

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MEIÓTICO
DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DEL
GÉNERO *PASPALUM***

por

Facundo BASSINI TRUJILLO

**Trabajo final de grado
presentado como uno de los
requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2023**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Trabajo final de grado aprobado por:

Director/a:

Ing. Agr. (PhD) Pablo Speranza

Lic. (PhD) Magdalena Vaio

Tribunal:

Ing. Agr. (PhD) Pablo Speranza

Lic. (PhD) Paola Gaiero

Ing. Agr. (Dr) Andrés Locatelli

Fecha:

9 de noviembre de 2023

Estudiante:

Facundo Bassini Trujillo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores de tesis, Pablo Speranza por su orientación general, y Magdalena Vaio por su ayuda en la interpretación de las fotos.

A Paola Gaiero por sus sugerencias. A Renata Carvalho por su ayuda en el laboratorio.

A Ian Tadich y Nicolás Glison, por los resultados de germinación. A los amigos del LEDP, que compartieron conmigo el día a día durante la realización de este trabajo.

Les dedico este trabajo a mis padres, a mi compañera, a mi tía, y a los amigos.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
2.3 Hipótesis	14
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Identificación del problema: Crisis estival	15
3.2 Gramíneas C4.....	16
3.3 <i>Paspalum dilatatum</i> , una solución.	18
3.3.1 Grupo Dilatata.....	18
3.3.2 Ventajas de su utilización.....	20
3.3.3 Estado actual del uso y venta de semillas de <i>Paspalum dilatatum</i>	22
3.3.4 Desafíos para la inclusión del <i>Paspalum dilatatum</i>	22
3.4 Estrategias para lograr su adopción.....	26
3.4.1 Mejoramiento genético.....	26
3.4.2 Domesticación	27
3.4.3 Tetraploides sexuales del grupo Dilatata.....	28
3.4.4 Hibridaciones interespecíficas	32
3.5 Antecedentes a este trabajo	35
3.6 Consideraciones sobre meiosis.....	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
4.1 Material vegetal.....	41
4.2 Colecta de panojas.....	41
4.3 Preparados.....	42
4.4 Observación de meiosis en microscopio.....	43
4.5 Producción de semilla.....	44

	5
5. RESULTADOS	46
5.1 Comportamiento meiótico	46
5.2 Producción de semilla.....	51
6. DISCUSIÓN.....	54
7. CONCLUSIONES	59
8. BIBLIOGRAFÍA	60

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla No.	Página
Tabla 1 Número de elementos observados en diacinesis I, en 15 células madre del polen para líneas F2	47
Tabla 2 Comportamiento meiótico en metafase I, anafase I y en díadas/tétradas en 15 CMP, para líneas.....	48
Tabla 3 Evaluación de cantidad y calidad de semilla producida para 20 líneas F2	52
Tabla 4 Germinación de semillas viables.....	52
Figura No.	Página
Figura 1 Estimación del uso de semilla nacional de <i>Paspalum dilatatum</i> . Período 2009-2022.....	22
Figura 2 Áreas de distribución de los 5 tetraploides sexuales del grupo	30
Figura 3 Fertilidad de los distintos híbridos interespecíficos del grupo <i>Dilatata</i> reportados hasta el momento	34
Figura 4 Material vegetal	42
Figura 5 Maduración de panoja de <i>Paspalum dilatatum</i>	43
Figura 6 Esquema para mejor comprensión del contexto	45
Figura 7 Fases de la meiosis regular	49
Figura 8 Fases de la meiosis con irregularidades	50
Figura 9 Diferencias de bivalentes asociados al nucléolo.....	51
Figura 10 Diferencia morfológica entre dos líneas	53

RESUMEN

La incorporación de una gramínea perenne estival a la mezcla presenta diversas ventajas, como productividad, distribución estacional de forraje y resiliencia del sistema, además de adaptabilidad al cambio climático. El grupo Dilatata del género *Paspalum* contiene valiosas de estas gramíneas con alto potencial agronómico. De estas especies la más estudiada ha sido *Paspalum dilatatum* var. *dilatatum*, pentaploide de reproducción apomíctica. Esta especie, a pesar de su alta producción de materia seca, presenta numerosas dificultades para su utilización, como ser: baja producción de semilla, infección por *Claviceps paspali*, dormición de semilla y lenta implantación, además de dificultades para su mejoramiento, dada su naturaleza apomíctica. Por lo que un nuevo enfoque se ha venido realizando en Facultad de Agronomía, priorizando en los tetraploides sexuales del grupo (*P. flavescens*, *P. plurinerve*, *P. vacarianum*, *P. dasypleurum* y *P. urvillei*), ya que presentan mayores posibilidades de domesticación, debido a su sistema genético sexual con facilidades para el mejoramiento genético. Estas especies sexuales están emparentadas, tienen alta fertilidad, alta producción de semilla viable, son autógamas y comparten la fórmula genómica $2n = 4x = IIJJ$, por lo que la hibridación entre ellas sería posible. Una estrategia de mejoramiento es la hibridación interespecífica buscando combinar lo mejor de cada especie para la formación de un cultígeno. Para poder llevar a cabo un programa de hibridación interespecífica, es necesario probar que el germoplasma con que se cuenta se puede hibridar sin disminuciones en la fertilidad de sus híbridos. Como antecedentes directos a este trabajo, previamente se generó una población biparental de líneas puras segregantes (RILs en inglés) a partir del cruzamiento de *P. flavescens* x *P. plurinerve* (ambas especies promisorias y parecidas al “común” en cuanto a productividad, además de presentar diferencias en cuanto a fecha de floración y dormición de semilla) mediante el método DUS, para poder evaluar la potencialidad de este método de mejoramiento, buscando segregación transgresiva, además de genotipar y fenotipar toda la colección para identificar QTLs asociados a caracteres de domesticación, como por ejemplo menor dormición de semilla. Durante estos esfuerzos, se constató esterilidad en algunas líneas tempranas y una distorsión en la segregación de marcadores moleculares tipo microsatélite en F₆. Estos fenómenos pueden estar asociados a irregularidades en la meiosis del híbrido, ya que, aunque especies emparentadas, tienen diferencias en sus genomas. Por tanto, en este trabajo se analizó el comportamiento meiótico en 20 líneas F₂ provenientes de la hibridación interespecífica de *P. flavescens* x *P. plurinerve*, además del grado de fertilidad de estas líneas a partir de la producción de semilla. Se registró un mínimo de 15 células madre del polen para las fases de diacinesis, metafase, anafase y díadas/tétradas, buscando detectar asociaciones distintas a bivalentes en diacinesis, adelantos cromosómicos en metafase, puentes o atrasos de cromosomas en anafase y micronúcleos en díadas/ tétradas. Los resultados muestran que un 9,5% de las

CMP estudiadas presentaron irregularidades en la meiosis, sin observar ningún micronúcleo en díadas/tétradas, por lo que irregularidades en fases tempranas de la meiosis, terminan por resolverse en fases tardías. La producción de semilla de las 20 líneas fue de 0% a 63%, con un 28% en promedio de semillas llenas. No se encontraron irregularidades en la meiosis que expliquen la baja fertilidad de algunas líneas. Por lo tanto, la meiosis no explica la esterilidad en las líneas tempranas reportadas anteriormente, ni tampoco la distorsión en la segregación. Otras razones pueden explicar estos fenómenos, como, por ejemplo, un control genético de la esterilidad, es decir que existan genes que provoquen la esterilidad en híbridos interespecíficos. Técnicas de citogenética molecular como FISH y de marcadores moleculares en F₂ pueden determinar en qué momento de la endocria ocurre la distorsión en los marcadores, además de saber, utilizando GISH, cómo es el sesgo hacia los alelos maternos en los cromosomas de líneas F₆.

Palabras clave: *Paspalum dilatatum*, tetraploides sexuales del grupo Dilatata, hibridación interespecífica, comportamiento meiótico, mejoramiento genético

SUMMARY

The addition of a summer perennial grass to the pasture mixes presents various advantages, such as productivity, seasonal distribution of forage, and resilience, as well as adaptability to climate change. The Dilatata group of the genus *Paspalum* contains valuable of these grasses with high agronomic potential. Of these species, the most studied has been *Paspalum dilatatum* var. *dilatatum*, a pentaploid with apomictic reproduction. This species, despite its high production of dry matter, presents numerous difficulties for its use, such as: low seed production, infection by *Claviceps paspali*, seed dormancy and slow implantation, as well as difficulties for its improvement. given its apomictic nature. Therefore, a new approach has been carried out in the Faculty of Agronomy, prioritizing the sexual tetraploids of the group (*P. flavescens*, *P. plurinerve*, *P. vacarianum*, *P. dasyleurum* and *P. urvillei*), since they present greater possibilities of domestication, due to its sexual breeding system which facilitates genetic improvement. These sexual species are related, have high fertility, high viable seed production, are autogamous and share the genomic formula $2n = 4x = IIJJ$, so hybridization among them should be possible. One breeding strategy is interspecific hybridization seeking to combine the best of each species for the formation of a cultigen. In order to carry out an interspecific hybridization program, it is necessary to prove that the available germplasm can be hybridized without decreasing hybrid fertility. As a direct background to this work, a biparental population of recombinant inbred lines (RILs) was previously generated from the cross of *P. flavescens* x *P. plurinerve* (both promising species and similar to the "common" genotype in terms of productivity, in addition to presenting differences in terms of flowering date and seed dormancy) using the SSD (single seed descent) method. This previous aim was to evaluate the potential of this breeding method, looking for transgressive segregation, in addition to genotyping and phenotyping the entire collection to identify QTLs associated with domestication characters, such as reduced dormancy. During these efforts, sterility was found in some early lines and a distortion in the segregation of microsatellite-type molecular markers in the F₆. These phenomena may be associated with irregularities in the meiosis of the hybrid, since although related species, they have differences in their genomes. Therefore, in this work, the meiotic behavior of 20 F₂ lines from the interspecific hybridization of *P. flavescens* x *P. plurinerve* was analyzed, as well as the degree of fertility of these lines based on seed production. A minimum of 15 pollen mother cells (PMCs) were recorded for diakinesis, metaphase, anaphase, and dyads/tetrads, seeking to detect associations other than bivalents in diakinesis, chromosome advances in metaphase, bridges or delays of chromosomes in anaphase and micronuclei in dyads/tetrads. The results show that 9,5% of the PMCs studied presented irregularities in meiosis, without observing any micronuclei in dyads/tetrads, so that irregularities in early phases of meiosis end up being resolved in later phases. Seed production of the 20 lines ranged from 0% to 63%, with an average of 28% full

seeds. No irregularities in meiosis were found to explain the low fertility of some lines. Therefore, meiosis does not explain the sterility in the early lines reported above, nor the distortion in segregation. Other reasons may explain these phenomena, such as genetic control of sterility, that is, there are genes that cause sterility in interspecific hybrids. Molecular cytogenetic techniques like FISH and molecular markers in F₂ lines can determine at what point in inbreeding the distortion in the markers occurs, in addition to describing, using GISH, the bias towards maternal alleles in the chromosomes of F₆ lines.

Keywords: Paspalum dilatatum, sexual tetraploids of the Dilatata group, interspecific hybridization, meiotic behavior, genetic improvement

1. INTRODUCCIÓN

La baja disponibilidad de forraje durante el verano es un desafío al que se enfrentan muchos productores, debido a las mezclas más comúnmente utilizadas, compuestas de gramíneas invernales y leguminosas invernales y estivales. Estas mezclas son susceptibles a las condiciones ambientales del verano: altas temperaturas y baja disponibilidad de agua. Esto lleva a una producción irregular entre estaciones y a que la vida útil de las pasturas perennes no sea mayor a 4 años, determinado en parte por el enmalezamiento de *Cynodon dactylon*, y por el sobrepastoreo. La inclusión de gramíneas de metabolismo C4 en las mezclas presenta ventajas en cuanto a productividad, distribución estacional de forraje y resiliencia. Además, estas especies están mejor adaptadas al cambio climático. El grupo Dilatata, perteneciente al género *Paspalum*, incluye varias gramíneas de metabolismo C4, nativas de América del Sur, con marcado potencial agronómico. Este complejo de especies presenta desde tetraploides sexuales hasta apomícticas de 4x a 7x. *Paspalum dilatatum* var. *dilatatum* es el miembro más estudiado del grupo y de más amplia distribución, desde el sur de Brasil, Uruguay y este de Argentina. Es una gramínea que presenta muchas ventajas y aptitudes agronómicas que la hacen deseable para su utilización, como ser la alta producción de MS en verano (evitando el enmalezamiento por *Cynodon dactylon* y aprovechando los recursos de esta estación), la tolerancia a heladas durante el invierno, y el hábito cespitoso que favorece el crecimiento de los otros componentes de la mezcla. Sin embargo, una serie de limitantes ha impedido que se adapte con normalidad en los sistemas de producción. Una de ellas y principal, es la producción de semillas en calidad y cantidad, debido a la infertilidad asociada a su reproducción apomíctica y a la infección por el hongo *Claviceps paspali*. Además, el desprendimiento de la semilla madura y una alta dormición de la misma, complejizan la adopción de esta especie. Estas limitantes pueden resolverse mediante mejoramiento genético y domesticación. Estos esfuerzos han estado centrados históricamente en los apomícticos del grupo, más específicamente en el “común”, de naturaleza genética pentaploide. Este nivel de plodía, sumado a su reproducción apomíctica, han constituido una barrera para el mejoramiento, ya que dificultan los cruzamientos, y además difícilmente se logre obtener un híbrido mejor que el que ya se encuentra en la naturaleza.

Un nuevo enfoque se ha venido realizando en Facultad de Agronomía-UdelaR, priorizando en los materiales sexuales del grupo, especies con mayor potencial para la domesticación. Los 5 tetraploides sexuales (*P. flavescens*, *P. plurinerve*, *P. vacarianum*, *P. dasyleurum* y *P. urvillei*) presentan una alta fertilidad, meiosis regular, comparten la misma fórmula genómica $2n = 4x = 40$ IIJJ, tienen herencia disómica y son mayormente autógamas. Los objetivos de mejoramiento ya no son sólo productividad, sino características de domesticación, como ser: mayor producción de semilla, diferencias en dormición de semilla y rápida implantación. Estas especies al ser sexuales producen mayor cantidad de

semilla, además de que tienen baja infección por *Claviceps paspali*. Por tanto, la utilización de las mismas en un programa de hibridación interespecífica, que permita aprovechar este amplio acervo genético, buscando lo mejor de cada especie y combinándolas, es una estrategia hasta ahora inexplorada. Ahora bien, para que esto sea posible, es necesario que estas especies, aunque distintas, puedan cruzarse entre sí sin disminuciones en la fertilidad de sus híbridos.

En trabajos anteriores se generó una población biparental a partir de *P. flavescens* x *P. plurinerve*, para genotipar a la progenie y a sus progenitores, y así construir un mapa de ligamiento para identificar QTLs asociados a caracteres agronómicos de interés, así como también evaluar la segregación transgresiva en las F₆. El objetivo que dirige todos estos esfuerzos es el de probar un método por el cual, a futuro, obtener un cultígeno de pasto miel, productivo tanto a nivel de forraje como a nivel de semilla, que logre implantarse con facilidad, además de otras características de domesticación. En el transcurso de estos esfuerzos, se encontró, por parte de Sandro (2020), que muchas líneas en generaciones tempranas luego de la hibridación interespecífica, eran infértiles, es decir, que no producían semilla y por lo tanto el proceso de endocria se detuvo antes de alcanzar la F₆ para esas líneas. Además, Dogliotti (2021), estudiando el modo de herencia de 15 marcadores microsatélites, detectó que, en generaciones avanzadas, había un sesgo hacia los alelos maternos (*P. flavescens*), es decir que aparecían más los alelos maternos, que los alelos paternos (*P. plurinerve*) en las líneas F₆, fenómeno conocido como distorsión en la segregación. Esto condiciona los resultados del mapa genético por una incorrecta estimación de las distancias entre los marcadores. Ahora bien, estos problemas aparecidos en el transcurso de los trabajos antecedentes pueden tener su origen en causas asociadas a los cromosomas y su división en meiosis. Las irregularidades en la meiosis pueden, además, llevar a la formación de gametos desbalanceados, y por tanto disminuir la fertilidad. También estas irregularidades pueden llevar a que los alelos maternos de *P. flavescens* se hereden en mayor proporción que los alelos paternos de *P. plurinerve*, con consecuencias al momento de lograr incluir en las F₆, los caracteres deseables para la domesticación que presenta *P. plurinerve*, como por ejemplo la menor dormición de semilla.

Estas dos especies, si bien emparentadas, han evolucionado distinto durante el proceso de diploidización, pudiendo existir rearrreglos en sus genomas como inversiones y translocaciones, que deriven en versiones distintas de los mismos genomas IIJJ. Es posible que, por estas diferencias, y por falta de colinealidad entre los loci, durante la meiosis de los híbridos resultantes de este cruzamiento, se dé un entrecruzamiento irregular entre los cromosomas. Las irregularidades en la meiosis pueden adoptar diversas formas, según la fase de la meiosis: por ejemplo, en diacinesis pueden haber asociaciones distintas a bivalentes, en metafase cromosomas ubicados por fuera de la placa ecuatorial, en anafase pueden existir puentes de cromatina o cromosomas que no están migrando de forma sincrónica, y en diádas/tétradas pueden haber micronúcleos. Una de las consecuencias de estas

irregularidades en la meiosis pueden ser la baja fertilidad de la progenie y la distorsión en la segregación de los marcadores. Por lo tanto, en este trabajo se analiza distintas fases de la meiosis, buscando irregularidades que sean la causa de estos fenómenos.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Aportar información que permita elucidar las causas de la baja fertilidad y la distorsión en la segregación observadas en líneas derivadas de una hibridación interespecífica entre los tetraploides sexuales *P. flavescens* x *P. plurinerve* pertenecientes al grupo Dilatata.

2.2 Objetivos específicos

1. Analizar el comportamiento meiótico en diacinesis, metafase, anafase y díadas/tétradas y detectar posibles irregularidades.
2. Cuantificar la fertilidad a través de la producción de semillas viables y compararla con la meiosis de cada una de las líneas.
3. Evaluar el impacto de irregularidades en la meiosis en distintas líneas F₂ y su momento de ocurrencia en el proceso meiótico, en la fertilidad y en la distorsión en la segregación reportados en trabajos anteriores.
4. Proponer otras causas responsables que expliquen la baja fertilidad y la distorsión en la segregación, y aportar nuevos enfoques de trabajo para mayores conocimientos.

2.3 Hipótesis

La esterilidad en líneas tempranas y la distorsión en la segregación de marcadores moleculares en F₆ reportados en trabajos anteriores se deben a irregularidades en la meiosis.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Identificación del problema: Crisis estival

La disponibilidad de forraje en cantidades suficientes a lo largo de todo el año es uno de los principales desafíos de los sistemas pastoriles de producción ganadera que constituyen una alta proporción del sector en Uruguay. Las mezclas de gramíneas invernales y leguminosas invernales y estivales son la base de los sistemas de producción ganadero y lechero. Las mismas buscan tener complementariedad en los ciclos de crecimiento, maximizando los rendimientos de materia seca a lo largo del año y manteniendo las bondades de cada familia (Carámbula, 2002). Un ejemplo de productividad y distribución estacional de una mezcla muy utilizada en el Uruguay es la mezcla simple de *Festuca arundinacea*, *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus*, la cual, en su segundo año de vida, donde alcanza su máxima producción, presenta una oferta de forraje en otoño de 2 tMS/ha, en invierno 1,8 tMS/ha, en primavera 3,8 tMS/ha y en verano 1,4 tMS/ha (García, 1995). Como se puede ver, las máximas producciones se dan en primavera y las mínimas en verano, y la producción invernal es mayor a la estival (Millot, 1969). Además, la calidad medida como % de MS digestible es mínima en verano (Carámbula, 1977). Esto es debido a que las gramíneas perennes disponibles a nivel comercial en nuestro país son en su gran mayoría de crecimiento invernal.

En regiones templadas y frías, donde las gramíneas y leguminosas invernales están bien adaptadas, estas mezclas son muy favorables, ya que optimizan cantidad y calidad de forraje en todo el año, y generan un sistema sustentable en el tiempo, con bajo uso de insumos (Muir et al., 2011; Peeters et al., 2006; Sleugh et al., 2000). En Uruguay, dado que el país se encuentra ubicado en una zona de transición climática entre la región templada y subtropical, las condiciones climáticas son erráticas, manifestadas en grandes variaciones en la temperatura y la disponibilidad de agua. En estas condiciones, las pasturas se ven expuestas a períodos de estrés que comprometen su persistencia. El origen templado de la mayoría de las especies sembradas las hace susceptibles a altas temperaturas y baja disponibilidad de agua, lo que se considera una de las principales causas de su bajo rendimiento (Dear & Ewing, 2008). Por lo que hace al verano una estación muy crítica para la producción de forraje, llevando a que la misma sea muy irregular entre estaciones, con períodos de escasez y de exceso.

