

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

DISEÑO Y TRANSFERENCIA DE MICROSATÉLITES EN LOS
TETRAPLOIDES SEXUALES DEL GRUPO DILATATA DE *PASPALUM*
(POACEAE)

por

María Inés REBOLLO PANUNCIO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO

URUGUAY

2017

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. PhD. Pablo Speranza

Lic. PhD. Magdalena Vaio

Ing. Agr. PhD. Clara Pritsch

Lic. MSc. Silvia Garaycochea

Fecha: 28 de diciembre de 2017

Autor:

María Inés Rebollo Panuncio

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por acompañarme siempre, especialmente a mis padres, a Cecilia y a Andrés el apoyo incondicional.

A Pablo y a Magdalena por todo lo que me enseñaron, por hacer posible este trabajo y por tenerme confianza y paciencia.

A todos los del LEDP, por generar un ambiente tan enriquecedor para mi desarrollo personal y profesional, especialmente a Pablo Sandro por la ayuda en el laboratorio y a todos los chicos de la mesa de Crosa por el apoyo.

A los buenos compañeros y docentes que encontré e hicieron de esta carrera algo muy disfrutable.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VIII
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
A. <u>MICROSATÉLITES</u>	2
1. <u>Introducción</u>	2
2. <u>Tipos de repeticiones y otras definiciones</u>	3
3. <u>Función de los microsatélites</u>	3
4. <u>Evolución y variabilidad de los microsatélites</u>	4
a. Ciclo de vida	4
b. Los modelos de mutación y factores relacionados con la tasa de mutación	6
5. <u>Diseño, ajuste y transferibilidad de microsatélites</u>	7
a. Métodos para diseñar microsatélites.....	8
b. Ajuste de microsatélites.....	9
c. Transferencia.....	9
6. <u>Usos y prevalencia de los microsatélites</u>	10
a. Usos	10
b. Prevalencia.....	11
c. Microsatélites y SNPs: ventajas, desventajas y para qué son más útiles unos u otros.....	11
7. <u>Análisis e interpretación de la información generada con microsatélites</u>	14

a.	Detección de polimorfismos	14
b.	Cuidados, precauciones, contras	14
B.	PASPALUM	16
1.	<u>Introducción</u>	16
2.	<u><i>Paspalum dilatatum</i></u>	16
3.	<u>Los tetraploides del grupo Dilatata de <i>Paspalum</i></u>	18
a.	<i>Paspalum urvillei</i>	18
b.	Flavescens	19
c.	Virasoro	19
d.	Vacaria	20
e.	<i>Paspalum dasypleurum</i>	20
f.	Origen y diferenciación	20
g.	Microsatélites disponibles para estos materiales	21
III.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
A.	SECUENCIAS	26
B.	MATERIAL VEGETAL	23
C.	MÉTODOS	27
1.	<u>Secuenciación, identificación y diseño de marcadores</u>	27
2.	<u>Validación de los marcadores</u>	27
a.	Análisis de la segregación de los marcadores	28
b.	Extracción de ADN y protocolo de amplificación de los marcadores	28
IV.	<u>RESULTADOS</u>	31
A.	SECUENCIACIÓN Y ENSAMBLAJE	31
B.	BÚSQUEDA DE MICROSATÉLITES y ELECCIÓN DE CEBADORES	31

C.	ÉXITO DE AMPLIFICACIÓN	33
D.	INTERPRETACIÓN	34
E.	POLIMORFISMO EN EL PANEL DE AMPLIFICACIÓN Y ELECCIÓN DE MARCADORES PARA AMPLIFICACIÓN EN EL PANEL DE VARIABILIDAD	36
F.	AMPLIFICACIÓN Y POLIMORFISMO EN EL PANEL DE VARIABILIDAD	36
G.	ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN.....	43
V.	<u>DISCUSIÓN</u>	44
A.	DISTRIBUCIÓN DE MICROSATÉLITES EN LOS GENOMAS DE LAS PLANTAS	44
B.	DISEÑO A PARTIR DE SECUENCIACIÓN: ENSAMBLAJE	44
C.	ÉXITO DE AMPLIFICACIÓN	45
D.	POLIMORFISMO Y TRANSFERENCIA	45
1.	<u>Ciclo de vida de los microsatélites</u>	46
E.	FACTORES QUE AFECTAN LA VARIACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES	47
1.	<u>Largo de la repetición</u>	47
2.	<u>Largo de la unidad de repetición</u>	47
3.	<u>Características propias del <i>taxon</i></u>	48
F.	UTILIDAD.....	48
G.	LOS TSGDP	49
1.	<u>Posibles sesgos del material vegetal</u>	50
VI.	<u>CONCLUSIONES</u>	52
VII.	<u>RESUMEN</u>	53
VIII.	<u>SUMMARY</u>	54
IX.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	55

X. ANEXOS70

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Identificación y origen del material vegetal del género <i>Paspalum</i> utilizado .	24
2. Número de lecturas y cobertura producto de la secuenciación por <i>taxon</i> ...	26
3. Integración de <i>taxa</i> de <i>Paspalum</i> en paneles 1 y 2 para control de amplificación de microsatélites de la serie Pur y Pdva y de la serie Pdvi y Pdfl, respectivamente	28
4. Individuos de los distintos <i>taxa</i> del género <i>Paspalum</i> utilizados en el panel de variabilidad	30
5. Resultados de filtrado y ensamblaje a partir de la información de secuencias genómicas disponibles para cada <i>taxon</i> de <i>Paspalum</i>	31
6. Repeticiones totales, mayores o iguales a 35 y 30 pb y número de pares de cebadores elegidos por <i>taxon</i>	32
7. Número de cebadores evaluados, amplificados y éxito de amplificación por serie y total.....	33
8. Resultados del análisis de la segregación de cada marcador en la población segregante de la cruce de un <i>Flavescens</i> y un <i>Virasoro</i>	43
Figura No.	
1. Mapa de distribución de los materiales de los diferentes <i>taxa</i> utilizados.....	23
2. Distribución relativa de los tipos de repeticiones remanentes luego de aplicar un proceso de selección basado en criterios sobre características del microsatélite y de las secuencias flanqueantes por serie de marcadores	33
3. Representación gráfica de los resultados de la amplificación de los pares de cebadores diseñados en el panel de amplificación por serie y <i>taxon</i>	34
4. Genotipos multilocus de cuatro marcadores que amplificaron dos <i>loci</i> en el panel de amplificación.....	35
5. Distribución de niveles de riqueza alélica en el panel de amplificación en cada locus por serie y <i>taxon</i>	37

6. Variabilidad alélica de cada marcador en el panel de variabilidad por <i>taxon</i>	38
7. Heterocigosis observada (H_o) e Índice de contenido de polimorfismo (PIC) para todos los marcadores según <i>taxon</i>	39
8. Número de marcadores con rangos de amplificación no solapantes entre las diferentes combinaciones de <i>taxa</i>	40
9. Desvío del número de repeticiones promedio, máximo y mínimo de los alelos del panel de variabilidad respecto al número de repeticiones del individuo sobre el que se diseñó el marcador para la especie focal (A) y para todos los tetraploides (B)	41
10. Distribución del Índice de contenido de polimorfismo (PIC) de los marcadores amplificados en los tetraploides del panel de variabilidad según el largo de la unidad de la repetición	42
11. Frecuencia de repetición en función del índice de contenido de polimorfismo en los tetraploides	42

I. INTRODUCCIÓN

La incorporación de una gramínea estival perenne a las pasturas sembradas aportaría a la intensificación sostenible de los sistemas pastoriles del país ya que daría resiliencia y estabilidad ecológica, entre otros servicios ecosistémicos. La especie nativa con mayor potencial para cumplir ese rol es *Paspalum dilatatum* Poir. (Dall’Agnol y Gomes, 1987). Diversas investigaciones nacionales concluyeron que su incorporación mejoraría la producción estacional estival de las pasturas sembradas sin generar competencia con las otras especies constituyentes de la pastura resultando en una producción significativamente mayor y más uniforme durante el año (Costa, 2015). Sin embargo, tiene algunas limitantes para su domesticación y adopción, y por ser pentaploide y apomíctica varios intentos de mejoramiento genético no tuvieron el éxito esperado.

Paspalum dilatatum pertenece al grupo Dilatata, que representa un complejo aloploiploide de especies, donde existen cinco formas tetraploides sexuales que no presentan las limitantes del biotipo común de *P. dilatatum*. Estos tetraploides sexuales del grupo Dilatata de *Paspalum* (TSGDP) presentan una amplia variabilidad para características de interés agronómico y se podrían hibridar entre sí para generar cultígenos adaptados a diversas situaciones productivas utilizando métodos de mejoramiento convencional (Speranza, 2009).

La aplicación exitosa y eficiente del mejoramiento genético de los TSGDP requiere de un alto grado de información sobre la diversidad presente en cada uno de ellos. Por este motivo, es fundamental contar con herramientas para poder estudiar el alcance de la diversidad presente en cada uno de ellos. Los marcadores moleculares tipo microsatélites son una de las herramientas que permite este tipo de estudio. Sin embargo, al momento existen muy pocos marcadores de este tipo disponibles para estos materiales.

El presente trabajo tiene como objetivo general, desarrollar marcadores microsatélites, una herramienta tecnológica que permita estudios de diversidad y la aplicación de metodologías utilizadas en cultivos mayores a programas de hibridación y retrocruza entre los TSGDP. El objetivo específico es diseñar cebadores para la amplificación de microsatélites altamente informativos, transferibles entre los 5 *taxa* TSGDP y evaluar su polimorfismo y herencia.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. MICROSATÉLITES

1. Introducción

Un marcador molecular se define como un sitio específico del genoma representado por un segmento particular del ADN que es representativo de diferencias a nivel del genoma entre distintos organismos (Agarwal et al., 2008). Los microsatélites, también conocidos como SSRs (Simple Sequence Repeats = repeticiones de secuencias simples) o STRs (Short Tandem Repeats = repeticiones de secuencias cortas en tándem) corresponden a un tipo de secuencia repetida cuyo motivo de repetición son secuencias cortas, variables en largo, cuya unidad de repetición varía entre uno y seis nucleótidos. El marcador molecular de tipo microsatélite representa el sitio o locus donde se encuentra dicho motivo microsatélite y las secuencias flanqueantes al mismo, a partir de las cuales se diseñan los cebadores que permiten la amplificación del locus (Merritt et al., 2015). Los microsatélites muestran altos niveles de polimorfismo (Hoshino et al. 2012, Putman y Carbone 2014, Hodel et al. 2016), tanto inter como intra específico (Gao et al., 2013) debido a su alta tasa de mutación, la cual varía entre 10^{-2} y 10^{-6} eventos de mutación por *locus* por generación (Schlötterer 2000, Li et al. 2002). Esta tasa de mutación es significativamente mayor a la de las sustituciones nucleotídicas del genoma entero en eucariotas que es de aproximadamente 10^{-9} eventos de mutación por *locus* por generación (Li et al., 2002). La inestabilidad de los microsatélites se ve reflejada en cambios en el número de la unidad de repetición (Li et al. 2002, Gao et al. 2013), lo que altera su largo y los convierte en marcadores.

Los microsatélites son uno de los componentes más variables del genoma y están extensa y universalmente distribuidos en eucariotas, tanto en regiones codificantes como no codificantes (Hoshino et al. 2012, Hodel et al. 2016). En plantas, representan el 0,85 % del genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh y el 1,5 - 7,5 % del genoma nuclear de *Zea mays* L. (maíz), *Triticum aestivum* L. (trigo), *Hordeum vulgare* L. (cebada), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (sorgo) y *Oryza sativa* L. (arroz, Gao et al., 2013). Su frecuencia en estos organismos está inversamente relacionada con el tamaño del genoma (Kalia et al., 2011). Los microsatélites están presentes tanto en regiones nucleares, como en los genomas cloroplástico (Provan et al., 2001) y mitocondrial (Merritt et al., 2015) y constituyen en promedio el 4,5 y 3,5 % respectivamente en cereales como el arroz, el trigo, el maíz y el sorgo (Gao et al., 2013). Además de su distribución en todo el genoma, otras de las

características de los microsatélites que permiten su amplio uso como marcadores moleculares son en general: 1) la amplificación de un solo *locus* y la co-dominancia, es decir, el hecho de que evidencien la heterocigosis (Merritt et al., 2015); 2) la amplificación fácil por PCR (Polimerase Chain Reaction = reacción en cadena de la polimerasa) a partir de pequeñas cantidades de ADN ya que ni el método ni el equipamiento necesario son muy complejos y 1 μ l de ADN es suficiente; 3) que sean especie-específicos por disminuir enormemente las posibilidades de contaminación (Selkoe y Toonen, 2006); 4) que su detección sea fácil y de bajo costo, cercana a US\$ 1 por muestra (Hoshino et al., 2012); 5) que sean fácilmente reproducibles (Agarwal et al. 2008, Kalia et al. 2011) y 6) que se hereden de forma mendeliana (Sankhla y Malik, 2015), lo que los hace marcadores altamente confiables.

