogenética del género *Paspalum* a partir de marcadores moleculares. Agrociencia Vol III. Nº1 pag 1-9.
- RIESEBERG, L.E. 1996. The homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. Mol. Ecol. 5: 99-105.
- ROHLF, F. J. 1993. NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Publishers, New York.
- SABBIA, V. 1998. Relevamiento biogeográfico de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* a partir de marcadores isoenzimáticos. Trabajo final II de Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República. Facultad de Ciencias.
- SUN, M.; CORKE, H. and F. R. GANDERS. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*-Theor. Appl. Genet. 95: 865-873.
- THORMANN, C.E.; FERREIRA, M.E.; CAMARGO, L.E.A.; TIVANG, J.G. and T. C. OSBORN. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. Theor. Appl. Genet. 88: 973-980.
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, L.A. and TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.