La vida útil de la mayoría de las pasturas perennes, aún con un manejo adecuado, rara vez supera los 4 o 5 años, disminuyendo considerablemente la productividad de las mismas. La muerte de especies sembradas en verano, principalmente *Trifolium repens*, deja un nicho rico en nitrógeno que es aprovechado por especies invasoras mejor adaptadas (Carámbula, 2002; Formoso, 2007). En nuestra región, las gramíneas con metabolismo C4 son las principales colonizadoras de estos espacios ya que durante el verano las altas temperaturas y la

escasez de agua les brindan importantes ventajas frente a las especies de metabolismo C3. En particular, *Cynodon dactylon*, una especie introducida de metabolismo C4, es citada como la principal maleza en Uruguay (Ríos & Giménez, 1992). Esta especie tiene una gran capacidad de propagación vegetativa que excluye a otras especies, ya que es estolonífera-rizomatosa, además de tener una calidad forrajera ordinaria y un período de reposo invernal. Esto la hace un componente indeseable de las pasturas, en parte responsable de la corta duración de la fase pastura en las rotaciones de nuestro país (García, 1995; Santiñaque, 1979). A su vez, la escasez de forraje durante el verano, se ve agravada por el sobrepastoreo en otoño, cuando la disponibilidad de forraje disminuye. Esta disminución se debe a una menor superficie de pastoreo, ya que las pasturas de cuarto año están terminando su vida productiva y se están sembrando nuevas pasturas. Esto termina por agravar más la situación (Formoso, 2011). La alta proporción de superficie de siembra cada año, es a su vez, una consecuencia de la corta vida útil de las mezclas perennes, generando un círculo de causas y efectos negativo, haciendo que la corta duración de la fase pasturas sea la principal problemática en los sistemas lecheros (González Barrios & Astigarraga, 2012). Cuando la riqueza de especies es baja, como en las pasturas sembradas, el servicio ecosistémico puede incrementarse agregando nuevas especies (Picasso et al., 2008). Dicho esto, una alternativa para solucionar esta situación, es la inclusión de un nuevo grupo funcional a la mezcla, una gramínea perenne estival de metabolismo C4 que estabilice la producción y le otorgue resiliencia al sistema.

3.2 Gramíneas C4

El agregado de una gramínea C4 a las mezclas más comúnmente utilizadas en Uruguay, presenta diversas ventajas económicas, productivas, y de sustentabilidad en el tiempo. La investigación en mezclas forrajeras, ha demostrado resultados positivos en cuanto al aumento de la diversidad, en la productividad y otras variables agronómicas (Hector et al., 1999; Loreau et al., 2001; Picasso et al., 2008). Otros trabajos (Picasso et al., 2008; Sanderson et al., 2004) trabajando con mezclas forrajeras, argumentan que la producción de las mezclas que incluyan cultivos forrajeros altamente productivos es alta tanto a bajos como a altos niveles de diversidad; sin embargo, las mezclas más complejas son capaces de maximizar otras funciones ecosistémicas, como ser distribución temporal de la producción, persistencia, resistencia a la invasión de malezas y tolerancia a fluctuaciones ambientales, logrando una mayor sustentabilidad. La complementariedad de ciclos, en nuestro clima templado-templado cálido, es de fundamental importancia, ya que sin la inclusión de una gramínea C4 existen períodos de exceso y de escasez de producción, constituyendo al verano en una estación crítica. Por lo que la inclusión de este grupo funcional le otorga estabilidad ecológica al sistema y una distribución estacional más balanceada (Campbell, 1999; Johnston, 1996). Otros conceptos relevantes son el de grupo funcional y resiliencia del sistema. Un grupo funcional

se define como plantas que generan similares efectos en los procesos ecosistémicos, o plantas que responden de forma similar a las perturbaciones (Friedel et al., 1988; Gitay & Noble, 1997). Para que exista resiliencia, definida como la capacidad de los sistemas de absorber perturbaciones, pudiendo volver a su estado original después de terminada dicha perturbación (Holling, 1973), tiene que haber variabilidad de grupos funcionales y en sus respuestas (Chapin et al., 1997; Díaz & Cabido, 2001). Por tanto, la inclusión de una gramínea C4 a la mezcla, aporta significativas ventajas en cuanto a productividad, pero también en cuanto a su distribución estacional y a mejoras en la estabilidad ecológica del sistema, evitando el enmalezamiento y prolongando la vida útil de las pasturas.

Las gramíneas de metabolismo C4 son fotosintéticamente más eficientes que las gramíneas de metabolismo C3, debido a la anatomía “Kranz” de sus hojas, lo que hace a la planta más eficiente en el uso del agua. Como dicen Moser et al. 2004: “una planta C4 necesita $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ de agua para producir una unidad de MS de la que precisa una C3”, además de maximizar su actividad fotosintética a altas temperaturas y luminosidad por activación de la enzima RubisCO. Este metabolismo hace que en las células del mesófilo se forme una molécula de 4C como compuesto intermediario y por lo tanto aumente la concentración de CO₂ (2000 ppm, a diferencia de la concentración de la atmósfera de 330 ppm), obligando a la RubisCO a fijar CO₂ en vez de fotorespirarlo (Monza & Signorelli, 2014). Por lo que estas especies, solas o como componentes de la mezcla, serían capaces de aprovechar recursos disponibles en el período estival, como la radiación y las precipitaciones, que en la situación actual son poco aprovechados por las pasturas perennes.

Además de las ventajas intrínsecas de la inclusión de estas gramíneas C4, otro aspecto que cada vez tiene mayor importancia, es lo relacionado a la adaptación al cambio climático y el efecto en la sustentabilidad de los sistemas pastoriles. Las predicciones de un aumento en la temperatura y el total anual de precipitaciones para el Uruguay, aunque con una distribución irregular, permiten prever condiciones más favorables para estas especies (Bettolli et al., 2010), y un aumento en la productividad de las pasturas que contengan este tipo funcional (Giménez et al., 2009). Sumado a esto, existe evidencia de que la inclusión de especies C4 en mezclas con leguminosas, permite acelerar el secuestro de carbono en los suelos (Fornara & Tilman, 2008), alcanzando mayor profundidad en el perfil (Mueller et al., 2013).

Estas gramíneas perennes estivales de metabolismo C4, contribuyen significativamente a la producción de forraje a nivel mundial, como la *Brachiaria Brizantha* cv. Marandú y el *Panicum maximum* cv. Mombasa, muy utilizado en el Brasil, máximo exportador de carne del mundo, sembrados en ambientes tropicales luego de la deforestación de la Amazonia (Jank et al., 2014). Muchas de las gramíneas tropicales disponibles en los mercados internacionales, están confinadas a regiones tropicales o subtropicales, e interrumpen su producción con temperaturas

frías (Moser et al., 2004). Dichas especies no se adaptan a las condiciones climáticas templadas del Uruguay, en particular a la ocurrencia de heladas tempranas, que provoca la muerte de las plantas por el frío. Por lo que una solución puede encontrarse en una especie nativa de metabolismo C4, que esté adaptada a nuestras condiciones, como el *Paspalum dilatatum*.

3.3 *Paspalum dilatatum*, una solución.

3.3.1 Grupo Dilatata.

Con alrededor de 350 especies *Paspalum* L. es uno de los géneros más abundantes dentro de la familia de las Poaceas (Rua et al., 2010). Este género pertenece a la subfamilia Panicoideae, tribu de las Paspaleas (Rosso et al., 2022). Sus especies habitan áreas ecológicamente diversas en América del Norte, América Central, y América del Sur (Chase, 1929). Las especies del género *Paspalum* son en gran parte responsables de la biodiversidad de los ecosistemas de pastizales en América del Sur y varias de sus especies son valiosas gramíneas forrajeras (Rosso et al., 2022). El género *Paspalum* se ha dividido tradicionalmente en grupos morfológicos informales (Chase, 1929). *Paspalum dilatatum* var. *dilatatum* o “común”, y especies relacionadas se han incluido en el grupo Dilatata. El grupo Dilatata comprende pastos de estación cálida con metabolismo C4, nativos de los pastizales templados en el Sur de América del Sur. Son tolerantes a heladas frecuentes durante el invierno (Burson et al., 1991; Da Costa & Scheffer-Basso, 2003b), y algunos miembros del grupo han alcanzado distribuciones mundiales donde existe un clima templado cálido combinado con suficiente precipitación (Speranza, 2009). Este grupo ha sido el más intensamente estudiado dentro del género, ya que contiene varias especies con uso potencial como cultivos forrajeros (Pizarro, 2002). Dentro del grupo, el miembro más estudiado, por ser el de mayor aptitud forrajera y de más amplia distribución, es *Paspalum dilatatum* var. *dilatatum*. Se distribuye al sureste de América del Sur, región que comprende el Uruguay, litoral y centro de Argentina y el sur de Brasil. Está adaptada a diversos tipos de suelos y a un amplio rango de condiciones edáficas, siendo tolerante a la humedad excesiva y al mismo tiempo resistente a sequías moderadas (Carámbula, 1977; Rosengurtt et al., 1970). Esto puede estar explicado por su extenso desarrollo radicular, propio de las gramíneas perennes (Judd, 1975). Esta especie está particularmente adaptada al clima templado y de transición, presentando un crecimiento óptimo en verano y con tolerancia a heladas, una combinación deseable e inusual dentro de las gramíneas estivales (Campbell, 1999; Loreti & Oesterheld, 1996; Rowley et al., 1975). El crecimiento de la planta se incrementa con temperaturas de comienzos de primavera y florece a fines de la misma, y continúa con la floración, fructificación y producción de forraje hasta el comienzo de las primeras heladas otoñales (Millot, 1969). En cuanto a su aptitud forrajera, fue caracterizada como “fina” (Rosengurtt, 1979). La caracterización morfológica de

esta especie fue realizada por Rosengurtt: gramínea de tipo C4, perenne cespitosa, de ciclo estival con rizomas cortos, engrosados. Hojas con matices violáceos, vaina pubescente, lígula membranácea truncada, y lámina glabra con pelos dispersos en la base. La inflorescencia está compuesta por espigas unilaterales y éstas últimas por espiguillas casi sésiles que nacen en dos hileras a un lado del raquis (Rosengurtt et al., 1970). Según Rosengurtt (1943, 1946), es uno de los pastos productivos que demora más en exterminarse en las degradaciones pratenses. Por lo tanto, debido a sus características, esta especie presenta beneficios en cuanto a su adopción a la mezcla, solucionando el principal problema antes planteado de la crisis estival.

Desde el punto de vista evolutivo, se ha establecido bien que el grupo Dilatata es un complejo alopoliploide de tetraploides sexuales: *P. flavescens*, *P. plurinerve*, *P. vacarianum*, *P. dasypleurum* y *P. urvillei*, y varios híbridos apomícticos de 4x a al menos 7x que están estrechamente relacionados (Speranza, 2009; Vaio et al., 2019). *Paspalum dilatatum* var. *dilatatum*, es un híbrido alopoliploide, y se reproduce por apomixis apospórica (Burson, 1983; Speranza & Malosetti, 2007). La apomixis es un mecanismo de reproducción asexual a través de semillas (Nogler, 1984). El nivel de ploidía es pentaploide, de fórmula genómica $2n = 5x = 50$ (IIJXX). Forma 20 bivalentes y 10 monovalentes en meiosis. Esta especie es altamente heterocigota (Speranza, 2009). Todas las especies dentro del grupo Dilatata comparten la fórmula genómica IIJJ, donde *P. intermedium* Munro ex Morong & Britton y *P. juergensii* Hack. se sugirieron como sus supuestos progenitores y donantes de los genomas I y J, respectivamente (Burson, 1978, 1979; Caponio & Quarin, 1990; Quarin & Caponio, 1995; Quarin & Norrmann, 1990). Los análisis filogenéticos realizados por Vaio et al. (2019) también respaldan la relación de estas especies con los donantes de ambos genomas del grupo Dilatata. Todos los miembros apomícticos del grupo tienen al menos una copia del genoma X, que hipotéticamente es el responsable de la base genética de la apomixis (Burson, 1995). Se ha estudiado la variabilidad genética del grupo y su estructuración geográfica. Speranza (2005) propuso que las dos fuentes principales de variabilidad genética en especies apomícticas son la recombinación sexual y las mutaciones. La recombinación sexual sólo puede ocurrir en aquellos lugares donde existan contrapartes sexuales compatibles. *P. dilatatum* var. *dilatatum* está constituido por un único clon dominante y varios clones recombinantes derivados en su mayor parte de éste. El clon dominante es heterocigoto para todos los loci analizados y se encuentra distribuido en toda el área nativa de la especie. Los recombinantes, fijados por apomixis, son en su mayoría derivados del clon dominante y constituyen híbridos F₁ de éste con las especies tetraploides locales. En el caso de *P. dilatatum* var. *dilatatum* se identificaron tres grupos de recombinantes según la fuente de sexualidad involucrada. La distribución geográfica de dos de estos grupos se relaciona con el área de distribución de los tetraploides sexuales cuya participación es sugerida por los alelos de microsatélites que contienen: *P. plurinerve* y *P. flavescens*. Sin embargo, un tercer grupo de recombinantes, se distribuye en un área

en la cual no se han identificado tetraploides del grupo *Dilatata* y contienen alelos que delatan la participación de una fuente de sexualidad desconocida. Esta fuente de sexualidad puede estar actualmente extinta o existir en forma relictual aún no detectada. La participación de *P. plurinerve* en hibridaciones con biotipos apomícticos fue sugerida por Machado et al. (2005) en base a un carácter de fácil observación como el número de nervaduras en las glumas. En cambio, para la participación de *P. flavescens* no se cuenta con evidencia morfológica. Por lo que se ha logrado entender la estructura de la variabilidad genética para esta especie.

También se han realizado estudios de caracterización fenotípica dentro del grupo. Por ejemplo, Rodríguez (2010) realizó una caracterización morfológica entre grupos de genotipos pentaploides diferenciados genéticamente (el clon dominante y los recombinantes) y encontró variabilidad fenotípica; halló que dicha variabilidad estaba distribuida entre y dentro de los grupos genéticos, siendo la variabilidad intergrupala mayor a la intragrupal, y observó entre dichos grupos un solapamiento parcial. Michelini (2010) realizó una caracterización morfofisiológica a través de la cuantificación de las variables filocrón y tasa de elongación foliar. Al analizar la distribución de la variabilidad fenotípica para los grupos genéticos constituidos por los clones recombinantes y sus contrapartes sexuales, encontró que la variabilidad para estas características estuvo mayormente distribuida entre grupos genéticos que dentro de estos. También al analizar filocrón y tasa de elongación foliar, para los distintos niveles de ploidía, encontró que la variabilidad genética estuvo distribuida entre los niveles de ploidía en mayor medida que dentro de estos, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas; además halló que los valores de filocrón fueron mayores a medida que el nivel de ploidía aumentó de 4x a 6x, pero no existió el mismo patrón de variación para tasa de elongación foliar en relación a aumentos en el nivel de ploidía. Quintans (2013) encontró variabilidad fenotípica al estudiar producción, estacionalidad y calidad del forraje de planta entera. Encontró variabilidad entre y dentro de grupos genéticos al estudiar producción de materia seca y relación lámina tallo y encontró variabilidad entre genotipos al estudiar estacionalidad, evolución de la relación lámina tallo, % materia seca, evolución del % de materia seca, % fibra detergente neutro y % fibra detergente ácido. Estos resultados prueban que se cuenta con un germoplasma muy diverso y que dentro del mismo hay caracteres agronómicos deseables para el mejoramiento genético y la domesticación.

3.3.2 Ventajas de su utilización

Trabajos experimentales han mostrado la aptitud productiva de *P. dilatatum* en la región, y en otras partes del mundo (Venuto et al., 2003). El objetivo de la inclusión de una gramínea perenne estival en una mezcla convencional constituida por gramíneas invernales y leguminosas sería el de aumentar su diversidad sin ocasionar fuertes interacciones con el resto de los componentes, evitando la dominancia y permitiendo aprovechar los beneficios de todas las especies presentes.

En este sentido, Tejera et al. (2016) evaluaron el efecto de la inclusión de *P. dilatatum* y *P. notatum* en una mezcla forrajera perenne convencional. Estas dos gramíneas tienen hábitos de vida contrastantes, la primera es cespitosa y la segunda es estolonífera. Los resultados fueron que las mezclas con *Paspalum notatum* tuvieron un bajo desempeño invernal, explicado por el denso tapiz que genera esta especie excluyendo a la *Festuca*, disminuyendo su cobertura y biomasa. Esto no se vio con la inclusión de *Paspalum dilatatum* en la mezcla, por lo que permitió un aumento de la producción en el verano sin perjudicar el desempeño de la mezcla en el invierno. Saldanha et al. (2017) evaluaron el comportamiento productivo y reproductivo de varias especies del género. El cultivar Chirú y *Paspalum urvillei* fueron los materiales con mayor precocidad debido a una mayor producción inicial, con altas tasas de crecimiento diario, mientras que *P. dilatatum* var. *dilatatum*, *P. flavescens* y *P. notatum* tuvieron tasas de crecimiento más bajas. Luego de este período inicial, estas diferencias ya no fueron significativas en cuanto a producción de MS. También se encontraron diferencias entre materiales en cuanto a características estructurales, especialmente en el % de macollos reproductivos. Por tanto, se constataron diferencias entre ciclos reproductivos y vegetativos de los diferentes materiales, por lo que se infiere que en este grupo se encuentran materiales apropiados para un amplio rango de situaciones particulares.

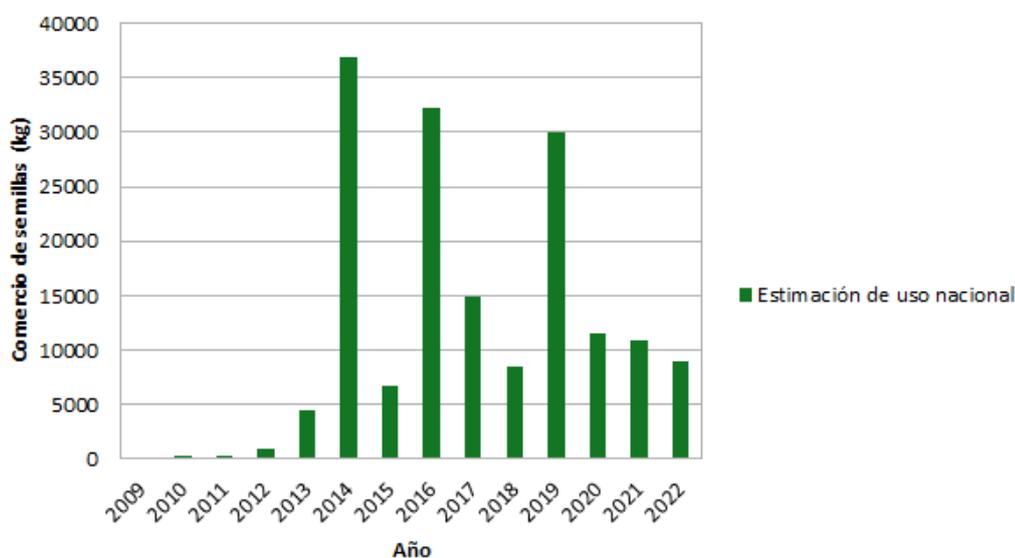
También presenta ventajas en cuanto a su morfología, fisiología y estacionalidad. Varios autores concuerdan en que el contenido de reservas en esta especie desempeña en los rebrotes un rol más importante que la superficie foliar remanente. Por tanto, la morfología de la planta, con respecto a la ubicación de sus puntos de crecimiento y su fisiología, a través de órganos de reserva, hacen que el crecimiento de los rebrotes luego de la defoliación, sea eficiente (Carámbula, 2002). Quintans (2013) trabajó con un conjunto de variantes recombinantes del clon original, además de especies hexaploides y un tetraploide sexual. Determinó que hubo una fuerte interacción genotipo x localidad, ya que ocurrió una precipitación abundante en una de las localidades, lo que llevó a comportamientos muy disímiles entre los diferentes grupos genéticos. La producción promedio de toda la colección fue de 10663 (kgMS/ha) y 10019 (kgMS/ha) para dos localidades distintas. Para el biotipo común, Millot (1969) obtuvo producciones entre 10 y 12,6 t MSha-1 con un promedio de 11,4 t MSha-1. Millot (1969) caracterizó la distribución estacional de una gran colección de *P. dilatatum* utilizando la relación entre la producción primaveral y estival (IE), mostrando que la especie presenta un nivel importante de variabilidad para este parámetro. La utilización de genotipos más estivales resultaría ventajosa en mezclas con especies de invierno ya que no serían tan competitivos en los meses de máxima producción primaveral. Por lo tanto, esta especie presenta diversas ventajas y posibilidades para ser incluida en las mezclas forrajeras, aun cuando queden todavía por resolver varios problemas en cuanto a su utilización.

3.3.3 Estado actual del uso y venta de semillas de *Paspalum dilatatum*

La comercialización de semilla de *Paspalum dilatatum* común como especie forrajera ha aumentado considerablemente en la última década. La importación de semilla proviene exclusivamente de Australia, y está registrada como Cultivar Sureño. Estas semillas se cosechan en otoño en Australia y se importan, por lo que, en muchas siembras de mezclas de gramíneas y leguminosas invernales en otoño, el *P. dilatatum* no logra implantarse ya que presenta dormición. En la Figura 1 se observa la información de uso de semilla de *Paspalum dilatatum* en el país de los últimos años, extraída del Instituto Nacional de Semillas (INASE, 2023), a través de marcado de opción “Estimación de uso” de *Paspalum dilatatum*.

Figura 1

Estimación del uso de semilla nacional de Paspalum dilatatum. Período 2009-2022



Nota. La información no cuenta con datos de reserva de semilla por parte de productores, por lo que el uso nacional de semilla es equivalente al comercio local de semilla de *Paspalum dilatatum*. Elaborado a partir de INASE (2023).