2. Tipos de repeticiones y otras definiciones

Se llama unidad de repetición a la composición de nucleótidos de la secuencia repetida del microsatélite. Esta unidad puede ser descripta por las bases que la componen o simplemente por su largo. En base a este, los microsatélites se clasifican en mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos y hexanucleótidos: (por ejemplo: $(T)_n$, $(TA)_n$, $(CGG)_n$, $(GAAT)_n$, $(GATTC)_n$, $(CCGGTA)_n$, respectivamente). Las repeticiones pueden ocurrir en diferentes arreglos, frecuentemente referidas como tipos de repetición. Estas pueden ser: repeticiones perfectas (por ejemplo: $(CA)_n$ o $(GTAG)_n$); repeticiones compuestas, formadas por dos o más juegos de repeticiones perfectas sucesivas (por ejemplo: $(AT)_n(GTC)_n$); y repeticiones imperfectas, que contienen una secuencia no repetitiva entre dos o más repeticiones perfectas o compuestas (por ejemplo: $(TC)_nCTAG(CCG)_n$). El número de veces (n) en que aparece la unidad es conocido como la frecuencia de repetición y multiplicando la frecuencia de repetición por el largo de la unidad de repetición, se obtiene el largo de la repetición (Merritt et al., 2015).

3. Función putativa de los microsatélites

Por mucho tiempo, los microsatélites fueron vistos como ADN “basura” y su variación considerada selectivamente neutra (Gao et al., 2013). Sin embargo, existe evidencia de alelos de microsatélites localizados tanto en regiones codificantes como no codificantes que han sido objeto de selección natural (Kashi y King, 2006). Por otro lado, se ha demostrado que el número de repeticiones de un microsatélite puede afectar la función génica de maneras diversas (Kashi y King, 2006). Algunos microsatélites afectan particularmente la función génica por codificar aminoácidos al encontrarse en regiones codificantes (Ananda et al., 2012) mientras que otros no modifican la estructura

de la proteína directamente por localizarse en intrones o en otros sitios no codificantes pero se ha demostrado su efecto en la regulación de la expresión génica (Kashi y King, 2006). Los microsatélites también pueden afectar la constitución de la estructura del ADN (Gao et al., 2013), del ARN, y el largo de regiones regulatorias, afectando, entre otras cosas, la unión de factores de transcripción (Grover y Sharma, 2011). Adicionalmente, la conservación de microsatélites y de unidades de repetición particulares sugiere que algunos microsatélites juegan un rol fundamental para el organismo (Gao et al., 2013). Por otro lado, los microsatélites han sido reportados como íntimamente asociados a elementos transponibles (ET) como los retrotransposones (Ramsay et al., 1999) o transposones (Roorkiwal et al., 2009) en plantas. Esta cercana relación de los microsatélites a los ET sugiere que pueden estar involucrados en la alteración funcional de los genes y en la variación fenotípica de las plantas (Gao et al., 2013). Por otro lado, Sreenu et al. (2007) encontraron en bacterias que las regiones ricas en microsatélites también alojaban genes de respuesta a estrés y factores de virulencia. Toda variable genómica que rutinariamente afecte la función génica seguramente tenga un rol evolutivo; la inestabilidad de los microsatélites puede ser indirectamente ventajosa al aportar variación con mínima carga genética lo que puede ser de potencial significancia adaptativa (Kashi y King, 2006).

4. Evolución y variabilidad de los microsatélites

a. Ciclo de vida

Puede considerarse que los microsatélites tienen un ciclo de vida que incluye vida embrionaria y nacimiento (origen), crecimiento, decaimiento, muerte (Gao et al., 2013) e incluso resurrección (Buschiazzo y Gemmell, 2006). Este ciclo de vida es complejo y requiere largos tiempos evolutivos (Grover y Sharma, 2011) en el que deben de ocurrir, aunque aún sean desconocidos, mecanismos de ajuste para asegurar un balance entre las diferentes etapas (Hoshino et al., 2012).

En cuanto al origen de los microsatélites, de acuerdo a lo revisado por Hoshino et al. (2012), estos se formarían básicamente a partir de dos posibles mecanismos: 1) formación *de novo* como consecuencia de la creación de un proto-microsatélite, es decir una región muy corta de repeticiones en tándem originada a partir de eventos de sustitución o de *indels* (Grover y Sharma, 2011) y 2) adopción, es decir, surgen desde otras regiones genómicas vía elementos transponibles. Estos mecanismos no son excluyentes y el proceso parece no ser al azar, existiendo un balance entre los mecanismos que promueven y los que evitan su inicio (Buschiazzo y Gemmell, 2006).

Actualmente, han sido propuestos dos mecanismos de mutación y crecimiento: 1) recombinación desigual durante la meiosis y 2) deslizamiento en la replicación (Ellegreen, 2004). El primer mecanismo consiste en el intercambio de unidades de repetición entre cromosomas homólogos (Hoshino et al., 2012). De esta forma no solo se generarían cambios drásticos, como la ganancia o pérdida de grandes números de repeticiones, sino también polimorfismos menores y similitud entre microsatélites de diferentes *loci* (Gao et al., 2013). Esta teoría se basa en que la frecuencia de los microsatélites en regiones de alta recombinación es más del doble que en otras regiones (Grover y Sharma, 2011). Sin embargo, algunos autores (Trecó y Arnheim, 1986) sostienen que es más probable que estas secuencias repetidas estén involucradas en la recombinación en lugar de que sean una consecuencia directa de ella. Apoyando esta posición, no se han encontrado diferencias en la tasa de mutación entre cromosomas autosómicos y los cromosomas sexuales de tipo Y, que no sufren recombinación (Ellegreen, 2004). Por otro lado, el segundo mecanismo se desarrolla durante la replicación del ADN, donde ocurriría un desalineamiento entre la hebra molde y la complementaria que está siendo sintetizada lo que provocaría que según en cuál hebra se haya formado el bucle, la resultante tenga más o menos repeticiones que la que le dio origen (Hoshino et al. 2012, Gao et al. 2013). Este fenómeno puede provocar que en el proceso de las miles de repeticiones que tienen lugar entre varias generaciones, se amplifique o contraiga el número de repeticiones (Gao et al., 2013), siendo este mecanismo el mayormente observado en este tipo de secuencias (Buschiazzo y Gemmell 2006, Hoshino et al. 2012, Gao et al. 2013, Hodel et al. 2016).

La expansión de los alelos largos parece estar restringida a pocas decenas de repeticiones (Buschiazzo y Gemmell, 2006). Kruglyak et al. (1998) propusieron que el crecimiento de este tipo de secuencias llega a un límite superior cuando el deslizamiento de la polimerasa es dificultado por imperfecciones en el arreglo de las repeticiones, momento a partir del cual se dice que el *locus* comienza a “decaer”. Eventualmente, la acumulación de interrupciones rompe el patrón de la repetición y da lugar a secuencias únicas que incluyen únicamente segmentos de la repetición original y se considera entonces que el microsatélite “murió” (Buschiazzo y Gemmell, 2006). Por otro lado, la eliminación de microsatélites es un evento genómico común que frecuentemente ocurre durante la reorganización del genoma, proceso que ocurre en general para todas las regiones redundantes no codificantes y particularmente en plantas la poliploidización es un evento que puede inducir este proceso (Leitch y Bennet 2004, Feldamn y Levy 2012).

b. Modelos de mutación y factores relacionados con la tasa de mutación

Se han desarrollado varios modelos que intentan explicar la mutación de los microsatélites, entre los que se destacan los siguientes: 1) modelo de alelos infinitos, 2) modelo de los k-alelos y 3) modelo paso a paso. El primero propone que cada mutación resulta en la creación de un nuevo alelo, diferente de cualquier otro existente previamente. El segundo establece que hay un número k de alelos posibles y que cada uno tiene una probabilidad constante de mutar hacia cualquiera de los otros k-1 estados. El tercer modelo asume que cada mutación crea un nuevo alelo a partir de la adición o eliminación de una unidad de repetición por lo que permite trazar relaciones de parentesco entre los alelos (Hoshino et al., 2012).

El curso y la tasa de mutación de los microsatélites es altamente afectada por diversos factores. Por un lado, la tasa de mutación varía enormemente entre *loci* e incluso entre alelos del mismo *locus* dependiendo de características particulares de la secuencia que son propias de la naturaleza del microsatélite (Buschiazzo y Gemmell 2006, Hoshino et al. 2012). Microsatélites con mayores largos promedio resultan en mayores niveles de variación genética (Ellegreen 2004, Merritt et al. 2015). Esto se debe a que la tasa de mutación se incrementa a medida que aumenta el número de repeticiones (Gao et al., 2009) y se ha reportado que esta relación es exponencial en lugar de lineal (Putman y Carbone, 2014). Gao et al. (2009) determinaron que se necesita un mínimo de ocho bases nucleotídicas para que ocurran mutaciones por deslizamiento de la polimerasa. El largo de la unidad de repetición también parece afectar la tasa de mutación. Merritt et al. (2015) encontraron una correlación negativa entre el largo de la unidad de la repetición y el número promedio de alelos por *locus* (A), heterocigosis esperada (H_e) y heterocigosis observada (H_o), lo que apoya la teoría de que un mayor polimorfismo es generalmente encontrado en motivos de repetición cortos por tener más facilidad para deslizarse durante la replicación (Ellegreen, 2004). Repeticiones compuestas por dos nucleótidos tienen la mayor tasa de mutación, seguidos por las repeticiones de tres y cuatro nucleótidos (Buschiazzo y Gemmell 2006, Hoshino et al. 2012). Como consecuencia de esto, los dinucleótidos han mostrado significativamente mayor H_e que cualquier otro largo de la unidad de repetición (Merritt et al., 2015). Otro factor que afecta la tasa de mutación entre *loci* es la composición nucleotídica de la unidad de repetición (Buschiazzo y Gemmell, 2006) ya que algunas tienen mayor propensión a formar estructuras secundarias y alterar la estructura del ADN (Hoshino et al., 2012). En *Arabidopsis thaliana*, Marriage et al. (2009) encontraron que las repeticiones perfectas de adenina (A) y timina (T) tenían la mayor tasa de mutación ($2,03 \times 10^3$ por alelo por generación), seguidas por las de citosina (C) y T con una tasa intermedia ($3,31 \times 10^4$) y que las repeticiones

de tipo C y A tenían la menor tasa (4.96×10^5). El tipo de repetición es otro factor de variación interlocus (Buschiazzo y Gemmell, 2006). Las mutaciones puntuales y otros tipos de interrupciones en la repetición reducen la tasa de mutación ya que dividen la repetición original en dos unidades más cortas, aumentando la estabilidad del *locus* (Hoshino et al., 2012), dirigiéndolo hacia el “decaimiento” como microsatélite. Las repeticiones perfectas como grupo muestran significativamente mayores niveles de A y He que las repeticiones imperfectas (Merritt et al., 2015) y no es de extrañarse que la mayoría de los estudios en evolución de microsatélites se hayan focalizado justamente en repeticiones perfectas (Buschiazzo y Gemmell, 2006).

Adicionalmente, existe evidencia de que la variación de los microsatélites es afectada por la composición nucleotídica (contenido de GC) del genoma huésped (Tian et al., 2011). También se ha visto que la variación es menor en regiones codificantes que en regiones no codificantes excepto para trinucleótidos y hexanucleótidos (Gao et al., 2013). Por otro lado, la composición genómica de la secuencia flanqueante, la presencia de otro microsatélite vecino (Udupa et al., 2004), el contenido de GC de la secuencia o la cercanía a islas CpG (Brock et al., 1999), también determina cuánto va a mutar un microsatélite. El contexto biológico del individuo juega también un rol determinante en la tasa de mutación de los microsatélites ya que se ha demostrado que esta puede estar influenciada por diversos factores ambientales (Li et al., 2000), algunos de los cuales afectan la eficiencia del sistema de reparación durante la replicación lo que tiene un efecto directo sobre la tasa de mutación de los microsatélites (Strand et al., 1993). En otro orden, características propias del taxón, fruto de su evolución, son la base de la heterogeneidad en la distribución de la tasa de mutación en los genomas de eucariotas (Buschiazzo y Gemmell, 2006). Entre estas características se destacan el modo de reproducción, la tasa metabólica, y la adaptación selectiva como los factores que más afectan las tasas de mutación a nivel de especie. Adicionalmente, el estrés causado por la aloploidización está reportado como uno de los posibles factores inductores de la evolución de los microsatélites (Gao et al., 2013).

5. Diseño, ajuste y transferibilidad de microsatélites

El desarrollo de marcadores microsatelites requiere del diseño de un par de secuencias cebadoras correspondientes a cada región flanqueante que guíen la amplificación del *locus* por PCR (Selkoe y Toonen, 2006).

a. Métodos para desarrollar marcadores microsatélites

Tradicionalmente, el proceso de aislamiento de microsatélites involucró la creación de una biblioteca enriquecida en secuencias que contienen las repeticiones en tándem. Esta biblioteca se forma a partir de la unión de segmentos de ADN, digeridos con enzimas de restricción, a sondas conteniendo secuencias repetidas de modo que solo se hibridan los fragmentos con secuencias complementarias a la de la sonda. Posteriormente, se aíslan los fragmentos hibridados a la sonda, se amplifican por PCR en base a una secuencia conocida que se ligó con la digestión y se secuencian para el posterior diseño de los cebadores. La naturaleza de los microsatélites obtenidos por este medio está limitada por el paso del enriquecimiento (Hodel et al., 2016) y se pierden varias secuencias en la etapa de clonación (Kalia et al., 2011). Además, esta estrategia consume mucho tiempo, es un proceso económicamente costoso y su rendimiento es bajo, típicamente de entre ocho y 20 *loci* polimórficos por cada 30 a 60 pares de microsatélites testeados (Zalapa et al., 2012).