3.3.4 Desafíos para la inclusión del *Paspalum dilatatum*

Las limitaciones para la adopción de esta especie las definió Bennett (1944): baja producción de semilla y susceptibilidad a *Claviceps paspali*. Pizarro (2002) también: escaso conocimiento del potencial forrajero, falta de continuidad en la investigación sobre su manejo y falta de producción estable de semilla. Los problemas de *Paspalum dilatatum*, o las limitantes para su adopción, no son sólo de esta especie, sino que las comparte con otras gramíneas estivales de la Tribu Panicoideae (Fahey et al., 1997). Además de que son problemas propios de especies

silvestres o semi domesticadas. Se requiere entonces desarrollar tecnologías que permitan superar una serie de dificultades para lograr su adopción.

En las especies estivales el desarrollo vegetativo y reproductivo tiene lugar simultáneamente, lo que dificulta la mecanización de la cosecha debido a la complejidad de determinar un momento óptimo de cosecha de semillas y la inevitable presencia de grandes cantidades de follaje verde durante la misma (Loch & Ferguson, 1999). En regiones del mundo en que se comercializa semilla de gramíneas estivales, se plantea un desafío a los productores de estas semillas, que deben decidir empíricamente el mejor manejo para obtener altos rendimientos de semillas de calidad (Loch & Ferguson, 1999). La dinámica de los procesos de macollaje y floración en gramíneas perennes estivales es diferente a la de gramíneas invernales y no se encuentra actualmente bien caracterizada (Ott & Hartnett, 2011). Sin embargo, González Barrios et al. (2016) caracterizaron el ciclo reproductivo para varios genotipos de *Paspalum dilatatum*, y lograron determinar un momento aproximado de máximo momento de panojas listas para ser cosechadas. Encontraron altos valores de heredabilidad para las variables asociadas al número de días hasta la aparición de determinado número de panojas, por lo que el componente genético tiene una fuerte incidencia en la determinación del momento de emisión de panojas, independientemente de las condiciones ambientales. De acuerdo con las curvas de floración obtenidas en ese ensayo, el momento de máxima presencia de panojas en estado de madurez adecuado para la cosecha se produjo a mediados del mes de diciembre, aproximadamente de dos a tres semanas luego de la aparición de las primeras tres panojas de cada planta, dependiendo del genotipo considerado. Por tanto, este trabajo aporta un conocimiento relevante en cuanto a la producción de semilla para esta especie. Otro aspecto a considerar durante la producción de semilla, es el manejo de las fases vegetativa y reproductiva, según el destino productivo de la planta (Campbell, 1999). Las especies C4 en general se caracterizan por presentar bajas relaciones lámina: tallo respecto a especies de origen templado (Skerman & Riveros, 1992). En estas especies cosechar un forraje con alto porcentaje de hojas es de significativa importancia como forma de mejorar la calidad de la dieta. Si bien se considera que esta variable depende muy fuertemente del manejo y de la frecuencia de defoliación, Scheffer-Basso et al. (2007), trabajando bajo un manejo frecuente e intenso con *P. plurinerve*, determinó que esto no evitó que floreciera.

En estas especies generalmente se cosecha una proporción muy baja del volumen de semilla potencialmente producido por el cultivo. Es usual y esperable que las semillas llenas y maduras caigan de la panoja por gravedad luego de la abscisión. Las semillas suelen ser de reducido tamaño, maduración asincrónica y generalmente se desprenden poco tiempo después de la madurez (Burson et al., 1978). *Paspalum dilatatum* Poir. produce abundantes semillas, pero la maduración ocurre desde arriba hacia abajo en la panoja, que se desgrana tan pronto madura, lo que hace que sea una especie de cosecha compleja (Skerman & Riveros, 1992).

Cuña et al. (2012) compararon el desarrollo fenológico de la panoja, la curva de caída y la calidad de la semilla de *Paspalum dilatatum* Poir. cultivar Estanzuela “tipo Chirú” y de *Paspalum flavescens*, y encontraron que existen diferencias importantes entre estos materiales, que deben considerarse para optimizar la cosecha de semilla. En ambas especies el máximo desgrane ocurrió en momentos similares desde emergencia de la panoja. Estos resultados registran la caída de semillas entre 10 y 12 días post-antesis, a diferencia de lo reportado por Burson et al. (1978), que determinaron que la abscisión de la raquilla de las espiguillas se daba 18 días post-antesis. Las inflorescencias más tempranas tienen mayor número de semillas liberadas que las emergencias tardías. La proporción de semillas llenas retenidas en la panoja resultó baja en Chirú, mientras que *P. flavescens* mostró una alta proporción de semillas llenas retenidas, cuando las panojas estaban protegidas. Cuando la panoja no estaba protegida, fue baja para ambos genotipos. Esto indica que en *P. flavescens*, aún después de formada la capa de abscisión, las semillas pueden permanecer en la panoja, hasta ser desprendidas mecánicamente. Hubo una relación entre los picos de caída de *P. flavescens* con períodos de vientos intensos (Cuña et al., 2012). La viabilidad de las semillas llenas retenidas por la panoja resultó muy alta, 97% y 95%, así como la germinación de las mismas, 85 y 82% para Chirú y *P. flavescens*, respectivamente. Las semillas llenas desprendidas fueron más pesadas que las retenidas en ambos materiales. Períodos de deficiencia hídrica influyen en el número y en el tamaño de las semillas llenas (García, 1971). Se sugiere que no sólo el tiempo en días o el tiempo térmico determinarán cuándo habrá mayor liberación de semillas, sino que otros factores ambientales pueden modificar este momento, tales como eventos de déficit hídrico, variaciones en la humedad relativa, y presencia de estímulos mecánicos como viento o lluvia. Estos resultados son importantes ya que contribuyen a definir el momento de cosecha óptimo para la especie.

La calidad de la semilla está explicada por el número de semillas viables/gramo. Las semillas pueden ser llenas, vanas/vacías, o semillas infectadas por *Claviceps paspali*. En *P. dilatatum* “común”, la presencia de semillas vanas se asocia a la reproducción apomíctica apóspórica, ya que son muchos los sacos embrionarios compitiendo por el mismo espacio dentro del ovario, y muchas veces ninguno puede prosperar. La infección fungosa de *Claviceps paspali* Stev. & Hall (“cornezuelo”, “ergot” en inglés), invade los ovarios fértiles no fecundados. Dicha enfermedad, aparece primeramente como una exudación oscura y pegajosa de las espiguillas (por esto su nombre “Pasto miel”), la cual contiene muchas esporas diminutas que propagan la enfermedad a las inflorescencias sanas; en esta etapa se origina, en las espiguillas infectadas, la estructura denominada esclerocio, que reemplaza ovarios. Dicho esclerocio en otoño madura y cae al suelo en donde permanece en estado latente hasta la primavera siguiente (Skerman & Riveros, 1992). *Claviceps paspali* Stev. & Hall es difundido fundamentalmente por insectos, pero también por el viento (D'Esposito & Lopez, 2001). El comportamiento más

probable es que se obtenga en la primera cosecha a mediados de diciembre semillas de buena calidad, y una segunda cosecha a fines de enero, con una calidad por lo menos aceptable, pero inferior a la primera, ya que el ataque del hongo ocurre principalmente en la segunda cosecha (Coll, 1991). Por lo tanto, obtener materiales que logren mayor escape a esta enfermedad es de gran importancia para la producción de semillas de calidad.

La mayoría de las especies del grupo *Dilatata* se caracterizan por tener dormición. La International Seed Testing Association (ISTA, 2010) establece las condiciones óptimas para la germinación de *Paspalum dilatatum*: alternancia de temperaturas (20/35 °C), luz y presencia de nitrato en la solución. Para otras especies de *Paspalum* se han propuesto tratamientos similares. El más reportado ha sido la escarificación ácida o mecánica debido a que estos tratamientos debilitan las cubiertas de la semilla, en particular la lema y la pálea coriácea que envuelven al cariopse y pueden inhibir la germinación (West & Marousky, 1989). Existen evidencias sobre diferencias en la dormición entre las diferentes especies del grupo (Tischler & Burson, 1999), pero las mismas parecen no coincidir todos los años, por tanto, es probable que el momento de cosecha sea relevante. Glison (2013) trabajando con varios genotipos del grupo reportó variabilidad entre genotipos al evaluar la respuesta germinativa de las semillas. Con un tratamiento de pre-condicionamiento cálido a 20°C resultó en porcentajes de germinación altos. Este tratamiento puede ser usado para expresar el potencial máximo de germinación de diversas especies del grupo, ya que resultó igual que la obtenida con las condiciones óptimas. Al comparar momentos de cosecha considerando semillas recién cosechadas, se registraron porcentajes de germinación mayores con las semillas cosechadas en verano con respecto a las semillas de otoño para la mayor parte de los genotipos, lo cual se justificaría por la incidencia del ambiente durante el desarrollo de la semilla, en particular la temperatura, que determina el nivel de dormición inicial (Fenner, 1991). La extracción de la lema resultó en un incremento en la germinación para la mayoría de los genotipos. La exposición de las semillas a un período mayor de imbibición, similar a lo sugerido por Schrauf et al. (1995) tiene respuestas positivas en cuanto a germinación. Existen evidencias de ensayos a campo donde condiciones de inundación promueven la germinación y emergencia de *P. dilatatum* (Cornaglia et al., 2009). El almacenamiento en seco produjo un incremento de la germinación para la mayoría de los genotipos. De acuerdo a la información presentada, la utilización de lotes de semilla de la especie debería de permanecer al menos 6 meses en almacenamiento para asegurar el levantamiento del nivel de dormición presente al momento de cosecha de las mismas. Además, mayores temperaturas durante el almacenamiento aceleran la pérdida de dormición. Chirú y *P. plurinerve* fueron los únicos que presentaron una germinación significativa de semillas enteras recién cosechadas con el tratamiento control. Al comparar el comportamiento germinativo de *P. flavescens* y *P. plurinerve* se encontró una respuesta germinativa diferente, lo cual sugiere que presentan

diferentes niveles de dormición, lo que abre la posibilidad de mejorar esta característica mediante mejoramiento genético.

Para una implantación adecuada se tiene que contar con temperaturas altas pero moderadas. Si las mismas son extremas, la semilla entra en dormición secundaria y no germina. Estas condiciones se dan principalmente en la primavera temprana, pero también pueden ocurrir en otoño temprano, ya que aún hace suficiente calor (Glison et al., 2021). Esta especie es muy susceptible a la sequía en la instalación debido a la morfología particular de las plántulas de gramíneas panicoides, que presentan la característica de tener las raíces secundarias siempre al nivel del suelo (Masters et al., 2004). Sin embargo, Coll (1991) recomienda la siembra en primavera, pero no así la de otoño. Este investigador aportó información de la capacidad germinativa del cultivar Chirú. Una mala implantación, con emergencias que se retrasan y además se dan de forma escalonada, ocurre cuando la siembra en otoño con semilla cosechada el verano anterior. En estos casos, las malezas o los cultivos acompañantes en la mezcla germinan más rápidamente y establecen una fuerte competencia. Germina aproximadamente un 10% en otoño, y el resto germina escalonadamente a partir de mediados de primavera. La competencia de otras especies de la mezcla en la primavera, hace que recién en verano, cuando el tapiz se abre parcialmente, las oportunidades de establecimiento de *Paspalum* mejoren (Coll, 1991). De todas maneras, la implantación de una planta perenne generalmente es lenta, debido a que la planta primero produce las raíces, que son los órganos responsables para que la planta tenga una buena persistencia. Las gramíneas perennes utilizan mucha energía en producir sus raíces, ya que las mismas se preparan para sobrevivir muchos años, especialmente en los años más estresantes para la planta (P. Speranza, comunicación personal, abril, 2022). Mediante mejoramiento genético, y la utilización de los tetraploides sexuales, se puede acelerar la implantación, disminuyendo la cantidad de recursos que se dedican a las raíces, así como también, disminuir la dormición, el desgranado de la semilla y la susceptibilidad al *Claviceps*.

3.4 Estrategias para lograr su adopción

3.4.1 Mejoramiento genético

Los trabajos de prospección y mejoramiento que se intentaron en la década del 60 y 70, llevados a cabo por Millot et al. (1969), estuvieron centrados en los apomícticos del grupo. Las razones eran que los apomícticos del grupo son los más productivos y tienen muchas características agronómicas deseables. Las especies apomícticas, como todas las especies clonales, son el resultado de muchos miles de años de acumulación de mutaciones favorables para la adaptación, por lo que el genotipo más competitivo está presente en toda el área de distribución, y con mayor cantidad de características deseables (Hojsgaard & Hörandl, 2015). Además, un sistema genético como la apomixis permite tener un híbrido fijo heterocigoto que

mantiene la heterosis (Barcaccia & Albertini, 2013). Sin embargo, estas especies apomícticas, a pesar de ser las más productivas, tienen importantes dificultades para su utilización, principalmente la producción de semilla. Se realizaron cruzamientos entre el pentaploide apomíctico del grupo y tetraploides sexuales (Bennett et al., 1969; Burson, 1991, 1995; Burton & Hanna, 1992; Vaio et al., 2007), pero no se obtuvieron resultados favorables. Estos cruzamientos presentan dificultad ya que se tiene una cruzabilidad muy baja, y muchos de los híbridos que se obtienen resultan estériles o inapropiados y ninguno es mejor que el “común” en producción de semilla, tolerancia a *Claviceps*, y producción de Materia Seca. Otra estrategia de mejoramiento fue propuesta por Burson (1983), en donde intentó resintetizar el pentaploide mediante cruzar un hexaploide apomíctico IIIJXX, con un tetraploide sexual IIIJ, sin obtener un pentaploide mejor. A pesar de estos esfuerzos realizados en Uruguay, Argentina (Asociación Argentina de Producción Animal, 2003; Schrauf, 2003), sur de Estados Unidos (Burson et al., 2009), además de otros enfoques como generar mutaciones a través de radiación (Bashaw & Hoff, 1962; Burton & Jackson, 1962) o variación somaclonal y fusión de protoplastos (Akashi & Adachi, 1992; Burson & Tischler, 1993; Davies & Cohen, 1992), no se ha logrado superar las barreras antes mencionadas para su utilización. Un nuevo enfoque se ha venido realizando, priorizando no en el pentaploide, sino en los tetraploides sexuales del grupo, y buscando, ya no sólo productividad, sino caracteres de domesticación.

3.4.2 Domesticación

La domesticación en las plantas es el proceso por el cual ciertas características que les permiten adaptarse a condiciones ambientales modificadas por el ser humano se heredan a la progenie. Muchos de los cultivos actuales son el resultado de este proceso llevado a cabo mediante selección artificial, pero también selección natural. En los cultivos domesticados el conjunto de caracteres asociados al síndrome de domesticación se desarrolló en un período extendido de tiempo. Aproximadamente 500 especies de plantas se han intentado domesticar en un proceso que abarca diez milenios (Gepts, 2004). Ejemplos de características asociadas al síndrome de domesticación son semillas de mayor tamaño, retención en la planta madre, ciclos de vida más cortos, mayor velocidad de crecimiento, y que presenten baja o nula dormición (Gepts, 2004). Muchas de estas características son recesivas y con carácter deletéreo en la naturaleza. En consecuencia, los cultivos domesticados no son competitivos en ambientes naturales, por lo que necesitan del ser humano para su supervivencia, y a su vez el ser humano es dependiente del alimento producido por los cultivos, en una relación de mutualismo (Gepts, 2004). Muchas plantas presentan sobredomesticación, como el caso del maíz, donde la planta ya no puede propagarse por sí misma, sino que requiere de la intervención humana. En especies forrajeras, debido a que el objetivo de selección durante todo ese tiempo no fue el grano/semilla, sino que fue la biomasa aérea, trae

como consecuencia que muchas especies forrajeras perennes presenten un grado de domesticación incipiente con problemas en la propagación (Gepts, 2006; Hacker, 1999). En la actualidad, estos procesos de domesticación se pueden acelerar mediante técnicas clásicas de mejoramiento genético. Entendido esto, los tetraploides sexuales constituyen un gran acervo genético para apoyar la domesticación de esta especie. Se cuenta con el germoplasma de 5 especies emparentadas, con posibilidad de realizar cruzamientos entre ellas, para poder combinar lo mejor de cada una, y así obtener un nuevo cultígeno adaptado a diversas situaciones productivas.

3.4.3 Tetraploides sexuales del grupo Dilatata

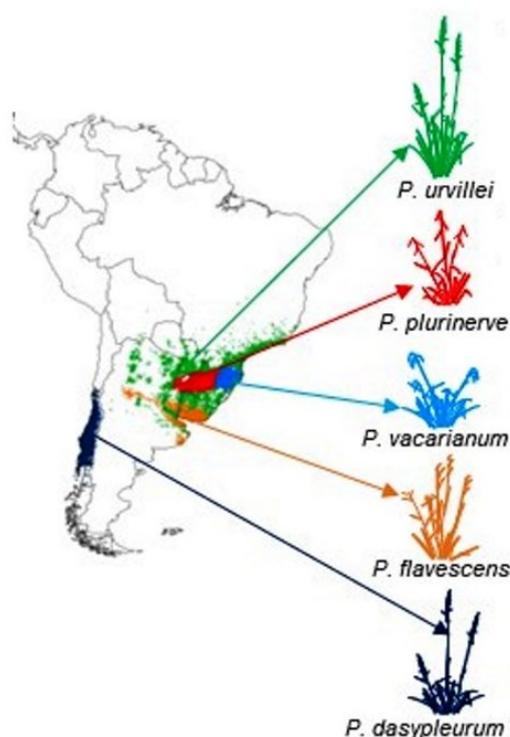
Bashaw y Holt (1958) descubrieron la existencia de entidades relacionadas al pentaploide, que tenían reproducción sexual. Estos tetraploides, individualmente, tienen una alta fertilidad, meiosis regular, son aloploidos y comparten la misma fórmula genómica $2n = 4x = 40 \text{ IIJJ}$ (Bashaw & Forbes, 1958; Burson, 1991; Caponio & Quarin, 1990; Vaio et al., 2007), y tienen herencia disómica (Speranza, 2009; Speranza & Malosseti, 2007). Con respecto a la reproducción de los tetraploides, la caracterización molecular de los mismos mostró que son altamente autógamos, ya que para todos los loci estudiados había homocigocis (Speranza, 2009). Además, los 5 tienen anteras amarillas y estigmas más cortos, lo que constituye una evidencia morfológica de autogamia (Campbell et al., 1983; Frankel & Galun, 1977). Speranza (2009) propuso que existen diferencias entre las especies tetraploides, acentuadas por una distribución geográfica alopátrica, es decir que no comparten la misma área geográfica, por tanto, el flujo génico entre ellas estuvo interrumpido por un gran período de tiempo, lo que llevó a una diferenciación morfológica y fisiológica. Recientemente, investigadores de la Facultad de Agronomía trabajando con los tetraploides del grupo Dilatata, integraron modelos de distribución de especies con ensayos de germinación de semillas, con el fin de determinar si las diferencias en la germinación de estas especies, explican el patrón biogeográfico de distribución (Glison et al., 2023). Se realizaron regresiones lineales entre dormición de semilla y variables ambientales, como temperatura y precipitación de cada lugar. Los resultados a los que llegaron confirman que los tetraploides del grupo tienen distribuciones restringidas con requerimientos diferentes para su germinación, y son alopátricas, por tanto, no crecen solapadas, a excepción de *P. urvillei*, que tiene una distribución mucho más amplia. Los trabajos de Vaio et al. (2019) demuestran que efectivamente, a pesar de las diferencias dentro del grupo, todas las especies están muy cercanamente emparentadas, y tienen un ancestro en común. Es sabido que después de un evento de poliploidía, con el tiempo se regresa al estado diploide perdiendo la redundancia genética, proceso llamado como diploidización. Utilizando los loci 35S y 5S del ADNr, y del ADN cloroplástico, estudiaron el número, tamaño y lugar de estos sitios, en las distintas especies. Los resultados mostraron que existen diferencias para los loci antes

mencionados entre los tetraploides del grupo Dilatata. Se sugiere, por tanto, que, aunque los tetraploides tienen un donante similar, en cada uno el proceso de diploidización se dio de manera independiente, lo que generó diferencias a distintos niveles. Sin embargo, a pesar de las diferencias, presentan fórmulas genómicas equivalentes, con homología cromosómica, y por tanto, estos tetraploides sexuales pueden ser hibridados artificialmente buscando combinar lo mejor de cada especie.

Al comienzo los esfuerzos estaban dirigidos hacia la especie apomítica del grupo. Recién Savidan (1987) realizó estudios agronómicos en estas especies, ya que las mismas constituyen un gran acervo genético para el desarrollo de forrajeras estivales. Luego se continuó con la investigación en estas especies. En estudios más recientes, en *P. urvillei* (Ferreira et al., 2020; Sawasato et al., 2008) y en *P. flavescens* (Sandro et al., 2019) se constató el gran potencial que tienen. Las mismas no presentan las limitantes del *P. dilatatum* común, ya que tienen buena producción de semillas debido a la mayor fertilidad, y baja infección por *Claviceps paspali*, debido a que la flor se autofecunda antes de que pueda llegar la espora del hongo al ovario (Schrauf et al., 2003). Se conoce que las especies sexuales del grupo suelen presentar mayor proporción de semillas llenas (Tischler & Burson, 1999). Las caracterizaciones agronómicas de los tetraploides sexuales estuvieron enfocadas en *P. flavescens* (Sandro, 2014; Venuto et al., 2003) y en *P. plurinerve* (Baréa et al., 2007; Da Costa & Scheffer-Basso, 2003a) probablemente por considerarse los más promisorios, ya que ambas especies son morfológicamente parecidas al “Común”, y además tienen un rendimiento similar (Quintans, 2013; Saldanha et al., 2017). Estas especies son aceptables para su uso en cuanto a producción, ciclo, calidad de forraje, resistencia a *Claviceps*, y buena producción de semilla. Además, difieren entre sí en cuanto al largo del ciclo, fechas de floración y dormición de semilla. *P. plurinerve* muestra una muy baja dormición, y *P. flavescens* exhibe una adaptación local con alta producción de forraje (Glison, 2013; González Barrios et al., 2016). Por lo que realizar hibridaciones interespecíficas entre estas dos especies, puede resultar en un nuevo material segregante, con las características deseables de ambos progenitores.

Figura 2

Áreas de distribución de los 5 tetraploides sexuales del grupo



Nota. Tomado de Glison (2023).

Paspalum flavescens (Roseng., B.R. Arrill. & Izag.) Speranza & G.H Rua.

Su distribución geográfica ocurre en el sur de Uruguay (departamentos de Canelones, Colonia, Flores, Lavalleja, Maldonado, Montevideo, Rocha y San José) y provincias de Buenos Aires y Córdoba (Rosso et al., 2022). Con respecto a su reproducción, la caracterización molecular mostró que es altamente autógamo (Speranza, 2009), y la variabilidad genética se encontró repartida por igual tanto entre como dentro de las poblaciones, sin una estructura geográfica determinada. La caracterización primaria de una colección amplia de la especie mostró grandes niveles de variabilidad para caracteres morfológicos de interés agronómico (Sandro, 2014). Esta especie se diferencia de *Paspalum dilatatum* var. *dilatatum* por tener anteras amarillas, tener racimos más rectos, y de espiguilla más esférica (Rosso et al., 2022). Presenta un buen potencial forrajero y su pico de producción de forraje es más primaveral que el “común” (Milot, 1969) Este autor obtuvo producciones de entre 9 y 11 t Msha con un promedio de 9,8 tMSha en su segundo año de vida.

Paspalum plurinerve Quarin, Valls & V.C. Rosso. (Antes *Paspalum dilatatum* biotipo “Virasoro”).

Paspalum plurinerve fue reconocido y descrito por primera vez en la localidad de Gobernador Virasoro en Argentina por Caponio y Quarin (1987). Su distribución geográfica va desde el sur de Brasil, en regiones al oeste del estado de Río Grande del Sur, y áreas adyacentes de la provincia de Corrientes, Argentina. Prefiere suelos fértiles y está bien adaptado a regiones antrópicas. Esta especie se diferencia de *P. flavescens* en que tiene espiguillas más grandes y además son sedosas y pilosas, con las glumas superiores de 9 a 13 nervios (de ahí su etimología), y sus racimos son colgantes (Rosso et al., 2022). Es sexual con un sistema reproductivo fuertemente autógeno (Hickenbick & Flores, 1992; Speranza, 2009). Ha sido objeto de estudio de varios trabajos que mostraron gran variabilidad y potencial para la producción de forraje (Baréa et al., 2007; Da Costa & Scheffer-Basso 2003a, 2003b), y muestra una excelente producción y germinación de semillas (Baréa et al., 2007; Souza-Chies & Cavalli-Molina, 1995). Esta especie presenta un nivel de dormición de las semillas menor al de *flavescens* y otras especies del grupo (Glison, 2013).

Paspalum urvillei Steud.

Se distribuye en el centro y norte de Argentina, centro y sur de Bolivia, centro y sur de Brasil, este de Paraguay y Uruguay. Se comporta como subespontánea en otras zonas templadas (Speranza, 2009), puede incluso estar presente en zonas perturbadas y ser maleza (Vélez-Gavilán & Thompson, 2018). Es la especie con la mayor distribución geográfica dentro del grupo Dilatata junto con la pentaploide (Glison et al., 2023). Se reconoce fácilmente por tener inflorescencias piramidales con varios racimos erectos, pequeñas espiguillas y anteras amarillas (Rosso et al., 2022). Además de que sus espiguillas y semillas son más pequeñas que las de los otros taxa, se diferencia claramente por el tamaño general de la planta el cual es mayor (Barreto, 1974). Estudios de caracterización molecular y morfológica de la especie han sido realizados en la zona de Rio Grande del Sur en Brasil (Sawasato et al., 2008; Scheffer-Basso et al., 2002) y también en Uruguay. En el análisis molecular realizado por Speranza (2009), esta especie fue la más variable para 13 de los 15 loci bajo estudio. También mostró heterocigosis mayores a las esperadas para una especie autógena lo que sugiere que presenta un cierto porcentaje de fecundación cruzada. *P. urvillei* es una planta apetecible como forrajera durante su período vegetativo, mientras que en su etapa reproductiva disminuye la relación hoja-tallo reduciendo su calidad (Scheffer-Basso et al., 2002). Se destaca por su resistencia a la infección por *Claviceps paspali* (Madia & Schrauf, 1999). Caponio y Quarin (1990) generaron variabilidad a partir de él, la que posteriormente fue utilizada en el mejoramiento de *P. dilatatum* (Schrauf et al., 2003).

Paspalum dasypleurum Kunze ex Desv.

Paspalum dasypleurum es la especie con la distribución más al sur de América del Sur de las especies del grupo. También ocurre ocasionalmente en Argentina, en la provincia de Neuquén (Zuloaga & Morrone, 2005). Constituye un recurso potencial para el fitomejoramiento ya que podría aportar tolerancia a heladas (Quarin & Caponio, 1995). En este mismo trabajo, los autores estudiaron su citología, comportamiento reproductivo y cruzabilidad con los otros miembros del grupo y determinaron que el cruzamiento e intercambio genético entre ellos es posible. Sin embargo, no se conocen trabajos sobre su caracterización morfológica, ni tampoco sobre su utilización y/o manejo. Es probable que se comporte con cierto porcentaje de fecundación cruzada ya que para un análisis con 15 loci de SSRs, mostró heterocigosis mayor a la esperada para una especie autógena (Speranza, 2009).

Paspalum vacarianum Valls & V.C. Rosso (Antes *Paspalum dilatatum* biotipo “Vacaria”).

Paspalum vacarianum fue descrito morfológica y citológicamente por primera vez en 1968 (Moraes Fernandes et al., 1968). Se distribuye en el sur de Brasil, en la región este de la Meseta Sur (Planalto Meridional), en los estados de Rio Grande do Sul y Santa Catarina (Valls & Pozzobon, 1987). Posee un gran potencial forrajero y es un componente importante en las pasturas naturales (De Patta Pillar et al., 2009). En la zona de origen de las primeras colectas de *P. vacarianum*, la alteración ambiental favorece la penetración de *P. urvillei*, que forma híbridos naturales con ella (Speranza, 2009; Valls y Pozzobon, 1987). A medida que aumenta el grado de perturbación ambiental, los individuos híbridos compiten intensamente por el espacio y se vuelven más frecuentes que los del progenitor *P. vacarianum* (Valls et al., 2009).

3.4.4 Hibridaciones interespecíficas

Existen dos caminos distintos para utilizar los acervos genéticos de los tetraploides sexuales, que permitirían llegar a un cultivo forrajero que supere las limitaciones antes planteadas. Uno es transfiriendo genes individuales entre ellos, como por ejemplo hicieron Schrauf et al. (2003), que lograron transferir mediante retrocruzamientos, características resistentes del *P. urvillei* hacia *P. plurinerve*, generando un material genético útil, el cultivar “Primo”. El otro camino, no explorado aún en *P. dilatatum*, consiste en sintetizar diferentes cultígenos derivados de la combinación de los acervos genéticos de más de una de las especies. De hecho, se sabe que muchos de los cultivos domesticados por la humanidad son una mezcla de muchas especies, y que ningún cultivo descende directamente de una sola especie¹. La hibridación interespecífica, por tanto, ha jugado un papel muy importante en el origen y desarrollo de varios cultivos y sigue siendo una herramienta subutilizada

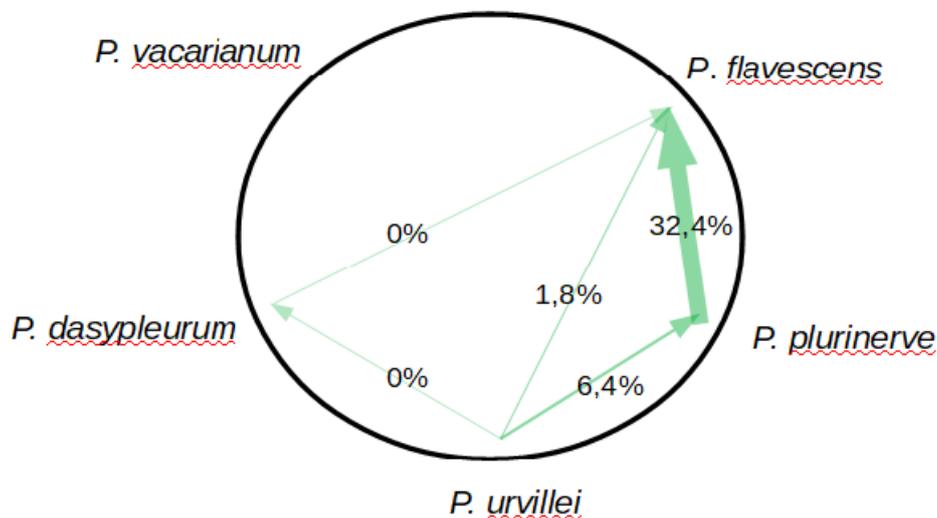
a pesar de su gran potencial (Mason & Batley, 2015). Teniendo en cuenta este conocimiento, además de contar con un amplio acervo genético de muchas especies que se pueden combinar entre sí, se está en condiciones de abordar la segunda estrategia.

Los esfuerzos para establecer los ancestros del *P. dilatatum* “común” han hecho que se acumule una gran cantidad de información citogenética sobre las relaciones entre todas las especies dentro del grupo Dilatata. Por citar unos pocos ejemplos, los trabajos antecedentes de Burson (1979), y Burson y Bennett (1972) establecieron las relaciones filogenéticas entre *P. urvillei* y los tetraploides sexuales de anteras amarillas de forma indirecta, mediante cruzamientos interespecíficos con *P. intermedium* Munro ($2n = 2x = 20$) con fórmula genómica II, y *P. juergensii* Hack., otro diploide sexual ($2n = 2x = 20$) con fórmula genómica JJ. En este mismo trabajo, Burson (1979) realizó un número importante de hibridaciones entre *P. flavescens* y *P. urvillei*, pero no se pudo recuperar ningún híbrido F₁, ya que siempre morían antes de florecer. Caponio y Quarin (1990) realizaron cruzamientos entre *Paspalum flavescens*, *Paspalum urvillei* y *Paspalum plurinerve*, y estudiaron el comportamiento reproductivo y el comportamiento citogenético de estos híbridos interespecíficos. Los resultados a los que llegaron fueron que, primero, estudiando el comportamiento meiótico de cada especie en particular, contaron 19.94 bivalentes para *P. flavescens*, 19.97 bivalentes para *P. plurinerve* y 20 bivalentes para *P. urvillei*. En cuanto a la hibridación interespecífica de *P. flavescens* x *P. plurinerve*, se obtuvieron 38 híbridos de 198 cruzamientos (cruzabilidad: 19%). Mediante estudios citogenéticos, se observó una meiosis regular con 19.94 bivalentes por cada célula madre de polen en metafase I, de 5 híbridos estudiados. La producción de semilla fue de 14,8 a 45,4 % para 3 híbridos analizados. Los híbridos interespecíficos de *P. flavescens* x *P. urvillei*, tuvieron una meiosis regular con un promedio de 19,96 bivalentes por cada célula madre de polen. La producción de semilla fue de 1,4% a 2,1%, significativamente menor. Además, la cruzabilidad fue muy baja, ya que solo se obtuvieron 2 híbridos de 242 cruzamientos, lo que constituye un 0,83% de cruzabilidad, sugiriendo barreras genéticas al cruzamiento. La distribución geográfica de *P. urvillei* y de *P. flavescens* se solapa, es decir que son simpátricas, por lo que permitiría hibridaciones naturales entre estas. Sin embargo, no se han encontrado las características morfológicas “intermedias” de ambos parentales a campo. Los híbridos interespecíficos de *P. plurinerve* x *P. urvillei* tuvieron una meiosis regular 19,88 bivalentes por cada célula madre de polen. La producción de semilla fue de 0,3 a 18,8 %. La cruzabilidad fue de 306 espiguillas que cruzaron, se obtuvieron 247 plantas, de las cuales 59 fueron híbridos, identificados por características morfológicas. En la generación F₂ producto de la retrocruza con cada parental, se observó que la producción de semilla fue mayor a la generación F₁. A su vez, en otro trabajo, los autores Quarin y Caponio (1995) realizaron híbridos de *Paspalum dasyleurum* x *P. urvillei*, y *P. dasyleurum* x *P. flavescens*. Los híbridos interespecíficos de *P. dasyleurum* x *P.*

flavescens se consiguieron con una cruzabilidad menor al 1% (de 253 cruzamientos, se obtuvieron 34 plantas, y solo 2 fueron considerados híbridos), por lo que se sugieren las mismas barreras genéticas al cruzamiento que en *P. flavescens* x *P. urvillei*, además de que la distribución natural de estas especies es también una barrera al cruzamiento, ya que las mismas son alopátricas. El comportamiento meiótico fue regular, contabilizando un promedio de 19,93/19,96 bivalentes por PMC para cada híbrido, y ninguno de los dos híbridos produjo semilla. Los híbridos de *P. dasypleurum* x *P. urvillei* se obtuvieron emasculando 102 espiguillas de *P. dasypleurum*, y espolvoreando con polen de *P. urvillei*, resultando en 55 plantas, todas ellas híbridas, con una cruzabilidad 53,9% (la identificación de los híbridos se hizo por características morfológicas, en este caso, por el número de espigas por panoja, y el largo de la primera espiga). El comportamiento meiótico fue 19,46/19,64/19,87 promedio para distintas líneas de F₁ y ninguno de los híbridos produjo semilla. Estos estudios constituyen un antecedente directo del trabajo aquí presentado.

Figura 3

Fertilidad de los distintos híbridos interespecíficos del grupo *Dilatata* reportados hasta el momento



Nota. Los números en la figura significan fertilidad, reflejada por la producción de semilla de cada híbrido interespecífico. Elaborado a partir de Caponio y Quarin (1990) y Quarin y Caponio (1995).

3.5 Antecedentes a este trabajo

Sandro (2020) obtuvo una población de líneas puras segregantes, partiendo de un cruzamiento entre *Paspalum flavescens* (madre) x *Paspalum plurinerve* (padre), y mediante el método de descendencia de una sola semilla, para evitar la selección natural, y acelerando el proceso en cámara de contraestación, se llegó a una población F₆. Se reportaron problemas de fertilidad en las generaciones tempranas, ya que algunas de las líneas segregantes no producían semilla viable, por lo que no todas pudieron dejar descendencia. Esta población se desarrolló para estudiar la potencialidad de la hibridación interespecífica, así como para poder realizar un mapa de ligamiento que permita identificar regiones del genoma asociadas a características de interés para apoyar el mejoramiento y la domesticación de esta especie. Se realizó el genotipado de muchos individuos de las líneas obtenidas, además del de los progenitores, y se obtuvieron miles de marcadores moleculares distribuidos a lo largo de todo el genoma. Con estos marcadores y con el fenotipado de la colección, se identificaron QTLs mediante pruebas estadísticas. Se comparan los individuos que tienen alelos de *P. flavescens* contra los individuos que tienen alelos de *P. plurinerve*, y se observa si los marcadores de uno u otro afectan el fenotipo para una característica deseable de domesticación. Además de esto, se realizó el fenotipado de la progenie y de los padres para la característica días a floración, objetivo de mejoramiento importante ya que determina la calidad de la producción de MS. Otro trabajo en esta misma población fue realizado por Dogliotti (2021). En dicho trabajo, se caracterizó el modo de herencia y ligamiento en las líneas F₆. Mediante la utilización de marcadores tipo microsatélites, se obtuvo información del genoma, y permitió detectar ligamiento entre alguno de estos. Los marcadores presentaron herencia disómica, coincidente a lo reportado por Speranza y Malosetti (2007) para este cruzamiento, y se reportó que, de 15 marcadores, 10 mostraron distorsión de la segregación de leve a alta, con el alelo materno (*P. flavescens*) más frecuente que el paterno (*P. plurinerve*), fenómeno conocido como desviación de la proporción mendeliana esperada, o distorsión en la segregación (Sandler & Golic, 1985; Sandler & Novitski, 1957). Este fenómeno puede deberse a causas genéticas o ambientales, y se ha observado frecuentemente en poblaciones segregantes obtenidas por el método DUS, como lo es la población de estos trabajos en *Paspalum* (Xu et al., 1997). La distorsión en la segregación puede dificultar la correcta estimación de las distancias genéticas, al momento de realizar los mapas de ligamiento. Además, el sesgo hacia los alelos de *P. flavescens* y la consecuente pérdida de alelos de *P. plurinerve*, puede llevar a que los objetivos de la hibridación interespecífica no se cumplan, ya que, por ejemplo, la baja dormición de semilla de *P. plurinerve* podría no estar incluida en la progenie. Tanto la infertilidad en algunas líneas tempranas de la población segregante, como la distorsión en la segregación, pueden tener su origen en irregularidades meióticas. En el trabajo que aquí se

presenta, mediante observación a microscopio de la meiosis, pretende poner a prueba esta hipótesis.

En la misma línea de investigación que los trabajos predecesores, Monteverde et al. (2022) estudiaron el potencial de combinar germoplasma de distintos tetraploides sexuales. Utilizando la misma población, evaluaron a los progenitores, al híbrido F_1 y a las F_3 para muchas características de interés. En los híbridos F_1 , se pudo observar heterosis para Materia Seca, pero no para características morfológicas, ya que no es en estas características en donde pueden observarse (Kaeppler, 2012). Por otro lado, la heterosis y la segregación transgresiva pueden verse como dos lados del mismo fenómeno (Mackay et al., 2021), en consecuencia, si se observa heterosis en los híbridos, se espera segregación transgresiva en generaciones avanzadas. El único efecto génico que se pierde en estos genotipos transgresivos es el de sobredominancia. Se observó, en efecto, una gran variabilidad para muchas características, y en muchos casos, promedios mejores que el mejor de los padres y que el híbrido F_1 . Estas características fueron: Materia Seca, número de macollos reproductivos, número de espigas por panoja, peso de panoja y largo de hoja. Por tanto, la potencialidad de trabajar con estas especies de reproducción sexual queda demostrada, ya que, además de poder acumular alelos deseables de forma aditiva, la homocigosis permite mantener a los genotipos promisorios, y los mismos se pueden multiplicar por semilla indefinidamente. En otro trabajo recientemente realizado por Moura (2022), se estudió también el potencial de hibridar estas dos especies tetraploides del grupo, mediante el análisis de segregantes transgresivos, es decir mediante la comparación de la progenie con sus progenitores, pero en líneas más avanzadas, concretamente en la F_6 . Como ya se previó en el trabajo de Monteverde et al. (2022) en líneas F_3 , se constató la existencia de segregación transgresiva en líneas F_6 para características asociadas a Materia Seca (Peso de hoja), y una gran variabilidad para esta característica en la población. Además de encontrar líneas promisorias, los caracteres estudiados tuvieron una alta heredabilidad, lo que implica una mayor certeza genética al momento de seleccionar un genotipo. También, otros autores, encontraron diferencias en el comportamiento germinativo entre distintas líneas F_6 y los progenitores de esta población, con segregación transgresiva para dormición de semilla en algunas de ellas (Cortabarría & Vidal, 2023). Queda demostrado, pues, que la hibridación interespecífica es un método apropiado y satisfactorio para la obtención de futuros cultígenos. El uso de las técnicas y procedimientos de mejoramiento genético de especies autógamias podrían utilizarse en programas que busquen obtener aditivamente las características deseadas, como ser, además de la productividad de Materia Seca, producción de semilla.

3.6 Consideraciones sobre meiosis

Según Sleper y Poehlman (2006), el núcleo de la célula contiene el material genético y participa en la división celular. Existen dos tipos de división del núcleo:

la mitosis y la meiosis. La meiosis, se relaciona con la reproducción sexual de las plantas. La meiosis masculina ocurre cuando la célula madre del polen se divide para formar esporas. Consta de dos divisiones sucesivas, la primera reduccional (meiosis I) y la segunda ecuacional (meiosis II). La meiosis se caracteriza por:

- duplicación longitudinal de cada cromosoma para formar dos cromátidas hermanas idénticas que están unidas a nivel de centrómero (interfase);
- apareamiento (sinapsis) de cromosomas homólogos; es decir, aquellos que poseen loci correspondientes e intercambio de segmentos de las cromátidas, proceso conocido como entrecruzamiento (profase I);
- movimiento de los cromosomas homólogos hacia el ecuador del huso, con las cromátidas aún unidas a nivel del centrómero (metafase I);
- redistribución aleatoria de los cromosomas homólogos al tiempo que los cromosomas apareados se separan y mueven hacia polos opuestos con las cromátidas aún unidas (anafase I);
- formación de nuevos husos en extremos opuestos de la célula al tiempo que las cromátidas unidas se disponen en el ecuador de los nuevos husos (metafase II).
- separación de las cromátidas a nivel de los centrómeros y emigración de las cromátidas a los polos de sus respectivos husos (anafase II); y
- formación de paredes celulares para dar origen a cuatro esporas, cada una con la mitad del número de cromosomas de la célula madre de las esporas progenitora (tétradas/ citocinesis).