Actualmente, los métodos de secuenciación de muy alta procesividad conocidos como secuenciación de próxima generación (NGS = Next Generation Sequencing), junto con la reducción de su costo y las herramientas bioinformáticas disponibles proveen una alternativa más fácil, económica y de mayor rendimiento (Hoshino et al. 2012, Senan et al. 2014, Hodel et al. 2016). Con este método no se requiere ninguna elección en cuanto a una repetición en particular (Castoe et al., 2012) pero se deben tomar decisiones respecto a la preparación de la biblioteca, la plataforma de secuenciación (incluyendo el largo de la lectura y la cobertura) y de los programas utilizados para la detección de los marcadores (Hodel et al., 2016). Existen diferentes alternativas de plataformas de secuenciación a utilizar (Hodel et al., 2016) que varían en el largo de la lectura, la cantidad de lecturas obtenidas y la calidad de las mismas. Estas tres características afectan la capacidad de descubrir marcadores microsatélites y su éxito; lecturas más largas, probablemente incluyan las secuencias flanqueantes necesarias para el diseño de los cebadores (Schoebel et al., 2013); más lecturas permitirán mayores posibilidades y si los errores en las secuencias son menores, el éxito del diseño aumentará (Wei et al., 2014). Actualmente, la plataforma Illumina es ideal para este fin (Hodel et al., 2016) y los protocolos publicados por Miller et al. (2013), Andersen y Mills (2014) son algunos de los muchos que se han elaborado en base a este tipo de datos. Durante el desarrollo de microsatélites a partir de datos de NGS, si bien es posible buscar repeticiones y diseñar cebadores directamente sobre las lecturas, es recomendable ensamblarlas previamente para formar secuencias de ADN más largas (“contigs”) de modo de aumentar el largo de la secuencia

disponible en base al consenso de varias lecturas y así aumentar no solo la confianza en la secuencia sino también el espacio para diseñar los cebadores y reducir la redundancia de *loci* (Zalapa et al., 2012). Entre los estudios que concluyen en recomendaciones trascendentes para este método, se destacan las de Wei et al. (2014) que observaron un significativo incremento en la amplificación de los microsatélites controlando la calidad de las secuencias con un abordaje de ventanas deslizantes y la de Hodel et al. (2016) que luego de revisar diferentes buscadores de microsatélites en diferentes conjuntos de datos de Illumina de *Arabidopsis thaliana*, recomiendan el uso de las herramientas MISA o de Phobos en el ambiente del programa Geneious como las mejores opciones.

b. Ajuste de microsatélites

Es importante destacar que la identificación de *loci* potenciales a partir de datos de NGS es apenas el punto de partida para el desarrollo de marcadores informativos (Hodel et al., 2016). De hecho, ahora se considera que el factor limitante para el descubrimiento y desarrollo de estos marcadores es la validación de los *loci* (Wei et al., 2014). Durante el proceso de validación, algunos *loci* tendrán que ser descartados por problemas en la amplificación. Adicionalmente, se deberán testear con pruebas explícitas los alelos nulos, la segregación y la neutralidad de los marcadores (Selkoe y Toonen, 2006).

c. Transferencia

Los cebadores para la amplificación de este tipo de *loci* deben ser diseñados de novo para muchas especies que son estudiadas por primera vez con este tipo de marcadores (Kalia et al., 2011). Sin embargo, existe la posibilidad de transferir los pares de cebadores diseñados en base a secuencias obtenidas de una especie a otra del mismo género o de otros géneros de la misma familia (Hodel et al., 2016). Esto se puede lograr gracias a que las regiones flanqueantes generalmente son conservadas entre especies cercana o incluso lejanamente relacionadas (Gibbons y Rokas, 2009). El éxito de esta transferencia, es decir, su tasa, se corresponderá con la distancia filogenética y con la conservación de secuencias entre las especies bajo estudio (Kalia et al., 2011). A partir de la definición de marcador molecular presentada anteriormente, para considerarse transferido, el marcador debe amplificar y ser polimórfico en la nueva especie a la que se lo aplica.

La principal limitante de la transferencia de microsatélites es el sesgo de descubrimiento. Este ocurre cuando un *locus* es seleccionado en base al mayor largo de alelos en la especie en que fue descubierto y se ve reflejado al

ser transferido a otra especie, donde sus alelos en promedio son menores que en la primera (Li y Kimmel, 2014). Estas observaciones implican que el sesgo de descubrimiento es un factor significativo a la hora de interpretar variación genética interpoblacional con microsatélites cuando estos *loci* fueron elegidos por su polimorfismo en una de las poblaciones que se están comparando. La principal consecuencia del sesgo de descubrimiento es la distorsión de las medidas de diversidad observadas, lo que puede sesgar las conclusiones que se basan en ellas (Li y Kimmel, 2014). A veces, el efecto del sesgo de descubrimiento se cancela o incluso es revertido en base a la tasa de mutación de la población o especie a la que se transfieren los microsatélites. Una tasa de mutación más elevada en la población no objetivo reduce el efecto del sesgo de descubrimiento mientras que una mayor tasa de mutación en la especie focal lo acentúa. Crawford et al. (1998) encontraron tamaños medios más largos de los alelos de microsatélites de ovejas comparados con los de vacas, independientemente del origen de los marcadores y por otro lado, la comparación de microsatélites originados a partir de secuencias de humanos y de chimpancés, ha mostrado consistentemente más unidades de repetición en humanos (Cooper et al., 1998). Adicionalmente, una de las razones propuestas por Cooper et al. (1998) para este fenómeno es que la mutación de los microsatélites de poblaciones tan grandes y expandidas como la de los humanos respecto a los chimpancés se ve acentuada por la mayor incidencia de heterocigosis lo que le da inestabilidad y mayores posibilidades de mutación al *locus*.

6. Usos y prevalencia de los microsatélites

a. Usos

Entre los usos de los microsatélites se destaca la identificación de individuos, clones o cultivares (Selkoe y Toonen 2006, Hoshino et al. 2012, Putman y Carbone 2014), identificación de parentales (Selkoe 2006, Putman y Carbone 2014, Merritt et al. 2015, Hodel et al. 2016), evaluación de similitud/ semejanza, relaciones o distancias genéticas entre individuos o *taxa* relacionados (Kalia et al. 2011, Hodel et al. 2016) y determinaciones del sistema reproductivo de una especie (Merritt et al., 2015). Los microsatélites también tienen diversos usos en genética de poblaciones como por ejemplo en la determinación de la diversidad y estructura genética, niveles de endocría, dirección del flujo génico entre poblaciones, análisis de estructura clonal (Putman y Carbone 2014, Merritt et al. 2015, Hodel et al. 2016), en genética de la conservación (Putman y Carbone 2014, Hodel et al. 2016), estudios evolutivos (Merritt et al., 2015), filogeografía (Hodel et al., 2016) y en el mejoramiento genético por poder asociarse a genes de interés (Gao et al.,

2013) y por ser útiles en la construcción de mapas genéticos de alta densidad (Putman y Carbone 2014, Hodel et al. 2016).

b. Prevalencia

Durante los años 90, en la mayoría de los estudios con marcadores moleculares se empleaban RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs = ADNs polimórficos amplificados al azar) o RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism = polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción). Posteriormente, se comenzaron a utilizar los microsatélites y los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms = polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificados). Los microsatélites son considerados una herramienta muy poderosa para un muy amplio rango de usos (Hodel et al., 2016) y a diferencia de los otros tipos de marcadores anteriormente mencionados, prevalecen y continúan siendo muy utilizados (Gao et al. 2013, Merritt et al. 2015), habiéndose reportado hasta el 2016 aproximadamente 225.000 artículos publicados en base a ellos (Hodel et al., 2016). Si bien son especialmente útiles en especies con pocos recursos disponibles, recientemente se han utilizado en estudios de diversidad genética en cultivos con estudios genómicos muy avanzados (por ejemplo: arroz, maíz, soja y manzana, Hoshino et al., 2012). Sin embargo, los métodos de GBS (Genotyping By Sequencing = genotipado por secuenciación) y RADSeq (Restriction site Associated DNA Sequencing = secuenciación del ADN asociada a sitios de restricción) han crecido en popularidad ya que permiten generar información de miles de *loci* de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms = polimorfismos de un único nucleótido) en simultáneo y a un relativo bajo costo por muestra (Hodel et al., 2016). Algunos autores esperan que dadas sus ventajas, el uso de SNPs domine el campo de la genética de poblaciones en el futuro inmediato sustituyendo a los microsatélites (Putman y Carbone, 2014) aunque otros afirman que aún existen situaciones para las que los microsatélites siguen siendo la opción más adecuada. Actualmente, tanto microsatélites como SNPs son ampliamente utilizados (Hodel et al., 2016).

c. Microsatélites y SNPs: ventajas, desventajas y para qué son más útiles unos u otros

Si bien SNPs y microsatélites tienen usos comunes, sus propiedades son diferentes y surgen de características inherentes a sus procesos de mutación así como a sesgos provenientes de las prácticas de muestreo utilizadas para cada uno de ellos. Esto intensifica las diferencias (Hamblin et al., 2007) y determina que según el caso, unos sean más aptos que otros.

En cuanto a la riqueza alélica, la alta tasa de polimorfismo inherente a los microsatélites determina que esta sea más elevada que la de los SNPs que son bialélicos (Rafalski, 2002), y esto implica que los microsatélites tengan un mayor poder analítico que los SNPs (Putman y Carbone, 2014). Se estima que cada *locus* de microsatélites brinda la información de aproximadamente 10 SNPs (Yu et al., 2009). Otra aproximación a la equivalencia entre unos y otros es que se necesitan $k-1$ veces más marcadores SNPs para alcanzar la exactitud obtenida con un set de microsatélites con k alelos (Hamblin et al., 2007). Hamblin et al. (2007) compararon la capacidad de 88 microsatélites y 847 SNPs de evaluar estructura poblacional de germoplasma de maíz y encontraron que a pesar de que los resultados de ambos marcadores son consistentes, los microsatélites agrupan mejor a los individuos en poblaciones que los SNPs. Yang et al. (2011) afirman también que los microsatélites estiman mejor las relaciones de parentesco que los SNPs. Sin embargo, numerosos autores sostienen que el hecho de que los SNPs brinden menor información se puede solucionar aumentando la cantidad de *loci*, lo que es fácilmente realizable dados los métodos de alto rendimiento con los que se detectan (Hamblin et al. 2007, Yang et al. 2011, Putman y Carbone 2014). Otro factor a tener en cuenta es que se necesitan sólidas bases y amplio conocimiento en bioinformática para trabajar con la gran cantidad de datos que se generan con abordajes de NGS en análisis de SNPs, mientras que la necesidad de habilidades computacionales requeridas para llevar a cabo un análisis con microsatélites es mucho menor (Hodel et al., 2016).

El relativo bajo número de *loci* utilizados en un estudio con microsatélites permite que cada *locus* pueda ser genotipado manualmente, lo que reduce considerablemente las posibilidades de error (Hodel et al., 2016). Sin embargo, con datos de GBS o RADSeq, la validación manual es prácticamente imposible por lo que algunos errores pueden pasar inadvertidos (Davey et al., 2013). Por otro lado, el elevado número de *loci* de SNPs que se pueden obtener con el uso de NGS disminuye las preocupaciones acerca de las señales erróneas que potencialmente puede tener esta tecnología, lo que no ocurre con los microsatélites. En estos últimos el relativo bajo número de *loci* utilizados en general genera que los errores de genotipado puedan provocar efectos muy negativos en el resultado del estudio (Hodel et al., 2016). A pesar de esto, si algún resultado en base a microsatélites es dudoso, se puede repetir fácilmente a diferencia de lo que ocurre con la tecnología de NGS. Por otro lado, los sets de datos de SNPs provenientes de NGS suelen tener enormes cantidades de datos perdidos comparados con los microsatélites. Adicionalmente, estos datos perdidos pueden no estar distribuidos al azar entre los individuos o los *loci* por lo que pueden tener como consecuencia la pérdida de alelos, sesgos genealógicos o subestimación de la diversidad (Huang y Knowles, 2016).

Los microsatélites sufren de un menor sesgo de descubrimiento que los SNPs (Putman y Carbone, 2014). Sin embargo, son más susceptibles a la homoplasia que los SNPs por lo que estos últimos son más adecuados para estudios de asociación (Rafalski, 2002). Por otro lado, en cuanto a características genómicas de la especie focal, la poliploidía puede llegar a ser una gran dificultad para estudios con SNPs ya que todavía existen muchos desafíos para utilizarlos en poliploides (Narum et al., 2013). Adicionalmente, como la cobertura de la secuenciación determina el nivel de datos faltantes, los genomas grandes de algunas plantas, especialmente los poliploides, pueden llevar a que haya baja cobertura (i.e.: muchos datos faltantes) o polimorfismos erróneamente inferidos producto de artefactos (Hodel et al., 2016). Sin embargo, los microsatélites han sido ampliamente utilizados de forma exitosa en un amplio rango de poliploides (Trapnell et al. 2011, Angelo et al. 2014, Deng et al. 2016).