Una característica esencial de la meiosis es la reducción del número de cromosomas del número diploide ($2n$) en la célula madre del polen al número haploide (n) en las esporas (o en gametos). La fusión de una célula espermática y una célula huevo en la fecundación hace que se junten dos juegos haploides de cromosomas y restaura en el cigoto el número diploide de cromosomas. La observación de la meiosis permite establecer la fertilidad y la viabilidad de los gametos que va a producir un individuo. Para que un gameto esté balanceado y por lo tanto sea viable y pueda recuperar la dotación cromosómica original al momento de la fecundación, es necesario que las fases de la meiosis ocurran de forma regular. En individuos de la misma especie esto es lo que ocurre generalmente.

Un ejemplo que puede aportar conocimientos al tema de esta tesis, es el trabajo de Gaiero et al. (2017), que, estudiando a *Solanum tuberosum L.* y sus parientes silvestres, remarcaron la importancia de la localización física de los loci en un híbrido interespecífico, ya que la falta de colinealidad puede traer consecuencias en el apareamiento y la recombinación de los cromosomas homólogos y causar problemas en la segregación durante la meiosis. Mediante la construcción de un mapa citogenético de los parientes silvestres de la papa contrastado con el de la papa cultivada, se buscó descubrir translocaciones a gran

escala y/o inversiones, que pueden dificultar la hibridación. Analizando la fase de paquiteno de la profase meiótica I, lograron determinar las diferencias en cuanto a la longitud de las cromátidas de cada cromosoma en las distintas especies, así como la longitud de la heterocromatina también para cada cromosoma en las 2 especies silvestres. Se encontró gran variación en las longitudes de los cromosomas, así como variación en la posición relativa de diferentes marcadores, con una posible explicación por pequeñas inversiones. La ocurrencia de inversiones puede aumentar el arrastre genético en programas de retrocruza. Sin embargo, en este trabajo, a pesar de las variaciones mencionadas, no se encontraron reordenamientos importantes que obstaculicen la recombinación y la introgresión, que pudieran causar arrastre por ligamiento, o segregación errónea de homólogos durante la meiosis en híbridos, por lo que estas especies se pueden cruzar. Fenómenos similares podrían ocurrir en el caso de híbridos interespecíficos del grupo Dilatata. Si bien estas especies están emparentadas, pueden haber tenido diferente evolución en sus genomas, con eventos de rearrreglos distintos entre las especies durante la diploidización, como por ejemplo inversiones y translocaciones, resultando en versiones diferentes de los genomas IIJJ. Por lo tanto, aunque compartan la misma fórmula genómica, pueden diferir en cuanto a la colinealidad de sus loci, con posibles irregularidades en el entrecruzamiento y en la recombinación de los cromosomas del híbrido interespecífico. Una irregularidad en la meiosis puede ser la causa de la esterilidad en líneas tempranas reportada por Sandro (2020) y de la distorsión en la segregación de marcadores reportada por Dogliotti (2021).

En híbridos interespecíficos, como es el caso aquí estudiado, pueden darse irregularidades en distintas etapas de la meiosis, que van a causar problemas de infertilidad. Estas irregularidades son fácilmente observables en microscopio. Lo más esperable en estos híbridos alotetraploides de fórmula genómica $2n = 4x = 40$ es que formen 20 bivalentes en diacinesis (última subfase de la profase I), si el apareamiento de los cromosomas es totalmente normal, y que luego migren a cada polo en anafase de forma balanceada. Este híbrido se comporta como diploide, ya que los cromosomas de cada genoma se presentan de a par, y todos los apareamientos podrían ser perfectos existiendo su par homólogo. Sin embargo, pueden observarse irregularidades. Por ejemplo, en diacinesis, en lugar de formarse 20 bivalentes (cada cromosoma formando un bivalente con su par homólogo) se formen 18 bivalentes y 1 cuadrivalente; o 19 bivalentes y 2 univalentes, además de muchas otras combinaciones posibles. En metafase puede observarse que todos los cromosomas están alineados en la placa ecuatorial, a excepción de un bivalente donde comenzó a migrar antes que el resto, lo que llamaremos adelanto. Durante la siguiente etapa de anafase, pueden observarse arrastres de cromatina o “puentes”, es decir que los cromosomas homólogos, debido a terminaciones tardías de sus quiasmas, no se separan, el cromosoma se estira, y queda descondensado. También, puede ocurrir que algunos bivalentes, o también como univalentes, no logren migrar hacia los polos, porque como ya se dijo, las fibras del huso no lograron unirse al

centrómero, quedando más retrasados que el resto de los cromosomas. Finalmente, durante la formación de díadas o tétradas, además de las microsporas pueden observarse micronúcleos de cromosomas que no segregaron bien. Por lo que la observación de la meiosis permite establecer si la misma tiene consecuencias en la fertilidad de los híbridos.

La distorsión en la segregación reportada por Dogliotti (2021) en líneas F₆ significa que hay un sesgo hacia los alelos maternos (*P. flavescens*). La primera ley de Mendel establece que la segregación de los alelos es aleatoria, es decir, que cada alelo tiene un 50% de posibilidades teóricas de transmitirse a la descendencia. Sin embargo, se ha visto, que hay alelos con más probabilidades de transmitirse, durante la meiosis a la descendencia. Los centrómeros tienen un papel fundamental en la división celular, ya que a él se unen las fibras del huso que llevan los cromosomas hacia los polos. Las regiones centroméricas y pericentroméricas pueden explicar el comportamiento meiótico diferencial de los cromosomas en un híbrido interespecífico. Las secuencias de los centrómeros y de las proteínas asociadas, son diversas entre especies (Melters et al., 2013). Esta divergencia principalmente en el número de copias de dichas secuencias, puede dar como resultado un comportamiento meiótico diferente de los cromosomas de cada genomio, siendo un genoma con mayores posibilidades de transmitirse a la proge, frente al otro genoma que tiende a perderse (Aker et al., 2017). Los centrómeros juegan un papel fundamental cuando los cromosomas no se aparean con su par homólogo y quedan como univalentes. Estos univalentes, según la capacidad que tengan para interactuar con las fibras del huso, serán transportados o no a uno de los polos para dar lugar al núcleo hijo. Por su contraparte, los bivalentes tienen asegurada la transferencia regular desde la placa metafásica a cada uno de los polos, debido a una unión estable de los microtúbulos a los centrómeros. Sin la fuerza contraria de un homólogo en un bivalente, un monovalente no puede estabilizar la unión a las fibras del huso y sus movimientos anafásicos son fortuitos: los monovalentes tienden a oscilar alrededor de la placa metafásica, tiran en la dirección de un polo mediante una unión transitoria, luego se liberan, y tiran hacia el otro polo (Majka et al., 2023). Estos monovalentes permanecen en la placa metafásica, forman micronúcleos, y posteriormente se degradan. También puede ocurrir, sin embargo, que, por varias uniones transitorias consecutivas al mismo polo del huso, terminen en el lugar correcto y se integran al núcleo hijo (Lukaszewski, 2010). En híbridos interespecíficos, la frecuencia de tales uniones transitorias consecutivas y la capacidad de ser incluidos en el núcleo hijo, pueden diferir según el origen parental de los monovalentes. Kopecký et al. (2022) a través del análisis de la meiosis de un híbrido interespecífico, constató que los monovalentes del genoma que tiende a perderse tenían una mayor tasa de eliminación de cromosomas que del genoma que tiende a heredarse. Majka et al. (2023) trabajando con híbridos interespecíficos de *Festuca pratense* x *Lolium multiflorum* (ambos $2n=4x=28$), confirmaron que existen diferencias entre los distintos genomas parentales de un híbrido, en cuanto

a la transmisión de sus cromosomas a la progenie, tanto en la meiosis masculina como femenina. Pudo observarse en la meiosis femenina, donde los cromosomas del genoma dominante son transmitidos al óvulo y los del genoma sumiso a un cuerpo polar. La producción de gametos femeninos tuvo un número promedio de cromosomas parentales de 7,85 para *L. multiflorum* y 5,95 para *F. pratense*, lo que constituye un desvío significativo del 7:7 esperado. En cuanto a la meiosis masculina, se observaron grandes diferencias entre la unión de los univalentes de *F. pratense* o *L. multiflorum* a los microtúbulos del huso. Los resultados indican que los univalentes de *L. multiflorum* se unieron con una frecuencia de 70,4%, mientras que los univalentes de *F. pratense* se unieron con una frecuencia de 19,3%. Por lo tanto, los univalentes de *L. multiflorum* tienden a migrar hacia los polos y los univalentes de *F. pratense* se eliminan en forma de micronúcleos, llevando a que los gametos masculinos tengan un desbalance en cuanto al número de cromosomas de cada parental. Para determinar lo que causa este comportamiento diferencial de los cromosomas durante las divisiones meióticas, se realizaron estudios de secuenciación de la región centromérica y del complejo de cinetocoro (estructuras proteicas donde se anclan los microtúbulos, ubicadas en el centrómero), para los cromosomas de ambas especies. Se encontraron muchos SNPs (Single Nucleotide Polymorfism) no sinónimos (es decir que no están presente en ambas especies) asociados a los genes del cinetocoro. Además, dos genes del cinetocoro, el NDC80 y el NNF1, se expresaron solamente a partir de los alelos de *L. multiflorum*, por lo tanto, la expresión génica de estos genes de *F. pratense* fue silenciada. Esto redujo su unión a los microtúbulos del huso, y provocó un retraso en la placa metafásica, formando micronúcleos, para luego degradarse. Por lo tanto, la meiosis masculina puede contribuir a la herencia no mendeliana de los cromosomas parentales en sucesivas generaciones híbridas. Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos. Fenómenos similares pueden haber ocurrido durante la generación de las líneas puras recombinantes realizado por Sandro (2020). Estos fenómenos pueden ser causantes de la distorsión en la segregación reportada por Dogliotti (2021).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Las plantas utilizadas en este trabajo, líneas F₂ endocriadas, fueron generadas a partir de un cruzamiento interespecífico entre *P. flavescens* x *P. plurinerve*. La obtención de los híbridos y de las F₂ se describen en Speranza y Malosetti (2007). Las semillas estaban almacenadas en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay (Lat 34°50' 13.17"S, Long 56°13' 22.96"O). La germinación se llevó a cabo en el mes de marzo de 2022. Se colocaron 5 grupos de 50 semillas llenas sobre papel de filtro humedecido, dentro de 5 placas plásticas de Petri de 10 cm, y se llevaron a una cámara de ambiente controlado para su germinación. Las condiciones ambientales de dicha cámara fueron de una alternancia diaria de 20°C a la noche y 30°C en el día (12 horas noche/12 horas día). Al germinar, se seleccionaron 20 y se trasplantaron en macetas numeradas dentro del invernáculo de la Cátedra de Fitotecnia de la Facultad de Agronomía. Dentro del invernáculo existe un cerramiento con condiciones ambientales controladas (temperaturas mayores a 20°C y fotoperíodo de 16 horas luz.), que favorecen el crecimiento y la floración.

4.2 Colecta de panojas

Durante los meses de junio, julio, agosto y setiembre del 2022, cuando los ápices meristemáticos pasaban de vegetativos a reproductivos y morfológicamente la planta comenzaba la elongación, se cosecharon las panojas reproductivas en estado de embuche, es decir que aún se encontraban envueltas por la hoja bandera. Fue importante la colecta del material en ese estado fenológico, ya que asegura que la panoja está transitando la microsporogénesis. Si la panoja estaba en anthesis, la observación en el microscopio iba a mostrar el polen ya formado y no las etapas previas de la meiosis, que es lo que se busca analizar en este trabajo. Luego se retiraron las hojas y se fijó cada panoja en un tubo Falcon de 15 ml con una solución 3:1 de alcohol absoluto:ácido acético glacial, durante 24 horas, luego se desechó la solución y se volvió a preparar otra igual, y a los 7 días se volvió a remover dicha solución para fijarse finalmente en alcohol 70% y agua destilada 30% y se conservó en heladera a 4°C hasta su utilización. Cada panoja fue debidamente rotulada con lápiz, indicando el número de planta, fecha y hora de colecta.

Figura 4*Material vegetal*

Nota. (a) Semillas germinadas. (b) Trasplante en 20 macetas. (c) Plantas macolladas previo a estado reproductivo. (d) Panojas fijadas en alcohol 70% en tubos Falcon, almacenadas en heladera hasta su uso.

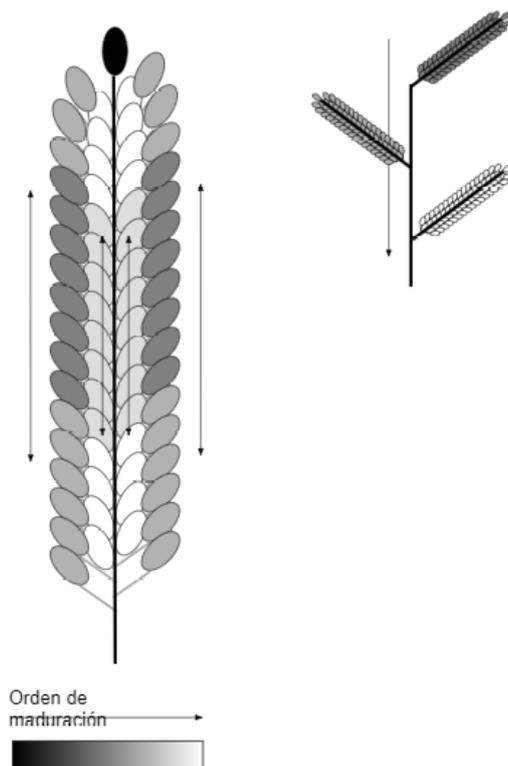
4.3 Preparados

Para la realización de los preparados, se retiró la panoja de la solución y se colocó en una placa de Petri. Observando con una lupa binocular estereoscópica Olympus modelo SZ40, y mediante apreciación visual en base a la coloración de las anteras, se seleccionaron las espiguillas de la panoja que pudieran estar atravesando la meiosis I. Las espiguillas se colocaron en un portaobjetos y se sumergieron en una pequeña gota de ácido acético 45%, y se disecaron bajo lupa extrayéndose las anteras. Se extrajeron las células madre del polen de la antera con la ayuda de una pinza y agujas histológicas, mediante presión, y se colorearon con orceína lacto-propiónica (1:1) al 2%. Las tecas se desecharon. Se homogeneizó y disgregó bien la extracción, y con un cubreobjetos (20x20), haciendo una leve presión, se extendió el material, cuidando de que no queden burbujas de aire en el preparado. En caso de encontrarse la fase buscada, los preparados se aplastaron

utilizando un papel encima del cubreobjetos, y se sellaron con esmalte al alcanzar un grado de tinción adecuado. Posteriormente se almacenaron en freezer a -18°C hasta su observación en el microscopio. En caso de no encontrar la fase deseada, se desecha el preparado, y se continúa su búsqueda siguiendo como criterio el orden de maduración que tiene la panoja (Figura 5).

Figura 5

Maduración de panoja de Paspalum dilatatum



Nota. P. Speranza (comunicación personal, junio, 2022).

4.4 Observación de meiosis en microscopio

Para la observación de la meiosis se utilizaron dos microscopios ópticos. Para la observación diaria de los preparados se utilizó un Olympus CX31, con hasta 40x de aumento, y pudo adaptarse una máquina digital de fotos Infinity1 con programa de obtención de imágenes DinoCapture 2.0, para la toma de fotografías provisionarias para la mejor observación y discusión. Para tomar las microfotografías definitivas que figuran en este trabajo, se utilizó el microscopio de imágenes Zeiss Axioplan 2, con un aumento de 100x con inmersión en aceite.

Se observó un mínimo de 15 Células Madre de Polen (CMP) para cada fase, y se contabilizó y anotó el número de bivalentes, monovalentes y cuadrivalentes en diacinesis, el número de adelantos en metafase, el número de atrasos o puentes de

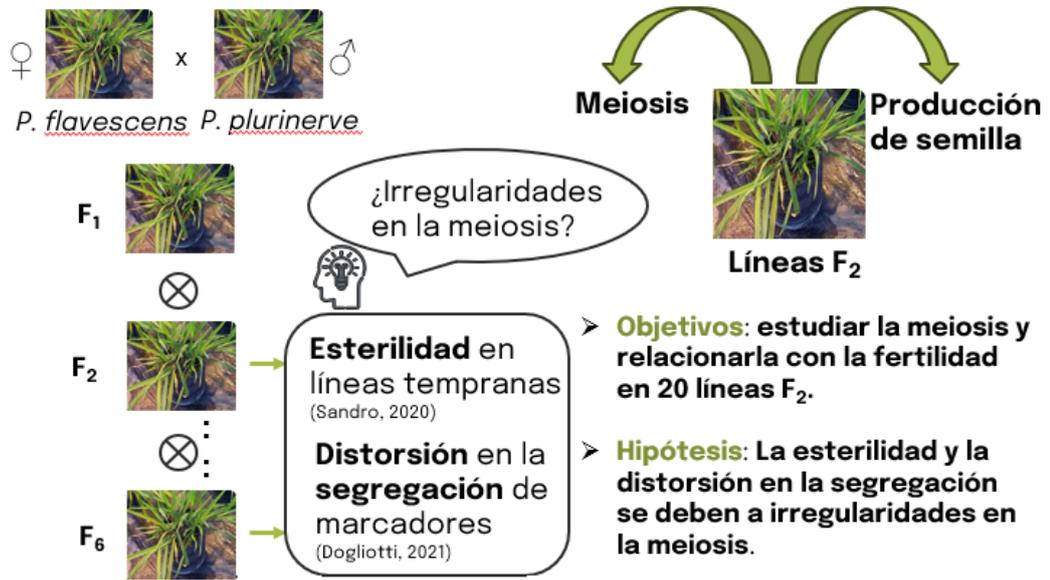
heterocromatina en anafase y la presencia/ ausencia de micronúcleos en díadas/tétradas.

4.5 Producción de semilla

Una vez que la cosecha de panojas se consideró suficiente para el análisis meiótico (3 panojas atravesando las distintas fases de la meiosis I), las plantas siguieron floreciendo y fructificando y se cosecharon manualmente semillas de las 20 líneas. Se realizó un conteo de dos grupos de 50 semillas cada uno, y dentro de cada grupo se separaron las semillas llenas de las vacías, y se estimó un porcentaje de fertilidad. Luego se pesó cada grupo en una balanza de precisión, así como también se pesó el total de las semillas cosechadas de cada planta. Se estimó el peso de mil semillas (PMS) para cada planta sumando los pesos de ambos grupos y multiplicando por 10. Con el peso de mil semillas y el peso total, se obtuvo, el número de semillas totales ($\text{Peso total} \times 1000 / \text{PMS}$), y multiplicado por el porcentaje de semillas llenas, se obtuvo el número de semillas llenas cosechadas por planta. También, se estimó el PMS llenas, mediante el conteo de 2 grupos de 50 semillas llenas cada uno. Finalmente, se obtuvo el dato de germinación de 6 líneas que tenían suficientes semillas como para sacar conclusiones (no se obtuvo este dato para toda la población porque no se contaba con suficiente semilla viable). Para esto, se realizó nuevamente la separación en grupos entre llenas y vacías, y se colocaron las llenas en una cámara de frío, para después pasar a la cámara de germinación durante 10 días, con condiciones de alternancia diaria de 20°C a la noche y 30°C en el día (12 horas noche/12 horas día). Luego de esto se estimó un porcentaje de germinadas sobre el número de viables, mediante conteo de germinadas en distintos momentos. Además, se realizó una evaluación que simulara la prueba de tetrazolio mediante apreciación visual de las semillas llenas, pues la observación de desperfectos en el endosperma o del embrión, hace que la semilla pierda la capacidad germinativa. Las semillas sin desperfectos pero que no germinaron por otros motivos, por ejemplo, dormición, se incluyeron dentro de las viables.

Figura 6

Esquema para mejor comprensión del contexto



Nota. Elaborado a partir de Sandro (2020) y Dogliotti (2021).

5. RESULTADOS

5.1 Comportamiento meiótico

En muchos de los genotipos, se observaron diversas alteraciones, tales como asociaciones cromosómicas distintas a bivalentes en diacinesis, localización espacial de los cromosomas por fuera de la placa ecuatorial en metafase, asimetrías en cuanto a la segregación de los cromosomas en anafase. Un 9,5% de las células estudiadas presentaron irregularidades durante la meiosis en fases tempranas. La línea 11020, durante el momento de cosecha de panojas, no floreció, por lo que no se cuenta con información citogenética de ella.

Analizando detalladamente fase por fase, durante la diacinesis, generalmente se contó con buena visibilización, con los cromosomas todos en un mismo plano. La presencia de un mayor número de bivalentes fue siempre mayor a la presencia de monovalentes o cuadrivalentes (Tabla 1). Los rangos de bivalentes van de 16 a 20 y los cuadrivalentes de 0 a 2. No se observaron univalentes. Los mismos, debido a su pequeño tamaño fueron difíciles de identificar, además de que pueden quedar enmascarados por otros cromosomas. El promedio de bivalentes por célula tuvo rango de valores de 19,07 a 20 (Tabla 1). Lo más frecuente fue contar 20 elementos, o 19 elementos, 18 de ellos bivalentes y 1 cuadrivalente. En muchas de las células estudiadas, pudo constatar la presencia diferencial de bivalentes asociados al nucléolo, pudiendo observarse desde 2 bivalentes hasta 4 bivalentes asociados al nucléolo (Fig. 6).

Tabla 1

Número de elementos observados en diacinesis I, en 15 células madre del polen para líneas F2

Diacinesis I					
Material	Nº de CMP obs.	I	II	IV	promedio II/CMP
I1001	15		16-20	0-2	19,5
I1002	15		18-20	0-1	19,73
I1003	15		20		20
I1004	15		18-20	0-1	19,73
I1005	15		18-20	0-1	19,30
I1006	16		18-20	0-1	19,5
I1007	15		18-20	0-1	19,73
I1008	15		18-20	0-1	19,87
I1009	15		18-20	0-1	19,60
I1010	15		18-20	0-1	19,9
I1011	18		18-20	0-1	19,56
I1012	15		18-20	0-1	19,73
I1013	15		18-20	0-1	19,6
I1014	15		18-20	0-1	19,2
I1015	20		18-20	0-1	19,6
I1016	15		18-20	0-1	19,6
I1017	15		18-20	0-1	19,9
I1018	17		18-20	0-1	19,9
I1019	15		16-20	0-2	19,07
I1020					

Durante la metafase, en la mayoría de las células se observó una metafase normal, con todos los cromosomas alineados en la placa ecuatorial previo a la división reduccional. No obstante, se registraron algunos adelantos, por ejemplo, en las líneas I1002 y I1005, con un máximo de 3 células con adelantos (Tabla 2; Figura 8). En anafase no se observaron irregularidades para la mayoría de las CMP. Sin embargo, se pudieron detectar segregaciones tardías de cromosomas, particularmente en la línea I1005, con 7 atrasos/puentes, y la línea I1019 con 5 atrasos/puentes. (Tabla 2; Figura 8). También se observaron telofases con irregularidades, con puentes de cromatina, pero que van camino a separarse y

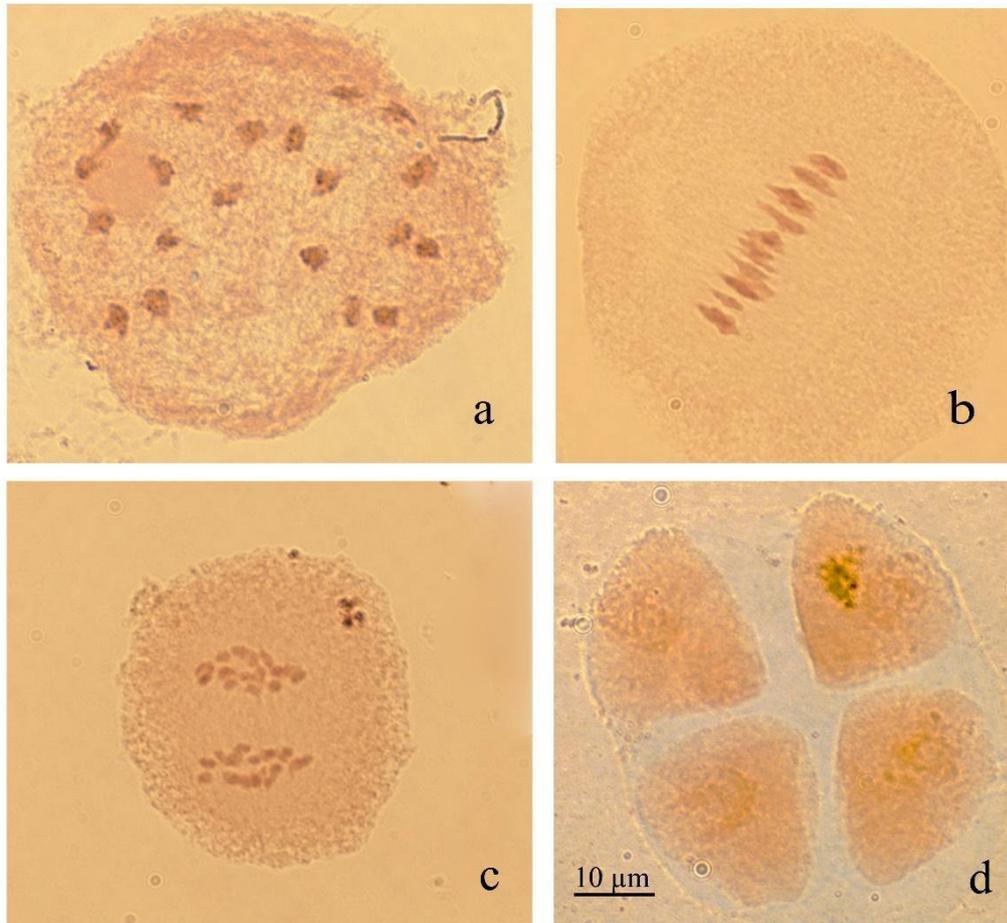
quedar bien distribuidos (Figura 8f). En cuanto a las díadas/tétradas, fue nula la observación de micronúcleos.

Tabla 2

Comportamiento meiótico en metafase I, anafase I y en díadas/tétradas en 15 CMP, para líneas

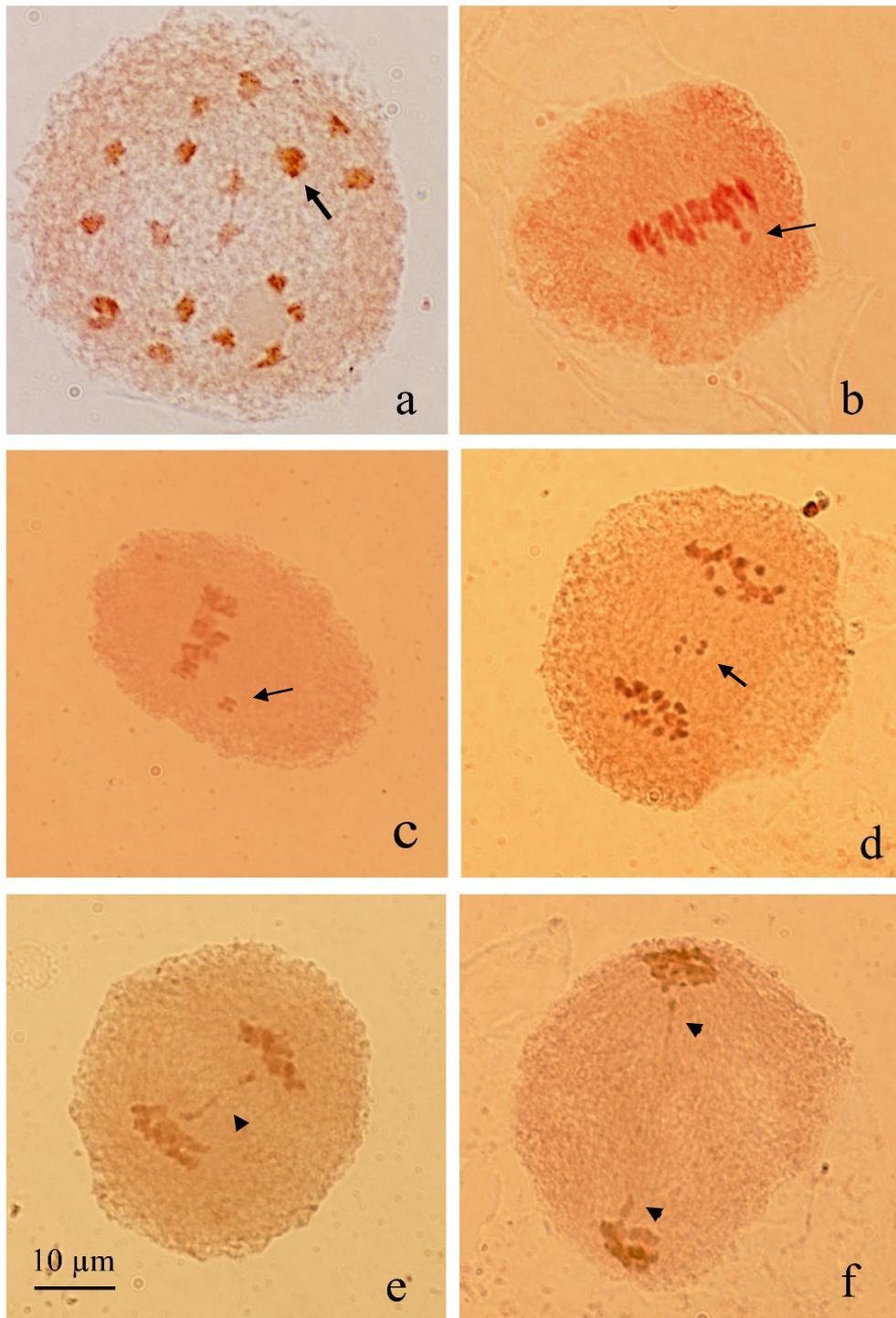
Material	Metafase I		Anafase I		Díadas/ Tétradas	
	Nº de CMP obs.	Nº de Adelantos	Nº de CMP obs.	Nº atrasos/puentes	Nº de CMP obs.	Micron úcleos (Si/No)
I1001	15	2	15	1	15	No
I1002	20	3	15	3	15	No
I1003	15	1	15	0	15	No
I1004	15	0	15	0	15	No
I1005	21	3	17	7	15	No
I1006	15	0	15	0	15	No
I1007	15	0	16	0	15	No
I1008	16	0	15	1	15	No
I1009	15	1	15	0	15	No
I1010	15	0	15	0	15	No
I1011	17	2	23	1	15	No
I1012	17	2	15	0	15	No
I1013	15	0	15	1	15	No
I1014	15	2	15	0	15	No
I1015	15	0	15	0	15	No
I1016	15	0	15	0	15	No
I1017	15	1	15	0	15	No
I1018	15	0	15	0	15	No
I1019	20	2	15	5	15	No
I1020						

Figura 7
Fases de la meiosis regular

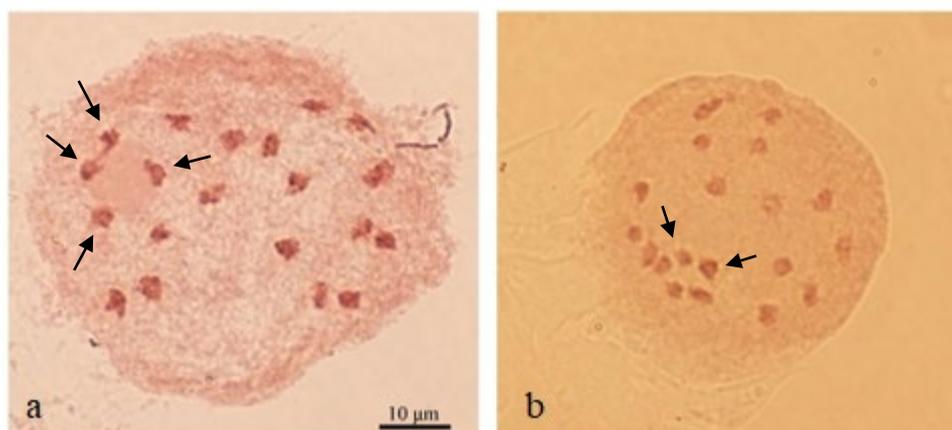


Nota. Células madre del polen de líneas F₂ en distintas fases de la meiosis. (a) Diacinesis con 20 bivalentes. (b) Metafase con los cromosomas alineados en la placa ecuatorial. (c) Anafase con los cromosomas segregando normalmente hacia cada uno de los polos. (d) Tétradas sin micronúcleos.

Figura 8
Fases de la meiosis con irregularidades



Nota. Células madre del polen de líneas F₂ en distintas fases de la meiosis. (a) Diacinesis con 18 II + 1 IV. La flecha indica un IV. (b-c) Metafase con cromosomas adelantados. (d) Anafase con cromosomas segregando tardíamente. (e) Anafase con puente de cromatina. Las puntas de flecha indican los puentes de cromatina. (f) Telofase con puente de cromatina “resolviéndose”.

Figura 9*Diferencias de bivalentes asociados al nucléolo*

Nota. (a) 4 bivalentes asociados al nucléolo. (b) 2 bivalentes asociados al nucléolo.

Otro aspecto a mencionar es que, en muchas de las células observadas, había asincronía o varias fases de la meiosis en la misma antera, por ejemplo, diacinesis y metafases en el mismo preparado; metafase, anafases y telofases en el mismo preparado; y todas las subfases de la profase en el mismo preparado. Además, por ejemplo, en la metafase II, a pesar de no mostrarse en las tablas debido a que no se la observó sistemáticamente, se visualizaron asincronías entre las díadas que estaban atravesando la metafase II, una de ellas con todos los cromosomas en la placa ecuatorial, y la otra todavía en diacinesis.

5.2 Producción de semilla

En cuanto a la producción de semilla, la misma fue muy diferente entre las líneas. Hubo plantas que tuvieron una alta fertilidad, macollando y dando panojas con semillas llenas, y hubo otras que florecieron muy escasamente y además muchas de sus espiguillas eran vanas. La estimación de semilla llena de toda la población estuvo en un rango que va desde 63% a 0%, con un promedio de 28% (Tabla 3). Las semillas se cosecharon con facilidad, ya que no hubo infección por *Claviceps paspali* y estaban retenidas en la planta. Las plantas se mantuvieron en invernáculo para seguir cosechando semilla y almacenarlas con el objetivo de continuar con el proceso de endocría en un futuro. En cuanto al PMS llenas, los resultados también son muy variables, evidenciando segregación, con un rango de 2,93 - 1,44 g. Es importante destacar que no se observó una relación entre fertilidad y PMS llenas. Para los 6 genotipos donde se evaluó porcentaje de germinación en semilla llena, se muestra que, dentro de las semillas viables, las mismas tienen mayormente buena aptitud germinativa, con porcentajes de medios a altos (Tabla 4).

Tabla 3*Evaluación de cantidad y calidad de semilla producida para 20 líneas F2*

N° de planta	Peso 50 a (g)	Peso 50 b (g)	% llenas en 100	Peso total (g)	PMS (g)	Cant. semilla	Cant. llenas	PMS llenas (g)
1 1001	0,096	0,093	63	1,41	1,89	746	470	2,54
1 1002	0,079	0,08	52	0,66	1,59	415	216	2,18
1 1003	0,039	0,037	5	0,11	0,76	145	7	1,82
1 1004	0,068	0,06	22	0,62	1,28	484	107	2,75
1 1005	0,036	0,038	2	0,53	0,74	716	14	1,84
1 1006	0,07	0,06	32	0,24	1,3	185	59	2,52
1 1007	0,05	0,044	9	0,51	0,94	543	49	2,37
1 1008	0,083	0,076	45	0,36	1,59	226	102	2,43
1 1009	0,07	0,083	52	0,21	1,53	137	71	2,18
1 1010	0,064	0,07	37	0,93	1,34	694	257	2,14
1 1011	0,03	-	-	0,03	-	-	-	-
1 1012	0,056	0,063	31	0,22	1,19	185	57	2,14
1 1013	0,043	0,041	12	0,13	0,84	155	19	1,93
1 1014	0,055	0,056	14	0,14	1,11	126	18	2,43
1 1015	0,067	0,071	29	1,96	1,38	1420	412	2,46
1 1016	0,078	0,089	48	2,15	1,67	1287	618	2,50
1 1017	0,052	0,052	25	0,16	1,04	154	38	1,44
1 1018	0,087	0,109	47	0,36	1,96	216	101	2,81
1 1019	0,049	0,053	9	0,29	1,02	174	16	2,93
1 1020	0,039	0,037	0	0,29	0,76	376	0	1,68

Nota. Peso de 50 a y b refiere al peso en gramos de dos grupos de 50 semillas. El % de fertilidad refiere a el número de semillas llenas en 100. Estimación del PMS en gramos.

Tabla 4*Germinación de semillas viables*

N° de planta	% sem. germinadas
1 1001	80,8
1 1002	52,2
1 1008	0
1 1010	50,8
1 1015	77,5
1 1016	92,1

Nota. Germinación de semillas viables de las 6 líneas con suficientes semillas para realizar esta evaluación.

Figura 10

Diferencia morfológica entre dos líneas



Además del comportamiento meiótico y la producción de semilla, se pudieron detectar diferencias fenotípicas mediante observación directa, aunque las mismas no fueron sistemáticamente registradas (Figura 10). Por ejemplo, la línea 11005, fue fenotípicamente diferente. La mayoría de las líneas presentaban un hábito de vida cespitoso, con compuestos antociánicos en la vaina de la hoja, glabra y macolla semi rolliza, mientras que la línea 11005 presentaba un hábito de vida casi decumbente, vainas más pubescentes, comprimidas y sin antocianinas. Estas diferencias se deben únicamente al genotipo, ya que las plantas crecieron en el mismo ambiente, además de ser una población segregante, lo que respalda el hecho de que sean fenotípicamente distintas.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se observó algún tipo de irregularidad meiótica en un 9,5% de las células madre del polen estudiadas. En diacinesis, la cuantificación del número de elementos se realizó con precisión, pero no sin dificultad, ya que a menudo la presencia de dos bivalentes muy cercanos entre sí, semejaban a un cuadrivalente. La diacinesis fue normal con excepción de unos pocos cuadrivalentes. Esto era de esperar, ya que es un híbrido alotetraploide, con fórmula genómica $2n = 2x = 40$ IIJJ, y se comporta como un diploide de 40 cromosomas. Los cuadrivalentes se observaron con certeza en al menos una célula de casi todas las líneas, lo que revela la existencia de apareamientos entre cromosomas homeólogos, es decir, de distintos genomas. En metafase I, las irregularidades fueron de fácil visualización, ya que se trata de observar si los cromosomas están todos alineados en la placa ecuatorial, o si alguno de ellos comenzó a migrar prematuramente. En efecto, se constataron algunas irregularidades en esta fase. La irregularidad que con más frecuencia y más fácilmente se detectó fue en anafase I, tanto atrasos de cromosomas como puentes de cromatina. Durante la formación de díadas y tétradas, no se registró la presencia de micronúcleos. Esto se debe a que, a pesar de existir irregularidades en etapas anteriores, éstas pueden resolverse luego sin remanentes de cromatina no incorporados a los núcleos principales. Los cromosomas rezagados, al finalizar la telofase, quedan finalmente distribuidos en cada uno de los núcleos hijos. Las causas de las irregularidades meióticas observadas en anafase pueden ser debidas a rearrreglos de sus genomas parentales, competencia entre ambos genomas, asincronías en la división de los centrómeros, diferencias en la duración del ciclo celular entre los padres, interacciones entre el núcleo y el citoplasma, entre otras (Urry, 2014). En resumen, se detectaron irregularidades en las fases tempranas de la meiosis, pero no observamos evidencia de que las mismas expliquen la esterilidad en líneas tempranas ni tampoco la distorsión en la segregación, ya que se resuelven citológicamente antes a la formación de las díadas/tétradas. Además, algunas de las líneas estudiadas presentaron muy baja fertilidad medida como producción de semilla y no se encontraron irregularidades citológicamente observables asociadas.

Los puentes o arrastres de cromatina durante la anafase I se deben probablemente a una recombinación irregular entre los cromosomas apareados. Durante la metafase, cuando los cromosomas aún están unidos por sus quiasmas luego del entrecruzamiento, las fibras del huso comienzan a tirar de los centrómeros hacia cada polo, provocando la estructura típica que tienen los cromosomas homólogos durante las metafases observadas. Ya en anafase, si los cromosomas homólogos no terminalizaron sus quiasmas, puede suceder que, como se ve en la foto (Fig. 5e), los cromosomas se deformen por la tracción de las fibras del huso. El resultado de este proceso puede ser una aneuploidía, es decir una alteración por pérdida o duplicación de un cromosoma en la espora hija, aunque en este caso sería parcial, ya que involucra sólo un fragmento de cromosoma, y no un cromosoma

entero. El entrecruzamiento entre ambas cromátidas recombinantes no se resolvería de forma balanceada y equitativa, sino que una se lleva un fragmento mayor de ADN, mientras que la otra cromátida queda con menos ADN. Es decir, aunque no se observaron micronúcleos, lo que significa una pérdida de cromosomas, la existencia de puentes evidencia que sí puede haber cromosomas que durante el entrecruzamiento resultaron con diferentes cantidades de ADN en cada microspora. Los cromosomas resultantes de este puente son frágiles, están descondensados, y son fácilmente rompibles. Las esporas resultantes de esta irregularidad, pueden terminar siendo un gameto, que fecunde a otro gameto y que forme una planta. En general, las plantas (y más en plantas poliploides) no se ven afectadas por estos pequeños desbalances, aunque pueden tener consecuencias, por ejemplo, en la fertilidad (Henry et al., 2010). Por tanto, esta irregularidad en la meiosis, no explica los resultados de muy baja fertilidad que se registraron en alguna de las líneas que componen esta población.