El costo de NGS ha ido en detrimento en los últimos años (Muir et al., 2016) por lo que no está claro cuál es el tipo de marcador más económico ya que esto depende del número de marcadores y de la cantidad de individuos a analizar. Genotipar aproximadamente 96 individuos usando entre 12 y 15 marcadores microsatélites tiene un costo similar al de realizarles GBS o RADSeq (Hodel et al., 2016). Sin embargo, si posteriormente se quieren agregar individuos, el proceso es más fácil y económico con microsatélites ya que los SNPs están asociados con genotipado de gran escala (Hoshino et al., 2012) por lo que sería tan costoso agregar una muestra como agregar 96 (Hodel et al., 2016). Por otro lado, una de las debilidades más citadas de los microsatélites es su alto costo de desarrollo. Sin embargo, los SNPs también tienen un costo de desarrollo elevado (Davey et al., 2011) y la misma tecnología que ha ampliado el uso de los SNPs también ha beneficiado a los microsatélites en su fase de desarrollo (Putman y Carbone, 2014).

Todas estas características de estos tipos de marcadores asociadas al tipo de problema biológico a responder, determina que a la hora decidir qué abordaje seleccionar, se deba considerar entre otras cosas, el presupuesto con el que se cuenta, el tamaño de muestras a incluir en el estudio, la resolución genética requerida y la disponibilidad de recursos genómicos disponibles para el grupo ya que todos estos factores determinan qué tecnología será la más adecuada. En situaciones de presupuesto limitado o dónde el número de individuos a incluir es pequeño, los microsatélites siguen siendo una muy buena opción (Hodel et al., 2016).

7. Análisis e interpretación de la información generada con microsatélites

a. Detección de polimorfismos

El polimorfismo en un marcador microsatélite se debe a diferentes números de repeticiones en tándem, de modo que los diferentes alelos de un *locus* se observan como diferentes largos en el producto de amplificación con los mismos cebadores (Hancock, 2004). Los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio si bien son fáciles de manejar y uno de los protocolos más económicos, no permiten una determinación precisa de estas pequeñas diferencias en los tamaños de los fragmentos. Los geles de poliacrilamida sin embargo, permiten una resolución adecuada y han sido ampliamente utilizados para genotipar microsatélites (Creste, 2001). Sin embargo, la técnica más utilizada actualmente se basa en amplificar los fragmentos con un cebador marcado con fluorescencia (Hoshino et al., 2012).

b. Cuidados, precauciones, contras

Al igual que todos los tipos de marcadores, los microsatélites tienen limitantes, entre las que se destacan los alelos nulos, la homoplasia, y el desequilibrio de ligamiento. Afortunadamente, muchas de las dificultades comunes de los marcadores microsatélites pueden ser evitadas a partir del conocimiento de las mismas y de seleccionarlos cuidadosamente durante el proceso de diseño (Selkoe y Toonen, 2006).

Alelos nulos

La eliminación de un *locus* o mutaciones en el lugar de unión del cebador provocan alelos nulos al impedir la amplificación de al menos uno de los alelos, reduciendo la diversidad genética detectada lo que lleva a estimaciones erróneas de las frecuencias alélicas (Hoshino et al., 2012) o de la diferenciación entre poblaciones (Putman y Carbone, 2014). El re-diseño de cebadores puede ser una solución a este problema (Hoshino et al., 2012). Por otro lado, la amplificación diferencial de alelos de tamaños particulares debido a la naturaleza competitiva de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede llevar a que individuos heterocigotas sean interpretados como homocigotas, lo que recibe el nombre de nulidad parcial (Sankhla y Malik, 2015).

Homoplasia

Se denominan alelos homoplásicos aquellos alelos que son idénticos en estado, es decir, en largo, pero esto no ocurre por linaje (Jarne y Lagoda, 1996) sino que pueden tener diferente secuencia o la misma a partir de diferentes historias evolutivas (Anmarkrud et al., 2008). La homoplasia está asociada a la identificación de los alelos exclusivamente en base al tamaño de los fragmentos que implica asumir que los diferentes alelos difieren únicamente en largo (Selkoe y Toonen, 2006). De esta forma, pasan inadvertidos los cambios en la secuencia que serían detectados si los alelos se secuenciaran (Barthe et al., 2012). La homoplasia es inherente a la alta tasa (Viard et al., 1998) y al modelo de mutación del marcador microsatélite (Estoup et al., 2002). Su consecuencia práctica radica en que alelos diferentes son interpretados como el mismo y se subestima la divergencia real entre poblaciones (Hoshino et al., 2012). La homoplasia depende de factores evolutivos como la tasa de mutación, el tamaño efectivo de la población y del tiempo de divergencia entre poblaciones por lo que se espera que sea más problemática en aplicaciones donde las poblaciones estén lejanamente relacionadas, en especies con grandes tamaños poblacionales o para *loci* con muy altas tasas de mutación (Estoup et al., 2002). Adams et al. (2004) reportan que la homoplasia también está afectada por el tipo de repetición ya que encontraron que era más común en repeticiones compuestas o imperfectas que en repeticiones perfectas por lo que sugieren evitar a las primeras. Sin embargo, Estoup et al. (2002) afirman que la homoplasia no representa un problema significativo en muchos tipos de análisis de genética de poblaciones ya que la gran variabilidad que ofrecen los *loci* de microsatélites muchas veces compensa su evolución homoplásica.

Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento, es decir, la desviación de la asociación al azar de los alelos en la segregación de diferentes *loci*, es especialmente problemática en estudios poblacionales. En consecuencia, resulta muy importante confirmar que los marcadores moleculares a utilizar no estén ligados. Adicionalmente, en estudios de genética de poblaciones es también necesario confirmar que los marcadores presenten segregación mendeliana (Danner et al., 2012). La distorsión de la segregación mendeliana puede ocurrir porque lo que se esté observando sea una amplificación inespecífica o una contaminación o porque el marcador esté ligado a un alelo letal o que en combinación con otros sea deletéreo. Afortunadamente, un análisis de descendencia o las herramientas ofrecidas por algunos programas para analizar microsatélites permiten detectar este problema (Hoshino et al., 2012).

B. PASPALUM

1. Introducción

La disponibilidad de forraje en cantidades suficientes a lo largo del año es uno de los principales problemas de la producción ganadera en Uruguay. La producción del campo natural presenta una marcada estacionalidad, con picos en primavera y otoño y momentos de escasez durante el invierno (Carámbula, 1991). En el caso de las pasturas artificiales, sembradas para suplementar la producción del campo natural (Carámbula, 2002), éstas son dominadas por especies de ciclo invernal. Las malezas estivales ocupan el nicho ecológico vacante disminuyendo la vida útil de las pasturas sembradas (Santiñaque 1979, García 1995). Varios autores (García 1995, Millot 1969, Johnston 1996, Campbell et al. 1999, Volaire et al. 2014, Tejera et al. 2016) proponen incorporar gramíneas estivales perennes a las pasturas sembradas para reducir la invasión de malezas y complementar los ciclos productivos, dando resiliencia y estabilidad ecológica al sistema, aumentando su producción, diversidad y vida útil. Otro de los beneficios de esta incorporación, sería la acumulación de materia orgánica en el suelo, entre otros servicios ecosistémicos, con las ventajas que esto presenta hacia la sustentabilidad del esquema productivo (Durán, 2009). Todo esto aportaría a la intensificación sostenible de los sistemas pastoriles, un objetivo muy presente en la priorización de las líneas de investigación tanto a nivel nacional como internacional (Strassburg et al. 2014, Rao et al. 2015, ANII 2017).

Las forrajeras tropicales exóticas son susceptibles al frío invernal, mientras que el germoplasma nativo de Uruguay daría resultados como mínimo equivalentes a los obtenidos tras décadas de introducción y evaluación de forrajeras exóticas (Dall'Agnol y Gomes, 1987). Afortunadamente, las gramíneas forrajeras nativas constituyen uno de los principales recursos fitogenéticos del Uruguay (del Puerto, 1987) y la especie nativa con mayor potencial para cumplir el rol de mejorar la producción estival de las pasturas sin generar competencia sería *Paspalum dilatatum* Poir. (Dall'Agnol y Gomes, 1987).

2. *Paspalum dilatatum*

Paspalum dilatatum Poir. es una gramínea nativa perenne, introducida en varias regiones templadas del mundo (Caponio y Quarín, 1990), resistente al frío y con ciclo C4 lo que permite alta producción de forraje en verano, el cual ha sido catalogado como "fino" (Rosengurtt, 1979). Su eficiencia en el uso del agua es alta (Orbea y Cauhepe, 1982) y se adapta a un amplio rango de suelos

y condiciones de los mismos, tolerando tanto humedad excesiva como sequías moderadas (Carámbula, 1977), probablemente como consecuencia de su extenso desarrollo radicular (Judd, 1975). Adicionalmente, crece durante un largo período, comenzando tempranamente en la primavera (Quintans, 2013) y siendo de las últimas especies nativas estivales en entrar en reposo en otoño (Carámbula, 1982). Ésta especie fue una de las primeras gramíneas estivales que se intentaron domesticar a nivel mundial (Star y Brooking, 2006) y se considera que tiene un gran potencial de convertirse en una de las especies constituyentes de la oferta de forraje estival de las pasturas sembradas (Dall'Agnol y Gomes, 1987).

Diversas investigaciones nacionales que estudiaron la inclusión de *Paspalum dilatatum* en las pasturas sembradas concluyeron que su incorporación resulta favorable ya que mejora la producción estacional estival sin generar competencia con las otras especies constituyentes de la pastura (Terra 1973, Acosta et al. 1994, García 1995, López 2012, Tejera 2014, Costa 2015), resultando en una producción significativamente mayor y más uniforme durante el año (Santiñaque y Carámbula 1981, López 2012) y con una invasión de malezas claramente inferior en comparación con las mezclas sembradas únicamente con especies invernales (Santiñaque y Carámbula 1981, García 1995). También es destacada la mayor estabilidad del tapiz vegetal durante el verano del primer año de la pastura, una época muy crítica para la misma, gracias a la incorporación de *P. dilatatum* respecto a las mezclas convencionales, logrando una cobertura más homogénea y menos susceptible a las condiciones ambientales severas (Tejera, 2016).

A pesar de sus numerosas ventajas, existen dos grandes limitantes para su domesticación y adopción. Estas son la baja producción de semillas por su susceptibilidad a *Claviceps paspali* y la dormición de las mismas (Skerman y Riveros 1992, Souza-Chies et al. 1995). Además, el biotipo común de *P. dilatatum* es pentaploide y apomíctico (Barshaw, 1958), siendo la apomixis una barrera genética para su mejoramiento (Burson, 1983). Si bien durante décadas y con diferentes métodos, existieron varios intentos de mejoramiento del biotipo común de esta especie, por diversos motivos no tuvieron el éxito esperado (Quarín, 1987). A partir de esto, se plantea la posibilidad de recurrir a otras especies estrechamente emparentadas que no presenten estas limitantes o que sus características reproductivas hagan posible una resolución de las mismas¹.

¹ Speranza, P. 2017. Com. personal.

3. Los tetraploides del grupo Dilatata de *Paspalum*

El género *Paspalum* está representado por 350-400 especies aproximadamente (Clayton y Reinvolve 1986, Zuloaga y Morrone 2005) y tradicionalmente se ha dividido en grupos morfológicos informales (Chase, 1929). *Paspalum dilatatum* pertenece al grupo Dilatata (Valls y Pozzobon, 1987) que representa un complejo aloploiploide de especies, donde además de varias formas apomíticas de origen híbrido, existen cinco tetraploides sexuales con fórmulas genómicas equivalentes IIJJ, *Paspalum dasypleurum* Kunze ex Desv. *P. urvillei* Steud. y *P. dilatatum* subsp. *flavescens* Roseng. Arr. et Izag. que incluye tres biotipos: Flavescens, Vacaria y Virasoro. Estos biotipos no presentan las limitantes del biotipo común de *P. dilatatum*, tienen buena producción de semillas y baja infección por *Claviceps* (Schrauf y Blanco, 2003). Al presentar fórmulas genómicas equivalentes, y alto grado de apareamiento entre sus cromosomas, estos tetraploides sexuales del grupo Dilatata de *Paspalum* (TSGDP) pueden ser hibridados artificialmente (Speranza, 2009) para generar cultígenos adaptados a diversas situaciones productivas utilizando métodos de mejoramiento convencional como los cruzamientos y retrocruzamientos. Este tipo de combinaciones híbridas ya se ha utilizado en varios de los cultivos actuales como son el trigo, la papa, la frutilla y los cítricos, que derivan de una combinación híbrida que sólo se conoce en su forma cultivada (Hancock, 2006). Los TSGDP representan por lo tanto, un acervo genético de enormes dimensiones para el desarrollo de forrajeras estivales (Savidan, 1987).

a. *Paspalum urvillei*

Paspalum urvillei es nativa en Argentina, Brasil y Uruguay pero se comporta como subespontánea en otras zonas templadas (Speranza, 2009), incluso ocurriendo en zonas perturbadas y convirtiéndose en maleza (CABI, 2014). Debido a su amplia distribución, esta especie se superpone con muchos otros de los *taxa* del grupo Dilatata. *P. urvillei* es una planta apetecible como forrajera durante su período vegetativo, mientras que en su etapa reproductiva disminuye la relación hoja-tallo reduciéndose su calidad (Scheffer-Basso et al., 2002). Se destaca por su resistencia a la infección por *Claviceps* (Madina y Schrauf, 1999), y en el año 1990, Caponio y Quarín generaron variabilidad a partir de él, la que posteriormente fue utilizada en el mejoramiento de *P. dilatatum* (Schrauf y Blanco, 2003). 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 (Barreto, 1974) el cual es mayor. Estudios de caracterización molecular y morfológica de la especie han sido realizados en la zona de Rio Grande del Sur en Brasil (Scheffer-Basso et al. 2002, Sawasato et

al. 2008) y también en Uruguay. La evaluación morfológica de una amplia colección de accesiones de *P. urvillei*, representativa del territorio nacional, ha mostrado una gran variación para caracteres morfológicos de importancia agronómica, como la fecha de floración y la morfología de la hoja¹. Mientras que 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.