Las diferencias observadas en cuanto a bivalentes asociados al nucléolo pueden explicarse por las diferencias de sitios de organizadores nucleolares entre los progenitores del híbrido. Como reportó Vaio et al. (2019), estudiando los loci 35S y 5S, región que codifica para la formación de ribosomas, se estableció que las especies sexuales del grupo se diferenciaban en cuanto al tamaño de estos sitios, la cantidad de los mismos, y su ubicación en el cromosoma. Estos loci se localizaron en los cromosomas en mitosis, mediante la técnica FISH. Se hizo este análisis para los tetraploides progenitores del híbrido interespecífico de este trabajo, y se observaron diferencias en cuanto a intensidad de fluorescencia, lo que sugiere distintos números de copias. Estas diferencias pueden explicarse evolutivamente durante el proceso de diploidización por rearrreglos en los cromosomas, entrecruzamientos irregulares, o movimiento de transposones. En *P. plurinerve*, por ejemplo, se observó, un único sitio 35S, mientras que en *P. flavescens* se observaron dos sitios 35S. Por un lado, estas diferencias entre número de sitios de ambos progenitores pueden explicar lo observado en la etapa de diacinesis en las líneas F₂ derivadas de la hibridación interespecífica, donde el número de bivalentes asociados al nucléolo era diferente entre líneas. Estas diferencias son concordantes con ser una F₂, ya que las mismas tienen una generación de autofecundación y segregación al azar en la que los individuos resultantes pueden tener diferentes números de cromosomas con sitios asociados al nucléolo. Si bien, estas diferencias en estos sitios, no necesariamente signifiquen que puede llevar a grandes irregularidades en la meiosis, representan evidencia de que por lo menos algunas regiones cromosómicas han evolucionado de manera diferente desde la separación de estas especies y causar las irregularidades menores observadas en anafase I.

En cuanto a la fertilidad de las líneas, los resultados muestran líneas con altas producciones de semillas llenas. Sin embargo, también hubo líneas con baja producción de semilla llena. Analizando comparativamente los resultados de este trabajo en líneas F₂ con otro trabajo de Caponio y Quarin (1990) en un híbrido entre

las mismas especies, pero en las líneas F_1 , vemos que, en el promedio de las líneas, la cantidad de bivalentes por cada CMP es de 19,6 en comparación con el 19,94 obtenida por dichos autores (resultado obtenido en base al estudio de 5 híbridos F_1). La producción de semilla a la que llegaron estos autores fue de 14,8 a 45,4 % para 3 híbridos analizados. En este trabajo, se tuvo producciones de semilla desde 0% de semillas llenas, hasta un máximo de 63%. Por lo que los resultados de Caponio y Quarin (1990) son coherentes con la idea de que otras causas están detrás de la baja fertilidad, ya que la meiosis que reportaron era mayormente normal, mientras que la producción de semilla era media a baja. Además, en estas líneas F_2 , hubo mucha segregación para esta característica, desde plantas totalmente estériles hasta plantas con alta fertilidad. Es decir que, en el avance de una generación, ya aparecieron plantas estériles, a partir de una F_1 que no tenía ningún híbrido estéril. Por tanto, es durante la segregación donde se produjo la esterilidad, y no en el híbrido F_1 .

Las irregularidades meióticas observadas en F_2 tampoco explicarían la distorsión de marcadores en F_6 reportada por Dogliotti (2021). Se puede averiguar si la distorsión en los marcadores comienza en las líneas tempranas o si ocurre a medida que se endocría. Una técnica sencilla es la utilización de marcadores moleculares en F_2 y observar si el sesgo ya comienza en esta generación. De ser necesario otras herramientas más sofisticadas son las de citogenética molecular. Para los cromosomas en los que se cuenta con marcadores como los que portan sitios de ADN r , se pueden utilizar las mismas secuencias que utilizaron Vaio et al. (2019) para marcar los loci 5S y 35S, y observar el número de cromosomas en F_2 que presentan estos sitios, y determinar el origen de los cromosomas heredados por cada línea. Entonces, si en la mayoría de las líneas F_2 se encontraran dos pares de cromosomas con este sitio, indicaría que por lo menos en ese par, se hereda preferentemente el de *P. flavescens*. Por tanto, este cromosoma parental tendería a heredarse durante la endocría, y a hacerse homocigoto en las líneas fértiles, lo que explicaría el sesgo resultante en F_6 . Lo mismo podría suceder con cualquier otro cromosoma en estas primeras generaciones o en generaciones más avanzadas. Otras sondas cromosoma específicas podrían desarrollarse para averiguar qué cromosomas son los que están apareados formando cuadrivalentes, y si son los mismos en todas las líneas, o sí en cada línea ocurre en cromosomas distintos. También, otra técnica posible de citogenética molecular, podría ser GISH. Esta técnica es de difícil realización, ya que, para esto, es necesario que los genomas parentales estén suficientemente diferenciados a nivel de secuencias repetidas. Si se pudiera aplicar esta técnica, nos permitiría distinguir los genomas de cada progenitor en la descendencia, y se podría observar si el sesgo en F_6 es igual entre todos los cromosomas, es decir que todos los cromosomas tienen más ADN de un padre que del otro, o si hay algún cromosoma que hereda preferentemente la versión de uno u otro progenitor. En híbridos en los que esta técnica puede aplicarse, Li et al. (2021), por ejemplo, trabajando con caña de azúcar, analizaron el

comportamiento meiótico de híbridos F_1 resultado de una hibridación intergenérica, el cual mostró múltiples anomalías meióticas. Con GISH, observaron cuál de los genomas parentales era el responsable de las irregularidades. Además, mediante técnica FISH, estudiaron el número y ubicación de loci 45S y 5S ADNr. Determinaron que, en el F_1 , un sitio 45S se perdió durante la meiosis, y que hubo variación para el 5S durante la meiosis. Además, estos autores, mediante GISH, reportaron, al igual que los trabajos de Kopecký et al. (2022) que también hizo GISH en *Festulolium*, que había menos cromosomas de una de las especies que los esperados. Sin embargo, la aplicación directa de la técnica de GISH no resulta informativa en especies del grupo Dilatata (Speranza, 1996). Sin embargo, mediante el desarrollo de sondas específicas, se podría obtener nuevos datos acerca de la distorsión en la segregación, además de poder observar a nivel cromosómico, los resultados obtenidos con los marcadores moleculares.

A pesar de la existencia de irregularidades en el comportamiento de los cromosomas en la meiosis, estas no explican los fenómenos observados en anteriores trabajos dentro de la población, como ser la esterilidad en líneas tempranas reportada por Sandro (2020), y la distorsión en la segregación reportada por Dogliotti (2021). Por tanto, la participación de otros fenómenos debe explicar estos hechos. El análisis comparativo con trabajos de hibridación interespecífica en otras especies muestran otros mecanismos posibles para explicar las observaciones de los trabajos precedentes. Un caso bien estudiado es el del arroz (*Oryza sativa* L.) donde durante mucho tiempo se buscó explotar la heterosis mediante hibridaciones intersub-específicas entre las subespecies *indica-japonica*. En esos casos, los híbridos resultantes eran estériles y no producían semilla. Los estudios citogenéticos mostraron que las plantas estériles tenían una meiosis totalmente normal (Engle et al., 1969). Ya Kato (1930) les atribuyó esta esterilidad a genes y no a irregularidades en la meiosis. Kumar y Chakrabarti (2000) trabajando en estos híbridos, también reportó que la meiosis no explicaba la esterilidad, sino que se debía a otras causas. Por lo que no siempre hay una relación entre esterilidad e irregularidades meióticas. Además, la esterilidad de los híbridos puede deberse tanto a aborto de gametos masculinos, como de los gametos femeninos o el embrión (Liu et al., 2004). La fertilidad de estos híbridos está determinada, entonces, por caracteres complejos, cuantitativos, y no por irregularidades en la meiosis. Este fenómeno se conoce como “incompatibilidad híbrida” (Xie et al., 2019). La esterilidad híbrida, es causada por genes a los que se le atribuye un rol importante en la especiación. Ya en la primera década del siglo XX, el modelo conocido como Bateson-Dobzhansky-Muller, sostenía que la incompatibilidad híbrida se debe a interacciones deletéreas entre alelos de ciertos loci que actúan en el híbrido producto de hibridación entre especies/subespecies (Xie et al., 2019). Se han reportado muchos loci causantes de esterilidad híbrida; aproximadamente 50 loci, incluyendo loci de efecto mayor, y loci cuantitativos de efecto menor (Ouyang et al., 2009). Muchos de estos loci parecen actuar individualmente, pero otros

muestran interacciones epistáticas. De los muchos loci reportados como responsables de la esterilidad en híbridos *indica-japonica*, la mayoría están compuestos por varios genes. Una combinación particular de alelos de estos genes en alguno de estos locus, puede llevar al aborto de gametos masculinos o femeninos y del embrión. Por lo tanto, la posible existencia de estos genes podría estar actuando en los híbridos interespecíficos del grupo *Dilatata*, causando la esterilidad de algunas líneas. Estos alelos estarían presentes también en algunos de los padres de estas líneas, pero escondidos, recesivos, pero que se manifiestan al cruzarse con otra especie. También, estos genes podrían ser, en parte, responsables de la distorsión de la segregación, ya que las líneas que presenten las combinaciones de alelos que causan esterilidad, no pueden dejar descendencia, resultando en un sesgo hacia uno de los padres.

El híbrido interespecífico que se utilizó en este trabajo no se trata estrictamente de la formación de un nuevo poliploide, sino que es la hibridación de dos alopoliploides emparentados que se han diploidizado, y por tanto se han diferenciado, principalmente en cuanto a sus secuencias repetidas (Vaio et al., 2019). Sin embargo, el conocimiento generado respecto al comportamiento meiótico luego de la formación de un poliploide nuevo, puede aportar conocimientos al tema. En un artículo de revisión realizado por Mason y Batley (2015) se menciona que en alopoliploides recientes, la maquinaria meiótica puede adaptarse rápidamente para estabilizar la meiosis y resolver los problemas de estabilidad del genoma. De Storme y Mason (2014) mencionan que los alopoliploides en general muestran pequeños intercambios entre homeólogos, con reordenamientos como inversiones y translocaciones. En este caso, sin embargo, se trata de una hibridación entre especies poliploides bien establecidas y emparentadas, mientras que estos rearrreglos generalizados se describen en cruzamientos que dan origen a nuevos poliploides, por lo tanto, aunque no se pueden descartar diferencias entre los genomas parentales, no resultaría probable que éstas sean tan grandes como para causar la esterilidad y distorsión observadas.

En este trabajo, se describió detalladamente la fertilidad de cada línea, y se encontraron plantas con muy baja fertilidad, resultados concordantes a los reportados por Sandro (2020). Además, se estudió la meiosis de estas plantas prácticamente estériles y no se encontraron irregularidades que expliquen esto. Por tanto, lo observado en este trabajo descarta que las plantas estériles tengan su causa en la meiosis.

7. CONCLUSIONES

La observación de la meiosis permitió descartar que la esterilidad en líneas tempranas reportada por Sandro (2020) y la distorsión en la segregación reportada por Dogliotti (2021) se deba a irregularidades en la meiosis. Dentro de la población F₂ estudiada, hubo plantas con muy baja fertilidad que no mostraron irregularidades que la expliquen. Las irregularidades que se detectaron en fases tempranas de la meiosis, se resolvían en fases tardías.

La existencia de genes de esterilidad como se ha reportado en otras especies puede determinar la esterilidad en las líneas tempranas del híbrido interespecífico producto de *P. flavescens* x *P. plurinerve*. Además, estos genes podrían ser responsables también de la distorsión de la segregación, ya que las líneas que presentan esta combinación de alelos de esterilidad, no pueden dejar descendencia, resultando en un sesgo hacia uno de los padres.

Como perspectivas de futuros trabajos, se podrían realizar estudios de citogenética molecular, con el fin de evaluar si la distorsión en la segregación comienza ya en estas líneas F₂, o si ocurre durante la endocria. Además, se podría observar la distribución de la distorsión dentro de los cromosomas en F₆.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akashi, R., & Adachi, T. (1992). Somatic embryogenes and plant generation from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). *Plant Science*, 82(2), 213-218.
- Akera, T., Chmátal, L., Trimm, E., Yang, K., Aonbangkhen, C., Chenoweth, D. M., Janke, C., Schultz, R. M., & Lampson, M. A. (2017). Spindle asymmetry drives non-Mendelian chromosome segregation. *Science*, 358(6363), 668-672.
- Asociación Argentina de Producción Animal. (2003). Taller El Pasto Miel: Una alternativa para las pasturas de la Región Pampeana. *Revista Argentina de Producción Animal*, 23(3-4), 127-164.
- Barcaccia, G., & Albertini, E. (2013). Apomixis in plant reproduction: A novel perspective on an old dilemma. *Plant Reproduction*, 26(3), 159-179. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0222-y>
- Baréa, K., Scheffer-Basso, S. M., Dall'Agnol, M., & De Oliveira, B. N. (2007). Management of *Paspalum dilatatum* Poir. biotype Virasoro: 1. Production, chemical composition and persistence. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(4), 992-999. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000500002>
- Barreto, I. L. (1974). *O gênero Paspalum (Gramineae) no Rio Grande do Sul* [Trabajo final de grado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Bashaw, E. C., & Forbes, I. (1958). Chromosome numbers and Microsporogenesis in Dallisgrass *Paspalum Dilatatum* Poir. *Agronomy Journal*, 50(8), 441-445. <https://doi.org/10.2134/agronj1958.00021962005000080006x>
- Bashaw, E. C., & Hoff, B. (1962). Effects of irradiation on apomictic common dallisgrass. *Crop Science*, 2(6), 501-504.
- Bashaw, E. C., & Holt, E. C. (1958). Megasporogenesis, embryo sac development and embryogenesis in dallisgrass, *Paspalum dilatatum*, Poir. *Agronomy Journal*, 50(12), 753-756. <https://doi.org/10.2134/agronj1958.00021962005000120011x>
- Bennett, H. W. (1944). Embryology of *Paspalum dilatatum*. *Botanical Gazette*, 106(1), 40-45.
- Bennett, H. W., Burson, B. L., & Bashaw, E. C. (1969). Intraspecific Hybridization in Dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. *Crop Science*, 9(6), 807-809.

- Bettolli, M. L., Del Carmen, M. Á. A., Cruz Brasesco, G., Rudorff, F., Martínez Ortiz, A., Arroyo, J., & Armoa, J. (2010). Pastura natural de Salto (Uruguay): Relación con la variabilidad climática y análisis de contextos futuros de cambio climático. *Revista Brasileira de Meteorologia*, 25(2), 248-259.
- Burson, B. L. (1978). Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 20(3), 365-372.
- Burson, B. L. (1979). Cytogenetics of *Paspalum urvillei* \times *P. intermedium* and *P. dilatatum* \times *P. paniculatum* Hybrids. *Crop Science*, 19(4), 534-538.
- Burson, B. L. (1983). Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. En J. A. Smith & V. M. Hays (Eds.), *Proceedings of the XIV International Grassland Congress* (pp. 170-173). CRC Press.
- Burson, B. L. (1991). Homology of chromosomes of the X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Genome*, 34(6), 950-953. <https://doi.org/10.1139/g91-147>
- Burson, B. L. (1995). Genome relationship and reproductive behavior of intraspecific *Paspalum dilatatum* hybrids: Yellow-anthered \times Uruguaiana. *International Journal of Plant Sciences*, 156(3), 326-331.
- Burson, B. L., & Bennett, H. W. (1972). Cytogenetics of *Paspalum urvillei* \times *P. juergensii* and *P. urvillei* \times *P. vaginatum* Hybrids. *Crop Science*, 12(1), 105-108.
- Burson, B. L., Correa, J., & Potts, H. (1978). Anatomical study of seed shattering in Bahiagrass and Dallisgrass. *Crop Science*, 18(1), 122-125.
- Burson, B. L., & Tischler, C. (1993). Regeneration and somaclonal variation in apomictic *Paspalum dilatatum* Poir. *Euphytica*, 67, 71-78.
- Burson, B. L., Venuto, B., & Hussey, M. (2009). Registration of 'Sabine' Dallisgrass. *Journal of Plant Registrations*, 3(2), 132-137.
- Burson, B. L., Voigt, P. W., & Evers, G. W. (1991) Cytology, reproductive behaviour and forage potential of hexaploid dallisgrass biotypes. *Crop Science*, 31(3), 636-641.
- Burton, G. W., & Hanna, W. W. (1992). Using apomictic tetraploids to make a self-incompatible diploid Pensacola bahiagrass clone set seed. *Journal of Heredity*, 83(4), 305-306. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111217>

- Burton, G. W., & Jackson, J. E. (1962). Radiation breeding of apomictic prostrate dallisgrass, *Paspalum dilatatum* var. *pauciciliatum*. *Crop Science*, 2(6), 495-497.
- Campbell, C. S., Quinn, J. A., Cheplick, G. P., & Bell, T. J. (1983). Cleistogamy in grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14(1), 411-441.
- Campbell, L. R. V. (1999). *Paspalum dilatatum* and 19 *Axonopus* affinis in Australia. *Forage Seed Production Tropical and subtropical species*, 2, 325-333.
- Caponio, I., & Quarin, C. (1987). El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana*, 19, 35-45.
- Caponio, I., & Quarin, C. (1990). Intra- and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. *Crop Science*, 30(2), 362-364.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183x003000020023x>
- Carámbula, M. (1977). *Producción y manejo de pasturas sembradas*. Hemisferio Sur.
- Carámbula, M. (2002). *Potenciales y alternativas para producir forraje*. Hemisferio Sur.
- Chapin, S., Walker, B. H., Hobbs, R. J., & Lawton, D. U. (1997). Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science*, 27(5325), 500-504.
- Chase, A. (1929). *The North American species of Paspalum*. Systematic plant studies.
- Coll, J. (1991). *Producción de semilla de Paspalum dilatatum*. INIA.
- Cornaglia, P. S., Schrauf, G. E., & Deregibus, V. A. (2009). Flooding and grazing promote germination and seedling establishment in the perennial grass *Paspalum dilatatum*. *Austral Ecology*, 34(3), 343-350.
- Cortabarría, A., & Vidal, M. (2023). *Fenotipado de la germinación y del peso de semillas de una población de líneas puras recombinantes de Paspalum flavescens y Paspalum plurinerve* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- Cuña, M., Muguruza, M., & Rocha, F. (2012). *Determinación del desarrollo fenológico de la panoja, curva de caída y calidad de semilla en Paspalum dilatatum cv. Chirú y Paspalum dilatatum subsp. flavescens* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- D'Esposito, R., & López, C. (2001). Características biológicas de *Claviceps paspali* Stev. & Hall. *Boletín Micológico*, 16, 1-8.

- Da Costa, I., & Scheffer-Basso, S. M. (2003a). A caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo virasoro e *Festuca arundinacea* Scherb: 1. Desenvolvimento morfológico. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(5), 1054-1060.
- Da Costa, I., Scheffer-Basso, S. M. (2003b). A caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo virasoro e *Festuca arundinacea* Schreb: 2. Disponibilidade de forragem e valor nutritivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(5), 1061-1067.
- Davies, L., & Cohen, D. (1992). Phenotypic variation in somaclones of *Paspalum dilatatum* and their seedling offspring. *Canadian Journal of Plant Science*, 72(3), 773-784.
- De Patta Pillar, V., Muller, S. C., De Souza, Z. M., & Ávila Jacques, A. V. (Eds.). (2009). *Campos Sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Ministério do Meio Ambiente.
<https://www.terra-brasilis.org.br/ecotecadigital/pdf/campos-sulinos-conservacao-e-uso-sustentavel-da-biodiversidade.pdf>
- De Storme, N., & Mason, A. S. (2014) Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology*, 1, 10-33.
- Dear, B., & Ewing, M. (2008). The search for new pasture plants to achieve more sustainable production systems in southern Australia. *Animal Production Science*, 48(4), 387-396.
- Díaz, S., & Cabido, M. (2001). Vive la difference: Plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution*. 16(11), 646-655.
- Dogliotti, G. (2021). *Caracterización del modo de herencia y ligamiento en juego de marcadores microsatélites en Paspalum dilatatum* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- Engle, L. M., Ramirez, D. A., & Chang, T. T. (1969). The cytology of sterility in F₂, F₃, and F₄ hybrids of indica × japonica crosses of rice (*Oryza sativa* L.). *Cytologia*, 34(4), 572-585.
- Fairey, D. T., Loch, D. S., Hampton, J. G., & Ferguson, J. E. (Eds.). (1997). *Forage seed production tropical and subtropical species* (Vol. 2). CABI.
- Fenner, M. (1991) The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Science Research*, 1, 75-84.

- Ferreira, J. L., Gwinner, R., Ferreira, L. M., Ferronato, J., Leite, L. G., Ferreira, K. Silva, J. C., Dos Santos, L. P., & Silva, A. W. (2020). Understanding the extent of phenotypic variability in accessions of *Paspalum urvillei* Steud. from the USDA NPGS. *Iheringia, Série Botânica.*, 75, Artículo e2020006. <https://doi.org/10.21826/2446-82312020v75e2020006>
- Formoso, F. (2007). *Producción de pasturas sembradas en directa, puras o asociadas a trigo*. INIA.
- Formoso, F. (2011). *Forrajeras y leguminosas de forraje: Efectos del estrés ambiental e interferencia de gramilla [Cynodon dactylon, (L) Pers.]*. INIA.
- Fornara, D. A., & Tilman, D. (2008). Plant functional composition influences rates of soil carbon and nitrogen accumulation. *Journal of Ecology*, 96(2), 314-322.
- Frankel, R., & Galun, E. (1977). Alloamy. En R. Frankel (Ed.), *Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding* (pp. 79-234). Springer Science & Business Media.
- Friedel, M. H., Bastin, G. N., & Griffin, G. F. (1988). Range assessment and monitoring of arid lands: The derivation of functional groups to simplify vegetation data. *Journal of Environmental Management*, 27, 85-97.
- Gaiero, P., Van De Belt, J., Vilaró, F., Schranz, M. E., Speranza, P., & De Jong, H. (2017). Collinearity between potato (*Solanum tuberosum* L.) and wild relatives assessed by comparative cytogenetic mapping. *Genome*, 60(3), 228-240. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0150>
- García, J. (1971). *Influencia de factores ambientales sobre el rendimiento y calidad de semilla en tres biotipos de P. dilatatum poir.* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- García, J. (1995). *Gramilla y praderas*. INIA.
- Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews*, 24(2), 1-44.
- Gepts, P. (2006). Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Science*, 46(5), 2278-2292.
- Giménez, A., Castaño, J. P., Baethgen, W., & Lanfranco, B. (2009). *Cambio climático en Uruguay, posibles impactos y medidas de adaptación en el sector agropecuario*. INIA.