b. Flavescens

Paspalum dilatatum subsp. *flavescens* biotipo Flavescens (Flavescens) se distribuye en el sur de Uruguay y noreste de la provincia de Buenos Aires en la República Argentina (Rosengurt, 1970). Se diferencia del resto de los biotipos principalmente por la forma de la panoja y el tamaño de la espiguilla. La caracterización primaria de una colección amplia de la especie mostró grandes niveles de variabilidad para caracteres morfológicos de interés agronómico (Sandro, 2014). En ese mismo trabajo se observó que la diversidad genética dentro de las poblaciones en Uruguay se distribuye a lo largo de un gradiente sur-norte, donde la misma disminuye a medida que se avanza hacia el extremo norte de su distribución (Sandro, 2014). Con respecto a la reproducción del biotipo Flavescens, la caracterización molecular del mismo mostró que es altamente autógeno (Speranza, 2009).

c. Virasoro

Paspalum dilatatum subsp. *flavescens* biotipo Virasoro (Virasoro) se distribuye en Argentina, en el área de Gobernador Virasoro y en la región de las Misiones. Se extiende por el río Uruguay hasta la región de "Planalto medio" de Rio Grande del Sur en Brasil (Hickenbick et al., 1992). Este biotipo se diferencia del biotipo Flavescens por presentar espiguillas de mayor tamaño y mayor cantidad de nervaduras en lema y pálea (Caponio y Quarín, 1987). Ha sido objeto de estudio de varios trabajos que mostraron gran variabilidad y potencial para la producción de forraje (Da Costa y Scheffer-Basso 2003a, Da Costa y Scheffer-Basso 2003b, Baréa y Scheffer-Basso 2007) y excelente producción y germinación de semillas (Hickenbick et al. 1992, Souza-Chies y Cavalli-Molina 1995, Baréa y Scheffer-Basso 2007) con menores niveles de dormición que otros biotipos (Glison et al., 2015). Hickenbick et al. (1992) concluyeron que tanto autofecundación como polinización cruzada ocurren en este biotipo en base a análisis con isozimas. Sin embargo, los dos individuos analizados por Speranza (2009) resultaron totalmente homocigotos para 13 *loci* microsatélite, sugiriendo un alto nivel de autogamia. Adicionalmente, tanto Flavescens como

Virasoro muestran anteras y estigmas más cortos que otros biotipos y esta característica es usualmente considerada evidencia morfológica de autogamia (Frankel y Galun 1977, Campbell et al. 1983), lo que sugiere que los mecanismos involucrados en términos reproductivos de ambos biotipos sean similares.

d. Vacaria

Paspalum dilatatum subsp. *flavescens* biotipo Vacaria (Vacaria) es originario de la región de “Campos de Cima da Serra” en la provincia de Rio Grande del Sur y el Planalto Catarinense en Brasil (Valls y Pozzobon, 1987) y presenta gran potencial como productora de forraje (De Patta Pillar et al., 2009). Valls y Pozzobon (1987) reportaron que Vacaria forma híbridos naturales con *P. urvillei* en áreas donde sus distribuciones se solapan, resultando en formas con inflorescencias muy abundantes, porte erecto y espiguillas de dimensiones intermedias, lo que dificulta la identificación de estos como pertenecientes a una u otra especie.

e. *Paspalum dasypleurum*

Paspalum dasypleurum tiene la distribución más austral del grupo; se distribuye en el centro y sur de Chile, y también ocurre ocasionalmente en Argentina, en la provincia de Neuquén (Zuloaga y Morrone, 2005). Quarín y Caponio (1995) estudiaron su citología, comportamiento reproductivo y cruzabilidad con los otros *taxa* 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. En Uruguay ha sido difícil cultivarla a campo¹. 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 autógama (Speranza, 2009).

f. Origen y diferenciación

Burson (1983) propuso que los TSGDP se originaron independientemente a partir de los mismos padres, *Paspalum juergensii* Hack. (JJ) y *P. intermedium* Munro ex Morong & Britton (II) o de especies diploides cercanamente emparentadas, como por ejemplo *P. umbrosum* Trin. (JJ) que está estrechamente emparentado con *P. juergensii*. Sin embargo, Speranza y Malosetti (2007) encontraron un muy alto nivel de identidad plastidial entre ellos, sugiriendo una estrecha base genética para el origen materno lo que sugiere un origen común (Rua et al., 2010). A pesar de esto, los TSGDP son entidades

claramente diferenciadas morfológica y fisiológicamente, posiblemente por cambios genéticos durante su evolución (Burson, 1979) y acentuados por la distribución geográfica alopatrica (Speranza, 2009). La diferenciación genética de los TSGDP es también altamente significativa; el 89% de la variabilidad es asignada entre *taxa* (Speranza, 2009), lo que en suma, evidencia que constituyen distintas unidades.

g. Microsatélites disponibles para estos materiales

La conservación y manejo del germoplasma se basa estrictamente en el conocimiento que se tiene sobre el mismo (Savidan 1987, Mohammadi y Prasanna 2003). Adicionalmente, la aplicación exitosa y eficiente del mejoramiento genético de los TSGDP requiere del mayor grado de información posible sobre la diversidad presente en cada uno de ellos. Por este motivo, es fundamental contar con herramientas para poder estudiar el alcance de la diversidad presente en los TSGDP. Como se expuso anteriormente, los marcadores microsatélites son una herramienta que permite este tipo de estudio. Wang et al. (2006) intentaron transferir SSRs de trigo, maíz y sorgo a *P. vaginatum* Sw. *P. lividum* Trin. ex Schltl. y *P. remotum* J. Rémy y resultó un abordaje poco exitoso ya que de los 130 marcadores que probaron, en promedio lograron amplificar el 61% pero de estos, únicamente el 51% mostró polimorfismo por lo que sólo el 30% fue efectivamente transferido. Lo óptimo es recurrir a marcadores desarrollados directamente sobre entidades estrechamente relacionadas con la especie bajo estudio. Existe un total de 155 marcadores microsatélites diseñados sobre especies de *Paspalum*: 11 sobre *P. atratum* Swallen (Cidade et al., 2010), 32 sobre *P. dilatatum* subsp. *dilatatum* (Giordano et al., 2014), 15 sobre *P. dilatatum* subsp. *flavescens* (Speranza y Malosetti, 2007), 28 sobre *P. notatum* Fluggüé (Cidade et al., 2009, 2013), 25 sobre *P. plicatulum* Michx. (Olivera et al., 2016) y 44 sobre *P. vaginatum* (Liu et al. 1995, Jia et al. 2015). Giordano et al. (2014), Jia et al. (2015) diseñaron los marcadores sobre regiones génicas por lo que estos no cumplen con la condición de ser neutrales y no pueden ser utilizados para estudios de diversidad. Existe escasa información acerca de la caracterización y transferibilidad de todos estos marcadores; muchos no cuentan con datos de transferibilidad hacia ninguna otra especie (Liu et al. 1995, Jia et al. 2015, Giordano et al. 2014) y para otros se reporta la transferibilidad a especies de otros grupos distintos al Dilatata (Cidade et al. 2009, 2010, 2013, Olivera et al. 2016). Adicionalmente, estos últimos autores no reportan la forma de herencia de los marcadores ni cuántos *loci* se amplifican con cada marcador ya que al tratarse de especies poliploides, cada marcador puede amplificar tantos *loci* como genomios diferentes constituyan el genoma de la especie. Únicamente los diseñados por Speranza y Malosetti (2007) son transferidos a todos los TSGDP,

cuentan con información de cuántos *loci* se amplifican por marcador y su herencia fue evaluada por lo que hasta el momento, representan el único set de marcadores confiables para ser usados en los TSGDP. A pesar de esto, no son suficientes para realizar inferencias consistentes (Speranza, 2009) ya que fueron diseñados sobre un solo *taxon* y sufren de sesgo de desarrollo (son desigualmente variables entre los biotipos y especies). Si se contara con marcadores desarrollados sobre cada uno de los materiales en igual proporción, este efecto tal vez podría verse disminuido. El mejor abordaje parece ser concebir los marcadores desde el inicio con el fin de que sean informativos en todos los *taxa* a la vez, lo que implica desarrollarlos sobre cada material y elegirlos desde la primera etapa de selección por cómo varían en todos los materiales objetivo.

Cuadro 1. Identificación y origen del material vegetal del género *Paspalum* utilizado.

Especie o biotipo	Identificación	Accesión	Ubicación
Flavescens 2n = 4x = 40 (IIJJ)	7	7355	R 3, entrada a Trinidad, 100 m antes de la vía, Uruguay
	50	7363	R 8 km 34,3, Uruguay
	57	7364	R 8 km 145, Uruguay
	66	7433	R 11 km 51,7, Uruguay
	68	7434	R1 hacia Riachuelo, Colonia, Uruguay
	79	7470	R 11 km 65,6, Uruguay
	101	7479	R 7 km 149,3, Uruguay
	Pf1s	7218	R 10 km 0,200, Uruguay
	FAr2	PI 508720	Pila, Provincia de Buenos Aires, Argentina
	FAr1	PI 508723	A 25 km este de General Belgrano, Argentina
Vacaria 2n = 4x = 40 (IIJJ)	Vac1	PI 404398	R 116, a 8 km norte de Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil. Híbrido con <i>P. urvillei</i> .
	Vac2	PI 404370	R 116 a 192 km de Vacaria por la al norte de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
	Vac3	PI 404382	R 285, a 10 km este de Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil
	Vac5	PI 404372	Estación Agrícola Experimental, Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil
	Vac6	PI 404434	Camino a Bom Jesus, a 25 km easte de Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil
	Vac7	PI 508689	A 27 km noreste de Sao Jarquim, Santa Catarina, Brasil
	Vac9	PI 404436	Camino a Torres, a 4 km este de Aratinga, Rio Grande do Sul, Brasil
	Vac11	PI 404388	Camino a Nova Prata, a 14 km al sur de Barreto, Rio Grande do Sul, Brasil

Virasoro	V	7207	Gobernador Agr. Valentín Virasoro, Argentina
2n = 4x = 40	340		Vieja terminal de ómnibus en Garruchos, Santo Tomé, Corrientes, Argentina
(IIJJ)	V14806		Paso Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil
	V24352		
<i>P. dasypleurum</i>	331		Valdivia, Chile
2n = 4x = 40	Das3		Gral Lagos, Valdivia, Chile
(IIJJ)	Das2		Jardín Botánico, Valdivia, Chile
	Dil59	PI 202299	Bio-Bio, Chile
<i>P. intermedium</i>	Int2S		R 11 a 66 km N de Resistencia Argentina
2n = 2x = 20	IntV		A 17 km este de Pirane, Formosa, Argentina
(II)	333		
<i>P. umbrosum</i>	19	7666	R 30 km 109,5, Bajada de Pena, Uruguay
2n = 2x = 20	22	7667	R 30 km 108,4, Uruguay
(JJ)	325		R 30, Uruguay
	335		Rivera, Uruguay
	337		Berro y Bushental, Prado, Montevideo, Uruguay.
	338		Departamento Forestal, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay
	341		R 30 km 249, Uruguay
<i>P. urvillei</i>	343		Vieja terminal de ómnibus en Garruchos, Santo Tomé, Corrientes, Argentina
2n = 4x = 40	Urv2	PI 164065	Florianopolis, Santa Catarina, Brasil

(IIJJ)	Urv9	PI 203752	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
	Urv14	PI 462306	R 3 km 551,8, Salto, Uruguay
	Urv16	PI 509009	R 116 a 3 km sur de Canais do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
	Urv17	PI 509010	R 116, a 6 km N del río Pelotas, Santa Catarina, Brasil
	Urv27	7392	Camino a Las Cumbres de La Ballena, Maldonado, Uruguay
	Urv21	PI 509017	A 32 km norte de Villa Montes, Tarija, Bolivia
	Urv19	PI 509013	A 3 km sur de Villa Maria, Villa Nueva, Cordoba, Argentina
	Urv18	PI 509012	R 8 a 162 km oeste de Buenos Aires, Argentina
	Us	7199	R 10 km 0,2, Uruguay

B. SECUENCIAS

Se partió de entre 2 y 4 millones de lecturas obtenidas a partir de la plataforma Illumina Miseq (paired end, 250 pb) de un individuo de *P. urvillei*, Vacaria, Virasoro y Flavescens. Estas lecturas representan una cobertura del genoma de entre el 0,4 y el 0,7 x de cada *taxon* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de lecturas y cobertura producto de la secuenciación por *taxon*.

<i>Taxon</i> Individuo	Flavescens Pf1s	Vacaria Vac5	Virasoro V	<i>P. urvillei</i> US
Número de secuencias	2375112	3963618	1941796	3143222
Tamaño del genoma (Mb)*	1188	1139	1120	1174
Cobertura (x)	0,4	0,7	0,4	0,6

*Vaio et al. (2007).

C. MÉTODOS

1. Secuenciación, identificación y diseño de marcadores

La calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación fue analizada con la herramienta FastQC (Andrews, 2016) en la plataforma usegalaxy.org (Afgan et al., 2016). Posteriormente, se sometieron las secuencias al proceso de remoción de adaptadores y filtrado por calidad con la herramienta Trimmomatic (Bogler et al., 2014) con las opciones TRAILIN = 20, SLIDING WINDOW = 6,20 MINLEN = 50 en la plataforma anteriormente mencionada. Los ensamblajes se realizaron con SPAdes 3.1 (Bankevich et al., 2012) con las opciones `-careful` y `-only-assembler`. La búsqueda de repeticiones de tipo microsatélites se realizó con Phobos (Mayer, 2010) y el diseño de los cebadores con Primer3 (Untergasser et al., 2012), ambos en el ambiente de Geneious R9[®]. Los microsatélites elegidos para diseñar los cebadores fueron perfectos y de al menos 30 pb. Se solicitaron 20 pares de cebadores de entre 18 y 25 pb, con Tm de entre 52 y 57 °C, %GC entre 35 y 75 y que determinen un tamaño del producto de entre 200 y 250 pb. Para seleccionar un solo par de cebadores a partir todos los pares de cebadores posibles, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: se seleccionaron aquellos con al menos 20 pb de distancia a la repetición, sin secuencias repetitivas en el cebador y con los menores valores de *hairpin*, *self dimmer* y *pair dimmer* posibles. Con el fin de eliminar cebadores duplicados, los “contigs” sobre los que se diseñaron fueron mapeados en Geneious R9[®], con la herramienta “Map to Reference”, contra los cebadores diseñados por otros autores y contra los diseñados en este trabajo. A los cebadores iniciadores se les agregó la secuencia del M13 (Boutin-Garnache et al., 2001) y tanto estos como los cebadores reversos fueron sintetizados por Macrogen.

2. Validación de los marcadores

Las parejas de cebadores diseñados se denominaron de acuerdo a la especie focal y constituyen las series: Pur (*P. urvillei*), Pdva (Vacaria) Pdiv (Virasoro) y Pdfl (Flavescens). En una primer instancia, todos los pares de cebadores diseñados se probaron en un panel de amplificación; los marcadores diseñados sobre *P. urvillei* y Vacaria del 1 al 15 se probaron en el panel de amplificación 1 mientras que los diseñados sobre Vacaria del 16 al 19 y los diseñados sobre Virasoro y Flavescens se probaron en el panel de amplificación 2 (Cuadro 3). A partir de los resultados obtenidos en esta instancia, se eligieron los 10 marcadores más informativos de las series de marcadores Pur y Pdva (diseñadas sobre *P. urvillei* y Vacaria respectivamente) para evaluar su variabilidad en un panel de variabilidad (Cuadro 4). Una vez

genotipados los individuos, se calcularon indicadores de riqueza alélica, número promedio de alelos por locus (A), heterocigosis esperada (H_e), heterocigosis observada (H_o), con el complemento para Microsoft Excel GenAlEx 6.3.2 (Peakall y Smouse, 2006, 2012) y PIC con Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007) para cada marcador y *taxon* a los efectos de comparar el grado de polimorfismo y transferibilidad de los mismos.

Cuadro 3. Integración de *taxa* de Paspalum en paneles 1 y 2 para control de amplificación de microsatélites de la serie Pur y Pdva y de la serie Pdvi y Pdfl, respectivamente.

<i>Taxon</i>	Panel 1	Panel 2
Flavescens	Pf1s 79-14	Pf1s FAr1
Vacaria	Vac5-1 Vac11-3	Vac5-1 Vac7-1
Virasoro	V	V V340
<i>P.</i> <i>dasypleurum</i>	331 Das2/3-1	331 Das3-1
<i>P.</i> <i>intermedium</i>	I 333	IntV-1 Int2S-1
<i>P. umbrosum</i>	J19 F6	J22 F6 J337
<i>P. urvillei</i>	US Urv21	US Urv17-1

Denominación de individuos de acuerdo a Cuadro 1.

a. Análisis de la segregación de los marcadores

El análisis de la segregación se realizó en 34 individuos de la F2 del cruzamiento entre un Virasoro y un Flavescens descrito en Speranza y Malosetti (2007). A partir de estos resultados, se calcularon las frecuencias alélicas y se realizó la prueba estadística de χ^2 bajo el modelo 1:2:1.

b. Extracción de ADN y protocolo de amplificación de los marcadores

Las extracciones de ADN se realizaron siguiendo el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1987), Collins y Symons (1992). La amplificación de los

fragmentos se realizó por medio de PCR; la reacción consistió en PCR tampón 1x, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,15 mM, M13 0,40 μ M, cebador iniciador 0,30 μ M, cebador reverso 4,5 μ M, BSA 0,80 μ g, Taq 0,60 U/ μ L, ADN 150 μ g y H_2O hasta completar un volumen de 15 μ L. El ciclo de amplificación para todos los cebadores consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5', 50 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min, seguida por 10 °C de tiempo indefinido hasta el almacenamiento a -20 °C. El producto de amplificación se corrió en un gel de agarosa [1%] a 150 V durante 1 h, teñido posteriormente con bromuro de etidio durante 5' y lavado en agua durante 10 min. Confirmada la amplificación del fragmento objetivo, las muestras fueron acondicionadas y enviadas al servicio de secuenciación del instituto DNA fragment analysis de la universidad de Yale. La lectura y genotipado se realizó con los programas Geneious R9[®] y Peak Scanner[™] Version: 1.0. A las longitudes observadas de los fragmentos se les sustrajo 19 pb que corresponden a la secuencia agregada al cebador iniciador para la marcación fluorescente.

Cuadro 4. Individuos de los distintos *taxa* del género *Paspalum* utilizados en el panel de variabilidad.

<i>P. urvillei</i>	Flavescens	Vacaria	Virasoro	<i>P. dasypleurum</i>	<i>P. intermedium</i>	<i>P. umbrosum</i>
2n = 4x	2n = 4x	2n = 4x	2n = 4x	2n = 4x	2n = 2x	2n = 2x
Urv2-1	7-1	Vac1-1	V*	331	Int2S 5	325
Urv9-1	50-1	Vac2-1	340	Das2	Int2S 7	332
Urv14-1	57-1	Vac3-1	V24352	Das3	Int2S 27 1	335
Urv16-1	66-1	Vac5-1*	V14806	D59-1	Int2S 27 2	337
Urv17-1	68-1	Vac6-1			IntV 1	338
Urv18-1	79-1	Vac7-1			IntV 2	341-1
Urv19-1	101-1	Vac9-1			IntV 4	341-2
Urv27-1	FAr1-1	Vac11-1			IntV 5	19
US*	FAr2-1				IntV 6	22
343	Pf1s*				333	

* Individuos sobre los que se diseñaron marcadores.

IV. RESULTADOS

A. SECUENCIACIÓN Y ENSAMBLAJE

Entre el 82 y el 88 % de las secuencias con las que se contaba cumplieron con los parámetros de calidad establecidos en la herramienta utilizada para el filtrado por calidad. Las lecturas de *Flavescens* fueron las que se descartaron más en este proceso de filtrado mientras que las de los otros *taxa* estuvieron relativamente parejas en términos de calidad. La mediana del tamaño de las secuencias filtradas varió entre 227 y 245. El largo de los ensamblajes logrados fue de entre 40,9 y 115,8 Mb, siendo mínimo para *Virasoro* y máximo para *Vacaria*, con un N50 de entre 718 y 816 pb y representan entre el 3,6 y el 10,2 % del genoma de los *taxa* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de filtrado y ensamblaje a partir de la información de secuencias genómicas disponibles para cada *taxon* de *Paspalum*.

	<i>P. urvillei</i>	<i>Vacaria</i>	<i>Virasoro</i>	<i>Flavescens</i>
Lecturas filtradas	2770004	3433130	1661678	1944692
Lecturas filtradas (%)	88	87	86	82
MT lecturas filtradas (pb)	242	240	227	245
Largo ensamblaje (Mb)	82,0	115,8	40,9	54,8
N50 ensamblaje (pb)	805	816	718	744
% genoma ensamblado	7,0	10,2	3,6	4,6

MT: Mediana del tamaño.

B. BÚSQUEDA DE MICROSATÉLITES Y ELECCIÓN DE CEBADORES

La búsqueda de microsatélites permitió identificar entre 128704 y 372853 sitios con repeticiones para cada *taxon*, que representaron entre el 3,12 y el 3,35 % del ensamblaje. La distribución de los diferentes tipos de repetición fue muy similar en todos los *taxa*. Las repeticiones de tipo trinucleótidos fueron las más abundantes, representando entre el 28,5 y el 32,6 % de los ensamblajes. El segundo tipo de repetición más abundante fueron los pentanucleótidos y mononucleótidos, representando entre el 17,9 y el 18,6 % y entre el 17,9 y el 23,3 % de los ensamblajes respectivamente. Las repeticiones de tetranucleótidos y dinucleótidos fueron las menos abundantes en términos relativos para todos los *taxa*, representando entre el 17,1 y el 17,4 % y entre el 13,2 y 13,9 % de los ensamblajes respectivamente.

A pesar de la gran cantidad de repeticiones encontradas, aquellas que cumplieron con ser mayores a 30 pb fueron entre 63 y 299 según el *taxon*, siendo el valor mínimo el de Virasoro (Cuadro 6). En *P. urvillei*, Vacaria y Flavescens, se encontró un número suficiente de repeticiones mayores a 35 pb, entre 44 y 96, por lo que en estos *taxa* se aplicó ese filtro más restrictivo. En los “contigs” de muchas de las repeticiones que cumplieron con el parámetro del largo, no se contaba con espacio suficiente para diseñar cebadores o el contenido de GC de la secuencia flanqueante no lo permitía. También se descartaron potenciales *loci* por tener otra repetición cerca. De todos los posibles pares de cebadores posibles, se descartó un alto número por complejidad de la secuencia, alto *hairpin*, *self dimer* o *pair dimer*. Se seleccionaron únicamente los pares de cebadores que cumplieron con todos los parámetros de calidad exigidos y estos representaron 19 pares de cebadores sobre Vacaria (Anexo 1), 23 sobre *P. urvillei* (Anexo 2), 20 sobre Virasoro (Anexo 3) y 21 sobre Flavescens (Anexo 4), y se les asignó el prefijo Pdva, Pur, Pdvi y Pdfl respectivamente.

Cuadro 6. Repeticiones totales, mayores o iguales a 35 y 30 pb y número de pares de cebadores elegidos por *taxon*.

	<i>P. urvillei</i>	Vacaria	Virasoro	Flavescens
Repeticiones totales	271351	372853	128704	174391
Repeticiones \geq 35 pb	85	96	29	44
Repeticiones \geq 30 pb	172	229	63	99
Pares de cebadores elegidos	23	19	20	21

En todas las series de marcadores, el tipo de repetición que cumplió con todas las exigencias más representado fueron los dinucleótidos, representando entre el 45 y el 63 % de cada serie; los trinucleótidos representaron entre el 20 y el 29 %; los pentanucleótidos entre el 11 y el 20% y por último los tetranucleótidos entre el 5 y el 17 % (Figura 2). El mapeo de los cebadores diseñados contra los “contigs” mostró una sola coincidencia, entre los cebadores Pur1 y Pdfl41 por lo que este último no fue utilizado.

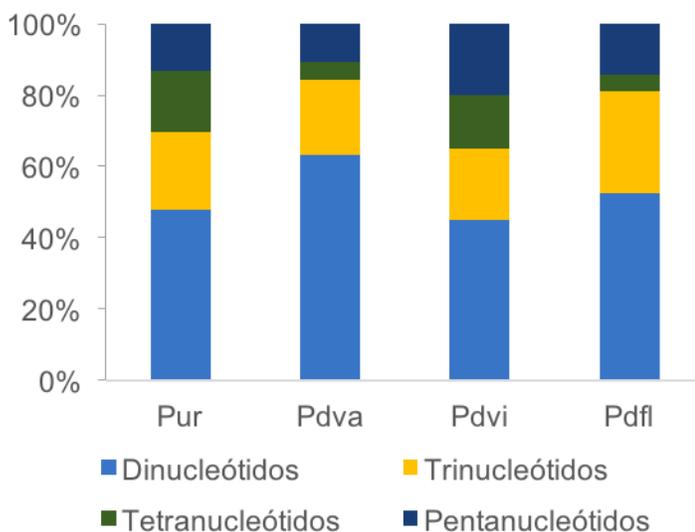


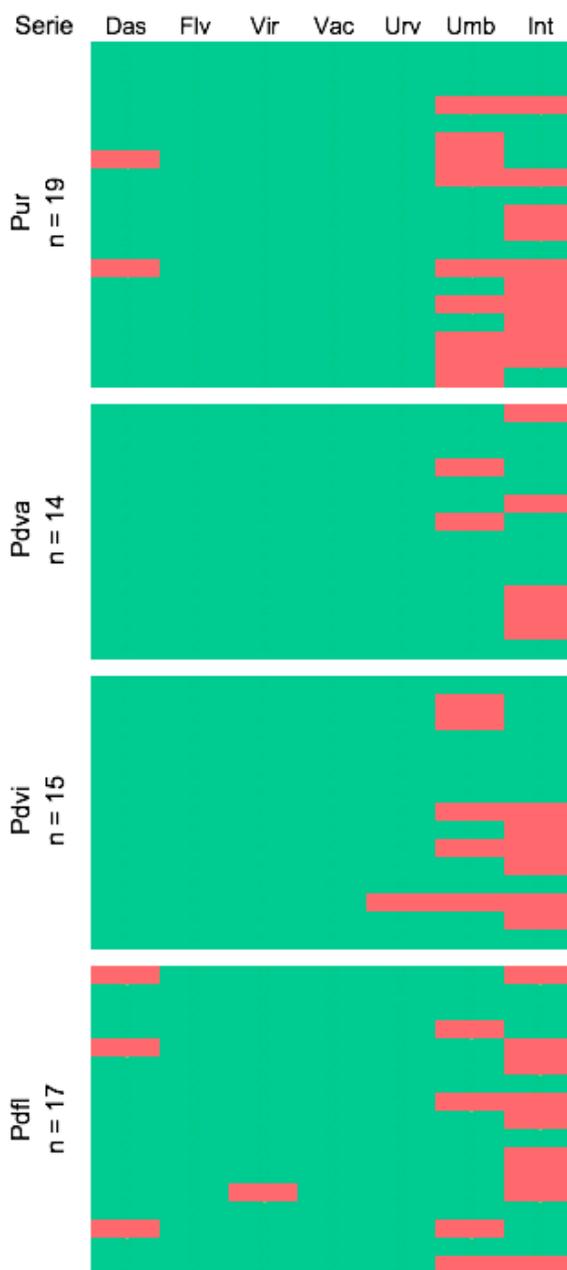
Figura 2. Distribución relativa de los tipos de repeticiones remanentes luego de aplicar un proceso de selección basado en criterios sobre características del microsatélite y de las secuencias flanqueantes por serie de marcadores.