- Gitay, H. T., & Noble, I. R. (1997). What are functional types and how should we seek them. En T. M. Smith, H. H. Shugart, & F. I. Woodward (Eds.), *Plant functional types: Their relevance to ecosystem properties and global change* (pp. 3-19). Cambridge University Press.
- Glison, N. (2013). *Variabilidad en el comportamiento germinativo y en la dormición por cubiertas entre diferentes genotipos de Paspalum dilatatum Poir.* [Tesis de Maestría]. Universidad de la República.
- Glison, N., Batlla, D., González Barrios, P., Viega, L., Saldanha, S., Musacchio, E. M., Rush, P., & Speranza, P. R. (2021). Modelling seedling emergence in Paspalum species using environmental data from field experiments. *Grass and Forage Science*, 76(3), 363-377.
- Glison, N., Romero, D., Rosso, V., Guerrero, J. C., & Speranza, P. R. (2023). Understanding the geographic patterns of closely-related species of Paspalum (Poaceae) using distribution modelling and seed germination traits. *Plants*, 12(6), Artículo e1342.
<https://doi.org/10.3390/plants12061342>
- González Barrios, P., & Astigarraga, L. (2012). Productividad de vacas lecheras en pasturas de festuca o de Dactylis. *Agrociencia (Uruguay)*, 16(1), 160-165.
- González Barrios, P., Speranza, P., Glison, N., Piccardi, M., Balzarini, M., & Gutiérrez, L. (2016). Analysis of flowering dynamics heritability in the perennial warm-season grass Paspalum dilatatum. *Grass and Forage Science*, 71(1), 123-131. <https://doi.org/10.1111/gfs.12159>
- Hacker, J. B. (1999). Crop growth and development: Grasses. *Forage Seed Production*, 2, 41-56.
- Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M. C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P. G., Finn, J. A., Freitas, H., Giller, P. S., Good, J., Harris, R., Högberg, P., Huss-Danell, K., Joshi, J., Jumpponen, A., Korner, C. W., Leadley, P., Loreau, M., Minns, A., ... & Lawton, J. H. (1999). Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science*, 286(5442), 1123-1127.
- Henry, I. M., Dilkes, B. P., Miller, E. S., Burkart-Waco, D., & Comai, L. (2010). Phenotypic consequences of aneuploidy in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, 186(4), 1231-1245.
- Hickenbick, M., & Flores, A. (1992). Mode of reproduction and seed production in Paspalum dilatatum Poir. Virasoro biotype–Dilatata Group (Gramineae). *Revista Brasileira de Genética*, 15(1), 85-102.

- Hojsgaard, D., & Hörandl, E. (2015). Apomixis as a facilitator of range expansion and diversification in plants. *Evolutionary biology: Biodiversification from genotype to phenotype*, 305-327.
- Holling, C. S. (1973). Resilience and stability of ecological systems. *Annual review of ecology and systematics*, 4(1), 1-23.
- Instituto Nacional de Semillas. (2023). *Estimación del uso de semilla nacional de Paspalum dilatatum*.
<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMDZkNmI0ZDYtN2U4Ny00YWUwLWJiZWVtMzdiMmFiMThkMjcwIiwidCI6IjM1NWY2Yzg4LTQ1ODUtNDdjZC1hNTlmLTdhOGFiNzcyMTk1NCJ9&pageName=ReportSection>
- International Seed Testing Association. (2010). *International rules for seed testing*. <https://www.seedtest.org/en/publications/international-rules-seed-testing.html>
- Jank, L., Barrios, S. C., do Valle, C. B., Simeão, R. M., & Alves, G. F. (2014). The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop and Pasture Science*, 65(11), 1132-1137.
- Johnston, W. H. (1996). The place of C4 grasses in temperate pastures in Australia. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39(4), 527-540.
- Judd, B. I. (1975). New world tropical forage grasses and their management. *World Crops*, 27(3), 113-117.
- Kaeppler, S. (2012). Heterosis: Many genes, many mechanisms: End the search for an undiscovered unifying theory. *International Scholarly Research Notices*, 2012, Artículo e682824. <https://doi.org/10.5402/2012/682824>
- Kato, S. (1930). On the affinity of the cultivated varieties of rice plants, *Oryza sativa* L. *Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University*, 2(9), 241-276.
- Kopecký, D., Scholten, O., Majka, J., Burger-Meijer, K., Duchoslav, M., & Bartoš, J. (2022). Genome Dominance in *Allium* Hybrids (*A. cepa* × *A. roylei*). *Frontiers in Plant Science*, 13, Artículo e854127. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.854127>
- Kumar, S., & Chakrabarti, S. N. (2000). Genetic and cytogenetic analysis of spikelet sterility in Indica x Japonica crosses in *Oryza sativa* L. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 60(04), 441-450.

- Li, X., Huang, F., Chai, J., Wang, Q., Yu, F., Huang, Y., Wu, J., Wang, Q., Xu, L., Zhang, M., & Deng, Z. (2021). Chromosome behavior during meiosis in pollen mother cells from *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus* F₁ hybrids. *BMC Plant Biology*, *21*, Artículo e139. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02911-z>
- Liu, H., Xu, C., & Zhang, Q. (2004). Male and female gamete abortions, and reduced affinity between the uniting gametes as the causes for sterility in an indica/japonica hybrid in rice. *Sexual Plant Reproduction*, *17*, 55-62. <https://doi.org/10.1007/s00497-004-0214-z>
- Loch, D. S., & Ferguson, J. E. (1999). Tropical and subtropical forage seed production: an overview. En D. S. Loch & J. E. Ferguson (Eds.), *Forage Seed Production* (Vol. 2, pp. 1-40). CABI. https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=BOIQmQ1FnDUC&oi=fnd&pg=PA1&dq=related:p2qFqJVE_8MJ:scholar.google.com/&ots=4ULTqvaNeh&sig=2lSwn3BnSzsAvxR5ZwkJzhvspyQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., & Wardle, D. A. (2001). Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*, *294*(5543), 804-808.
- Loreti, J., & Oesterheld, M. (1996). Intraspecific variation in the resistance to flooding and drought in populations of *Paspalum dilatatum* from different topographic positions. *Oecologia*, *108*, 279-284.
- Lukaszewski, A. J. (2010). Behavior of centromeres in univalents and centric misdivision in wheat. *Cytogenetic and Genome Research*, *129*(1-3), 97-109. <https://doi.org/10.1159/000314108>
- Machado, A. C. de C., Valls, J. F. M., Peñaloza, A. del P. de S., & Santos, S. dos. (2005). Novos biótipos pentaplóides do grupo Dilatata de *Paspalum* L. (Gramineae) no Sul do Brasil. *Ciência Rural*, *35*(1), 56-61. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782005000100009>
- Mackay, I. J., Cockram, J., Howell, P., & Powell, W. (2021). Understanding the classics: The unifying concepts of transgressive segregation, in-breeding depression and heterosis and their central relevance for crop breeding. *Plant Biotechnology Journal*, *19*(1), 26-34. <https://doi.org/10.1111/pbi.13481>
- Madia, M., & Schrauf, G. (1999). Prospección de enfermedades de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir) detectadas en la región pampeana de la República Argentina. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, *25*, 435-443.

- Majka, J., Glombik, M., Doležalová, A., Kneřová, J., Ferreira, M. T. M., Zwierzykowski, Z., Duchoslav, M., Studer, B., Doležel, J., Bartoš, J., & Kopecký, D. (2023). Both male and female meiosis contribute to non-Mendelian inheritance of parental chromosomes in interspecific plant hybrids (*Lolium* × *Festuca*). *New Phytologist*, 238(2), 624-636.
- Mason, A. S., & Batley, J. (2015). Creating new interspecific hybrid and polyploid crops. *Trends in Biotechnology*, 33(8), 436-441. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.004>
- Masters, R. A., Mislavy, P., Moser, L. E., & Rivas-Pantoja, F. (2004). Stand establishment. En L. E. Moser, B. L. Burson, & L. E. Sollenberger (Eds.), *Warm-season (C4) grasses* (pp. 145-177). American Society of Agronomy.
- Melters, D. P., Bradnam, K. R., Young, H. A., Telis, N., May, M. R., Ruby, J. G., Sebra, R., Peluso, P., Eid, J., Rank, D., Garcia, J. F., DeRisi, J. L., Smith, T., Tobias, C., Ross-Ibarra, J., Korf, I., & Chan, S. W. L. (2013). Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome Biology*, 14(1), Artículo e10. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-1-r10>
- Michellini, D. (2010). *Caracterización morfo genética de Paspalum dilatatum Poir.* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- Millot, J. C. (1969). Mejoramiento de gramíneas forrajeras. En Centro de Investigaciones Agrícolas Alberto Boerger (Ed.), *Producción y conservación de pasturas y forrajes: Reunión Técnica* (pp. 101-110). <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5923/1/UY.CIAAB.MISC.ELANEA.1969.n.7.pdf>
- Monteverde, E., Oiveyra, M., & Speranza, P. (2022). Could the Dilatata group of *Paspalum* be bred as sexual species? A preliminary assessment. *Grass and Forage Science*, 77(1), 100-106. <https://doi.org/10.1111/gfs.12558>
- Monza, J., & Signorelli, S. (2014). *Manual didáctico de bioquímica*. CSE.
- Moraes Fernandes, M. I. B. D., Barreto, I. L., & Salzano, F. M. (1968). Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum dilatatum*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 10(1), 131-138.
- Moser, L. E., Burson, B. L., & Sollenberger, L. E. (2004). Warm-season (C4) grass overview. En L. E. Moser, B. L. Burson, & L. E. Sollenberger (Eds.), *Warm-season (C4) grasses* (pp. 1-14). American Society of Agronomy.
- Moura, L. (2022). *Potencial de la hibridación interespecífica para el mejoramiento de Paspalum grupo Dilatata* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.

- Mueller, K. E., Tilman, D., Fornara, D. A., & Hobbie, S. E. (2013). Root depth distribution and the diversity-productivity relationship in a long-term grassland experiment. *Ecology*, *94*(4), 787-793.
- Muir, J. P., Pitman, W. D., & Foster, J. L. (2011). Sustainable, low-input, warm-season, grass-legume grassland mixtures: Mission (nearly) impossible? *Grass and Forage Science*, *66*(3), 301-315.
- Nogler, G. A. (1984). Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*: V. Conclusion. *Botanica Helvetica*, *94*(2), 411-422.
- Ott, J. P., & Hartnett, D. C. (2011). Bud production and dynamics of flowering and vegetative tillers in *Andropogon gerardii* (Poaceae): The role of developmental constraints. *American Journal of Botany*, *98*(8), 1293-1298.
- Ouyang, Y., Chen, J., Ding, J., & Zhang, Q. (2009). Advances in the understanding of inter-subspecific hybrid sterility and wide-compatibility in rice. *Chinese Science Bulletin*, *54*(14), 2332-2341.
- Peeters, A., Parente, G., & Le Gall, A. (2006). Temperate legumes: Key-species for sustainable temperate mixtures. En J. Lloveras, A. González-Rodríguez, O. Vázquez-Yañez, J. Piñeiro, O. Santamaría, L. Olea, & M. J. Poblaciones (Eds.), *Sustainable grassland productivity: Proceedings of the 21st General Meeting of the European Grassland Federation*. Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (pp. 205-221). SEEP.
- Picasso, V. D., Brummer, E. C., Liebman, M., Dixon, P. M., & Wilsey, B. J. (2008). Crop species diversity affects productivity and weed suppression in perennial polycultures under two management strategies. *Crop Science*, *48*(1), 331-342. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.04.0225>
- Pizarro, E. A. (2002). Potencial forrajero del género *Paspalum*. *Pasturas tropicales*, *22*(1), 38-46.
- Quarin, C. L., & Caponio, I. (1995). Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasypleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. *International Journal of Plant Sciences*, *156*(2), 232-235.
- Quarin, C. L., & Norrmann, G. A. (1990). Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. *Botanical Gazette*, *151*(3), 366-369.
- Quintans, I. (2013). *Determinación de la producción, estacionalidad y calidad de forraje en una colección de pasto miel (Paspalum dilatatum Poir.)* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- Ríos, A., & Giménez, A. (1992). Ecofisiología de malezas. *Revista INIA de Investigaciones Agronómicas*, *1*(2), 157-166
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/8844/1/15630031207141423.pdf>

- Rodríguez, O. (2010). *Caracterización morfológica de clones recombinantes de Paspalum dilatatum Poir.* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- Rosengurtt, B. (1943). *Estudios sobre praderas naturales del Uruguay: 3ª. Contribución.* Universidad de la República.
- Rosengurtt, B. (1946). *Estudio sobre praderas naturales del Uruguay: 5ª. Contribución.* Universidad de la República.
- Rosengurtt, B. (1979). *Tablas de comportamiento de las especies de plantas de campos naturales en el Uruguay.* División Publicaciones y Ediciones.
- Rosengurtt, B., Arrillaga de Maffei, B. R., & Izaguirre de Artucio, P. (1970). *Gramíneas uruguayas.* Universidad de la República.
- Rosso, V. C., Valls, J. F. M., Quarín, C. L., Speranza, P. R., & Rua, G. H. (2022). New Entities of *Paspalum* and a Synopsis of the Dilatata Group. *Systematic Botany*, 47(1), 125-139.
<https://doi.org/10.1600/036364422X16442668423437>
- Rowley, J. A., Tunnicliffe, C. G., & Taylor, A. O. (1975). Freezing sensitivity of leaf tissue of C4 grasses. *Functional Plant Biology*, 2(4), 447-451.
- Rua, G. H., Speranza, P. R., Vaio, M., & Arakaki, M. (2010). A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, 288, 227-243.
- Saldanha, S., Viegas, L., & Speranza, P. (2017). Comparación productiva de tres especies de *Paspalum* en Uruguay. En P. Speranza (Ed.), *Utilización y domesticación de gramíneas forrajeras del género Paspalum en Uruguay* (pp. 11-15). INIA.
- Sanderson, M. A., Skinner, R. H., Barker, D. J., Edwards, G. R., Tracy, B. F., & Wedin, D. A. (2004). Plant species diversity and management of temperate forage and grazing land ecosystems. *Crop Science*, 44(4), 1132-1144.
- Sandler, L., & Golic, K. (1985). Segregation distortion in *Drosophila*. *Trends in Genetics*, 1, 181-185.
- Sandler, L., & Novitski, E. (1957). Meiotic drive as an evolutionary force. *The American Naturalist*, 91(857), 105-110.
- Sandro, P. (2014). *Caracterización genotípica y fenotípica de una colección de Paspalum dilatatum ssp. flavescens* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.

- Sandro, P. (2020). *Desarrollo de poblaciones de mapeo para uso y domesticación de recursos fitogenéticos nativos* [Tesis de Maestría]. Universidad de la República.
- Sandro, P., Gutiérrez, L., & Speranza, P. (2019). Distribution of genetic and phenotypic diversity in the autogamous perennial *Paspalum dilatatum* subsp. *flavescens* Roseng., Arrill. & Izag. (Poaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(6), 1205-1216. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00791-9>
- Santiñaque, F. (1979). *Estudios sobre la productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.
- Savidan, Y. (1987). La apomixia de las gramíneas forrajeras tropicales y subtropicales. En Instituto de Zootecnia (Ed.), *Anais do Encontro Internacional sobre Melhoramiento genético de Paspalum* (pp. 31-35). Nova Odessa.
- Sawasato, J. T., Dall'Agnol, M., Da Conceição, D. P., Tafernaberi, V., & Klafke, G. B. (2008). Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(8), 1366-1374. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000800005>
- Scheffer-Basso, S. M., Rodrigues, G. L., & Bordignon, M. V. (2002). Caracterização morfofisiológica e anatômica de *Paspalum urvillei* (Steudel). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31, 1674-1679.
- Scheffer-Basso, S. M., Trentini, V., & Baréa, K. (2007). Manejo de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo Virasoro: 2. Produção de sementes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(4), 1022-1028. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982007000500006>
- Schrauf, G. E. (2003). Selección, hibridación interespecífica e ingeniería genética en el mejoramiento de Pasto Miel. *Revista Argentina de Producción Animal*, 23(4), 153-159.
- Schrauf, G. E., Blanco, M. A., Cornaglia, P. S., Deregibus, V. A., Madia, M., Pacheco, M. G., Padilla, J., García, A. M., & Quarín, C. (2003). Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. *Tropical Grasslands*, 37(3), 182-186.
- Schrauf, G. E., Cornaglia, P. S., Deregibus, V. A., & Ríssola, M. G. (1995). Improvement in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds under different pre-conditioning treatments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38(4), 501-509.
- Skerman, P. J., & Riveros, F. (1992). *Gramíneas tropicales*. FAO.

- Sleper, D. A., & Poehlman, J. M. (2006). *Breeding field crops*. Iowa State University Press.
- Sleugh, B., Moore, K. J., George, J. R., & Brummer, E. C. (2000). Binary legume–grass mixtures improve forage yield, quality, and seasonal distribution. *Agronomy Journal*, 92(1), 24-29.
- Souza-Chies, T. T., & Cavalli-Molina, S. (1995). Variability in seed production and germination in Paspalum-Dilatata group (Gramineae). *Revista Brasileira de Biologia*, 55, 127-139.
- Speranza, P. (1996). *Análisis genómico por hibridación ADN:ADN en especies del grupo Dilatata (Paspalum, Gramineae) usando ADN genómico como sonda* [Tesis de Maestría]. Universidad de la República.
- Speranza, P. (2005). Los desafíos de la exploración de los recursos genéticos en plantas apomíticas: Lecciones del caso de Paspalum dilatatum. *Agrociencia (Uruguay)*, 9(1), 73-76.
- Speranza, P. (2009). Evolutionary patterns in the Dilatata group (Paspalum, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 282(1-2), 43-56. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0205-5>
- Speranza, P., & Malosetti, M. (2007). Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of Paspalum (Poaceae). *Plant Genetic Resource*, 5(1), 14-26. <https://doi.org/10.1017/S1479262107192145>
- Szadkowski, E., Eber, F., Huteau, V., Lode, M., Huneau, C., Belcram, H., Coriton, O., Manzanares- Dauleux, M. P., Delourme, R., King, G. J., Chalhoub, B., Jenczewski, E., & Chèvre, A. M. (2010). The first meiosis of resynthesized Brassica napus, a genome blender. *New Phytologist*, 186(1), 102-112.
- Tejera, M., Speranza, P., Astigarraga, L., & Picasso, V. (2016). Forage biomass, soil cover, stability and competition in perennial grass–legume pastures with different Paspalum species. *Grass and Forage Science*, 71(4), 575-583. <https://doi.org/10.1111/gfs.12208>
- Tischler, C. R., & Burson, B. L. (1999). Seed dormancy and germination of dallisgrass, Paspalum dilatatum, stored under differing conditions. *Seed Science and Technology*, 27, 263-272.
- Urry, L. (2014). Genetics. En J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, & R. B. Jackson (Eds.), *Campbell Biology* (10ª ed., pp. 251-333). Pearson.

- Vaio, M., Mazzella, C., Guerra, M., & Speranza, P. (2019). Effects of the diploidisation process upon the 5S and 35S rDNA sequences in the allopolyploid species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Australian Journal of Botany*, 67(7), 521-530.
<https://doi.org/10.1071/BT18236>
- Vaio, M., Mazzella, C., Porro, V., Speranza, P., López-Carro, B., Estramil, E., & Folle, G. A. (2007). Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Systematics and Evolution*, 265(1-2), 109-121. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0506-x>
- Valls, J. F. M., Boldrini, I. I., Longhi-Wagner, H. M., & Miotto, S. T. (2009). O patrimônio florístico dos Campos: Potencialidades de uso e a conservação de seus recursos genéticos. En V. De Patta Pillar, S. C. Müller, Z. M. S. Castilhos, & A. V. A. Jacques (Eds.), *Campos Sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade* (pp. 139-198). Ministério do Meio Ambiente.
- Valls, J. F. M., & Pozzobon, M. T. (1987). Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. En Instituto de Zootecnia (Ed.), *Anais do Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de Paspalum* (pp. 15-21). Nova Odessa.
- Vélez-Gavilán, J., & Thompson, J. P. (2018). *Paspalum urvillei* (Vasey Grass). CABI.
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.109621>
- Venuto, B. C., Burson, B. L., Hussey, M. A., Redfearn, D. D., Wyatt, W. E., & Brown, L. P. (2003). Forage yield, nutritive value, and grazing tolerance of dailisgrass biotypes. *Crop Science*, 43(1), 295-301.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2003.2950>
- West, S. H., & Marousky, F. (1989). Mechanism of dormancy in Pensacola Bahiagrass. *Crop Science*, 29(3), 787-791.
- Xie, Y., Shen, R., Chen, L., & Liu, Y. G. (2019). Molecular mechanisms of hybrid sterility in rice. *Science China Life Sciences*, 62, 737-743.
- Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N., & McCouch, S. R. (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics*, 253(5), 535-545.
- Zuloaga, F., & Morrone, O. (2005). Revisión de las Especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay, y Uruguay). *Economic Botany*, 59(3), 304-304.