C. ÉXITO DE AMPLIFICACIÓN

A pesar de que se utilizó un solo programa de PCR, de los 82 pares de cebadores diseñados, 65 amplificaron y se pudieron caracterizar en la mayoría de los *taxa*, representando un 79 % de éxito en promedio para todas las series. El éxito de amplificación de cada serie de cebadores varió entre 74 y 85 % (Cuadro 7). La gran mayoría de los pares de cebadores diseñados amplificó en todos los TSGDP, a excepción de seis marcadores que no amplificaron en *P. dasypleurum*, uno que no amplificó en Virasoro y otro que no amplificó en *P. urvillei*. Varios marcadores no amplificaron en uno o en ambos diploides (Figura 3).

Cuadro 7. Número de cebadores evaluados, amplificados y éxito de amplificación por serie y total.

	Pur	Pdva	Pdvi	Pdfl	Total
Número de marcadores evaluados	23	19	20	20	82
Número de marcadores amplificados	19	14	15	17	65
Éxito de amplificación (%)	83	74	75	85	79

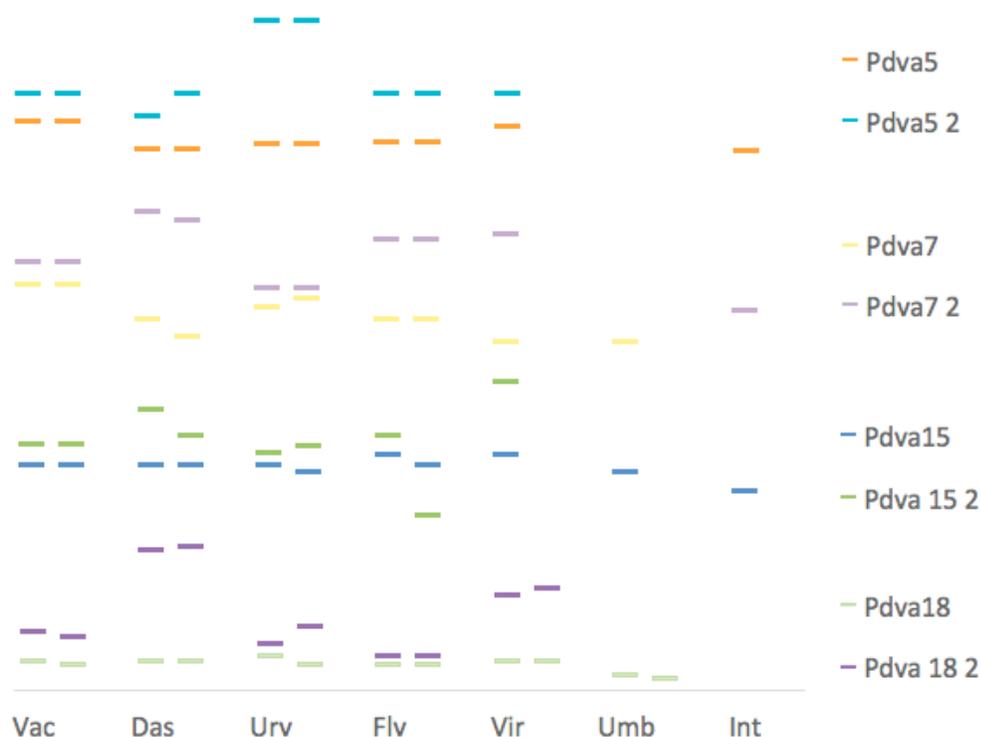


Pur: Marcadores diseñados sobre *Paspalum urvillei*, Pdva: Marcadores diseñados sobre Vacaria, Pdvi Marcadores diseñados sobre Virasoro, Pdfi: Marcadores diseñados sobre Flavescens, Das: *P. dasypleurum*, Flv: Flavescens, Vir: Virasoro, Vac: Vacaria, Urv: *P. urvillei*, Umb: *P. umbrosum*, Int: *P. intermedium*.

Figura 3. Representación gráfica de los resultados de la amplificación de los pares de cebadores diseñados en el panel de amplificación por serie y taxon.

D. INTERPRETACIÓN

Al tratarse los tetraploides de *taxa* autógamos, se espera que el porcentaje de *loci* en estado de heterocigosis sea relativamente bajo. Sin embargo, en 16 pares de cebadores todos los tetraploides mostraron dos productos de amplificación. Esto se interpretó como que se estaban amplificando dos *loci*. De estos 16 pares de cebadores, 1 corresponde a la serie Pur, 5 a la serie Pdva, 4 a la serie Pdvi y 6 a la serie Pdfl. Adicionalmente, un par de cebadores de la serie Pdva amplificó cuatro productos de amplificación en todos los tetraploides, y dos alelos en los diploides, lo que se interpretó como que el marcador amplifica cuatro *loci*. En la mayoría de los pares de cebadores que amplificaban dos *loci*, un *locus* amplificó en *P. umbrosum* y el otro en *P. intermedium* aunque en otros marcadores con dos *loci*, debido a la similitud en el largo de los alelos de estos diploides, se adjudicaron al mismo *locus* (Figura 4).



Vac: Vacaria, Das: *P. dasypleurum*, Urv: *P. urvillei*, Flv: Flavescens, Vir: Virasoro, Umb: *P. umbrosum*, Int: *P. intermedium*.

Figura 4. Genotipos multilocus de cuatro marcadores que amplificaron dos *loci* en el panel de amplificación.

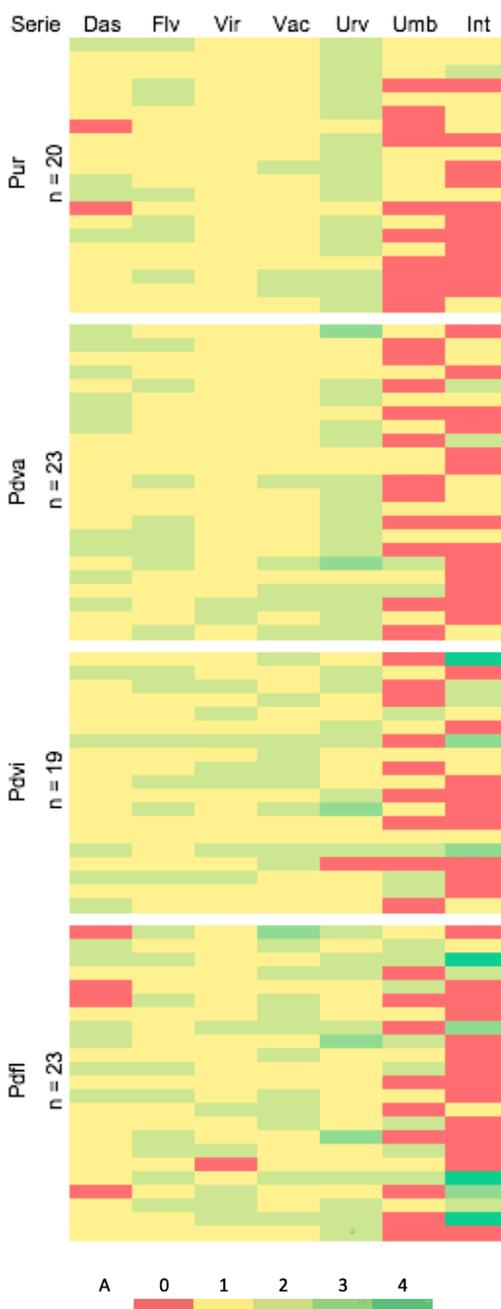
La interpretación se planteó como otro criterio de selección de los pares de cebadores. Se descartaron algunos marcadores cuyo patrón resultó de difícil interpretación, principalmente por amplificar más de un *locus* y presentar alelos muy similares en ambos, lo que dificultaba la asignación de qué alelo correspondía a cada *locus*.

E. POLIMORFISMO EN EL PANEL DE AMPLIFICACIÓN Y ELECCIÓN DE MARCADORES PARA AMPLIFICACIÓN EN EL PANEL DE VARIABILIDAD

Un gran número de marcadores evidenciaron polimorfismo en el panel de amplificación (Figura 5). En base a esta información, a la consistencia en la amplificación y facilidad de genotipado, se eligieron los marcadores 1, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15 y 17 de la serie Pur y los marcadores 2, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 16, 17, 18 de la serie Pdva para ser amplificados en el panel de variabilidad.

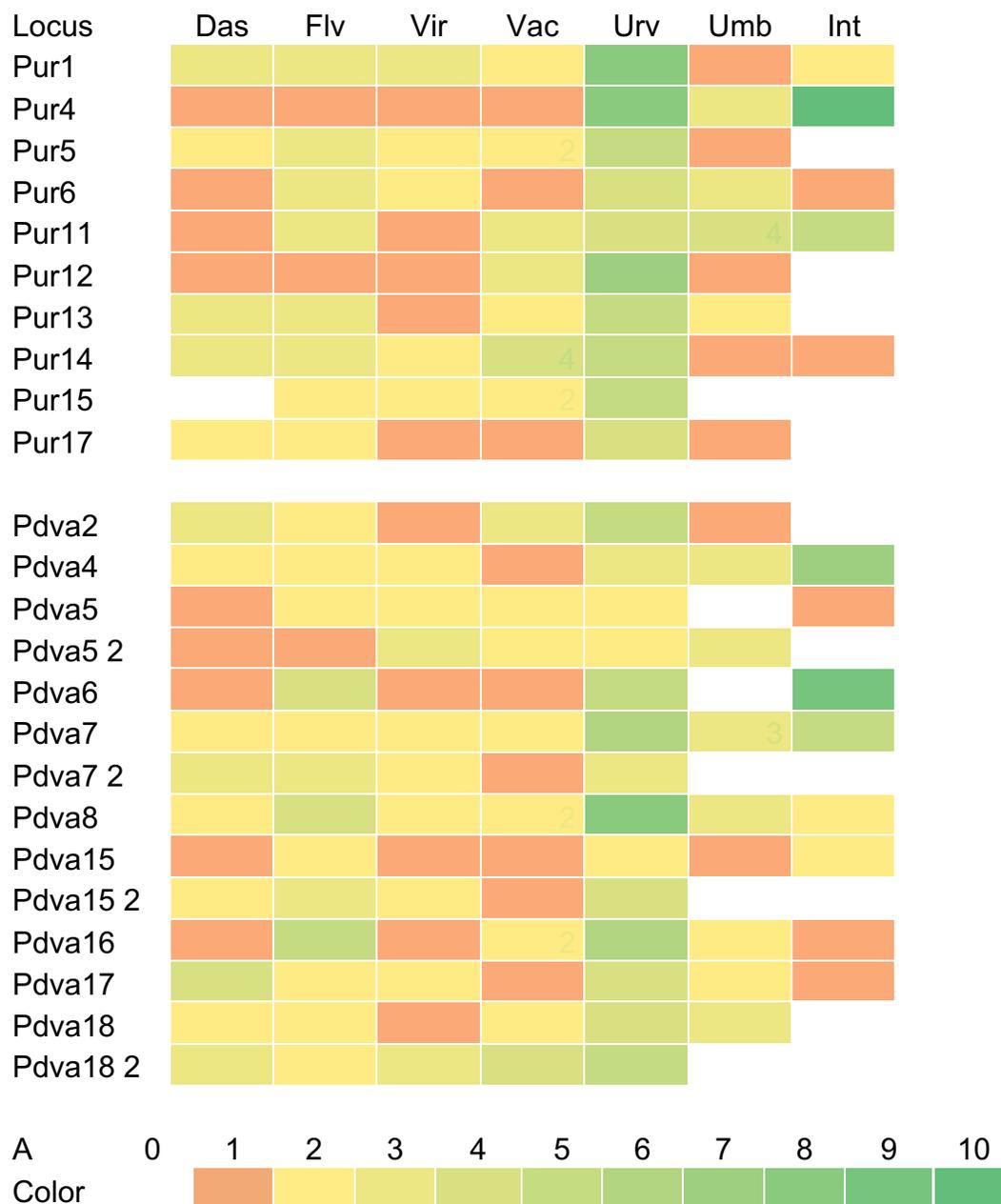
F. AMPLIFICACIÓN Y POLIMORFISMO EN EL PANEL DE VARIABILIDAD

Todos los marcadores seleccionados para esta etapa fueron exitosamente amplificados en el panel de variabilidad. El único marcador seleccionado que no había amplificado en uno de los tetraploides en el panel de amplificación, Pur15 en *P. dasypleurum*, tampoco amplificó en los demás individuos de esta especie del panel de variabilidad. Sin embargo, algunos de los pares de cebadores que no habían amplificado en *P. umbrosum* y en *P. intermedium* en el panel de amplificación sí amplificaron en otros individuos de estas especies mientras otros pares de cebadores siguieron sin amplificar en ellos. En el Anexo 5 se presenta la información de número y rango de alelos, heterocigosis observada y esperada e índice de contenido de polimorfismo para cada marcador por *taxa* bajo estudio. Se detectaron en este panel de variabilidad, nuevas variantes alélicas que no se habían podido apreciar en el panel de amplificación para todos los biotipos y especies (Figura 6). Los mayores números de alelos se alcanzaron para *P. intermedium* y *P. urvillei*. Entre el 57 y el 100 % de los *loci* amplificados en cada *taxon* resultaron polimórficos, con algunas diferencias según la serie; algunos *taxa* mostraron mayor porcentaje de *loci* polimórficos con la serie Pur y otros con la serie Pdva. Para la mayoría de los tetraploides el porcentaje de *loci* polimórficos fue mayor para la serie Pdva a excepción de *Vacaria*, cuyo porcentaje de *loci* polimórficos es ligeramente mayor para la serie Pur. El porcentaje de *loci* polimórficos de *P. urvillei* fue 100 % en ambas series de marcadores. El mayor número de alelos promedio por *taxon* fue el de *P. urvillei* para la serie de marcadores diseñados sobre él. Sin embargo, esta especie fue la que mostró el mayor número de alelos también para la serie de marcadores diseñados sobre *Vacaria* aunque este valor fue menor que el anterior.



Pur: Marcadores diseñados sobre *Paspalum urvillei*, Pdva: Marcadores diseñados sobre Vacaria, Pdvi Marcadores diseñados sobre Virasoro, Pdfl: Marcadores diseñados sobre Flavescens, Das: *P. dasypleurum*, Flv: Flavescens, Vir: Virasoro, Vac: Vacaria, Urv: *P. urvillei*, Umb: *P. umbrosum*, Int: *P. intermedium*, A: número de alelos.

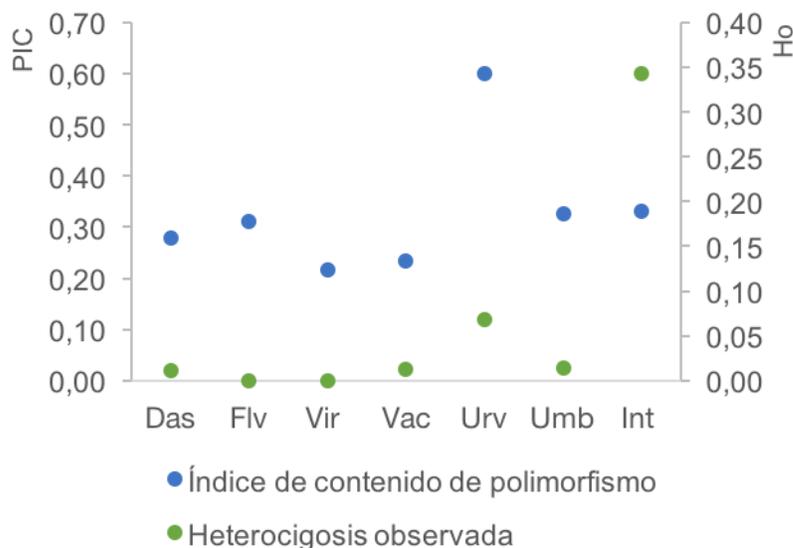
Figura 5. Distribución de niveles de riqueza alélica en el panel de amplificación en cada locus por serie y *taxon*.



Das: *P. dasypleurum*, Flv: *Flavescens*, Vir: *Virasoro*, Vac: *Vacaria*, Urv: *P. urvillei*, Umb: *P. umbrosum*, Int: *P. intermedium*, A: Número de alelos.

Figura 6. Variabilidad alélica de cada marcador en el panel de variabilidad por *taxon*.

P. intermedium y *P. umbrosum* mostraron mayores números de alelos promedio que los tetraploides (excepto por *P. urvillei*) en los marcadores que efectivamente amplificaron sobre ellos. El tetraploide que mostró menor número de alelos promedio fue Virasoro para ambas series de marcadores. La heterocigosis observada promedio para todos los marcadores varió entre 0 y 0,34, siendo menor en Flavescens y Virasoro y mayor en *P. intermedium*. Los índices de contenido de polimorfismo variaron entre 0,22 y 0,60 con los valores extremos para Virasoro y *P. urvillei* respectivamente (Figura 7). El índice de contenido de polimorfismo tuvo una gran dispersión entre y dentro de marcadores y *taxa*. El PIC por marcador varió entre 0,51 y 0,90, siendo el menor correspondiente al marcador Pdva5 locus 1 y el mayor a los marcadores Pdva 7 locus 1 y Pdva 8 con igual valor. El PIC para todos los marcadores y *taxa* a la vez fue de 0,82 y el PIC promedio de todos los marcadores en los tetraploides fue de 0,77.



Das: *P. dasypleurum*, Flv: Flavescens, Vir: Virasoro, Vac: Vacaria, Urv: *P. urvillei*, Umb: *P. umbrosum*, Int: *P. intermedium*.

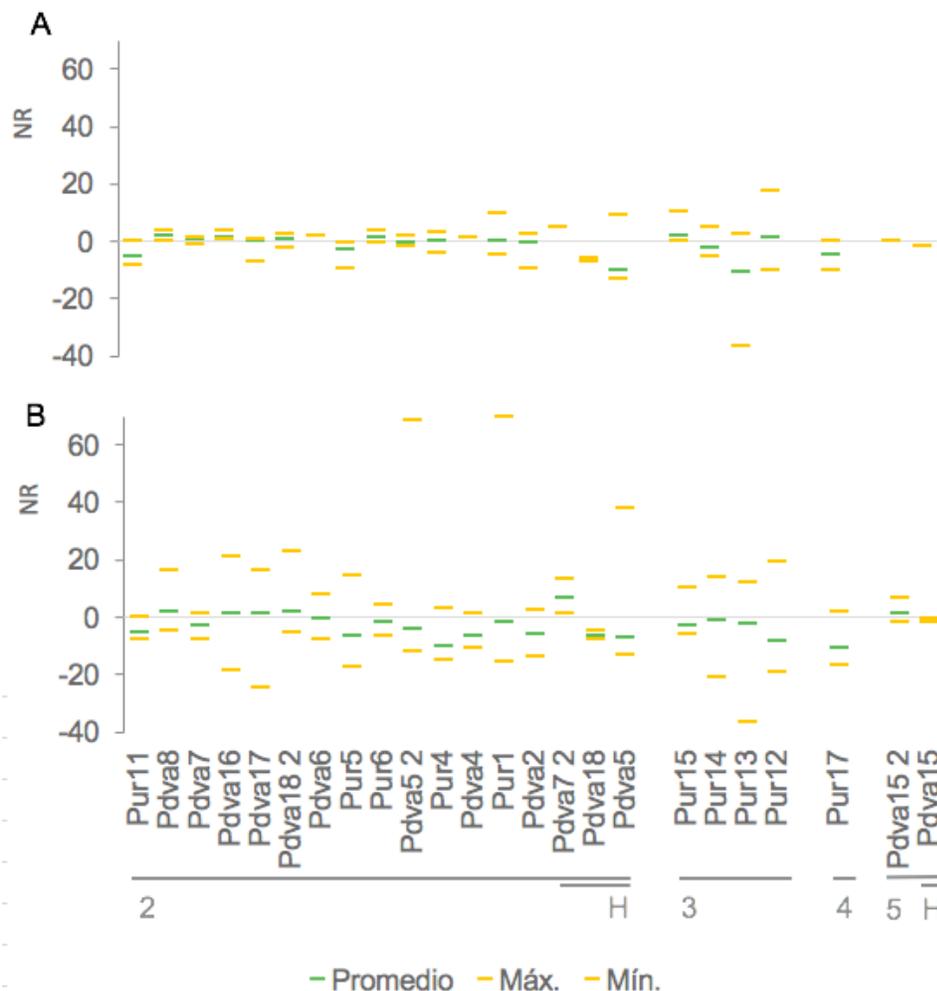
Figura 7. Heterocigosis observada (Ho) e Índice de contenido de polimorfismo (PIC) para todos los marcadores según *taxon*.

Algunos marcadores resultaron sumamente informativos en todo el conjunto de especies a pesar de mostrar una sola variante alélica para algunos *taxa* en el panel de variabilidad porque, en base a la variabilidad observada, su rango de amplificación no se solapa con el de otros biotipos o especies, es decir, muestran un rango *taxon*-específico (Figura 8).

	Urv	Vac	Flv	Das	Vir
Urv		9	11	11	10
Vac	9		13	15	17
Flv	11	13		9	19
Das	11	15	9		18
Vir	10	17	19	18	

Figura 8. Número de marcadores con rangos de amplificación no solapantes entre las diferentes combinaciones de *taxa*.

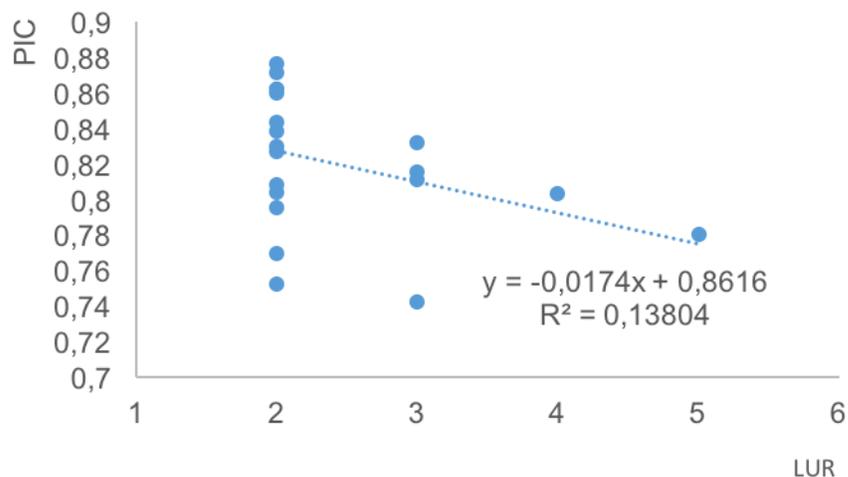
Sin tomar en cuenta los *loci* interpretados como homeólogos al *locus* sobre el que se diseñó el marcador, en todos los casos en la especie sobre la que se desarrollaron los marcadores, la especie focal, se encontraron alelos de tamaños mayores al utilizado para diseñar los cebadores. Sin embargo, el promedio del desvío del número de repeticiones promedio fue de -1 y varió entre -10 y 5 repeticiones debido a que tres marcadores mostraron alelos de longitudes promedio mucho menores al diseñado (Figura 9 A). Si se considera que todos los productos de amplificación de todos los *taxa* son alelos, el promedio del número de repeticiones promedio para todos los marcadores amplificados en el panel de variabilidad en los tetraploides fue de -3 repeticiones con respecto a la secuencia sobre la que fueron diseñados, variando entre -11 y 2 repeticiones (Figura 9 B). Se observaron alelos con hasta 117 pb menos que la secuencia diseñada, y con hasta 144 pb más que el marcador diseñado. En promedio, se encontraron -13 repeticiones menos como mínimo y 16 repeticiones más como máximo respecto al alelo del individuo sobre el que se diseñó el marcador.



NR: Número de Repeticiones, Máx.: Máximo, Mín.: Mínimo, 2: Dinucleótidos, 3: Trinucleótidos, 4: Tetranucleótidos, 5: Pentanucleótidos, H: Loci homeólogos.

Figura 9. Desvío del número de repeticiones promedio, máximo y mínimo de los alelos del panel de variabilidad respecto al número de repeticiones del individuo sobre el que se diseñó el marcador (línea gris) para la especie focal (A) y para todos los tetraploides (B).

Los mayores índices de contenido de polimorfismo en todos los tetraploides a la vez se observó en los marcadores cuya unidad de repetición está compuesta por dos nucleótidos mientras que el menor índice de contenido de polimorfismo se observó para un marcador de tipo trinucleótido. Si bien el muestreo está desbalanceado, se observa una tendencia de mayor índice de contenido de polimorfismo a menor largo de la unidad de repetición (Figura 10).



PIC: Índice de contenido de polimorfismo, LUR: Largo de la unidad de la repetición.

Figura 10. Distribución del Índice de contenido de polimorfismo (PIC) de los marcadores amplificados en los tetraploides del panel de variabilidad según el largo de la unidad de la repetición.

Por otro lado, no se observó una tendencia clara entre el número de repeticiones o el largo de la repetición de la secuencia sobre la que se diseñó el marcador y su índice de contenido de polimorfismo (Figura 11).

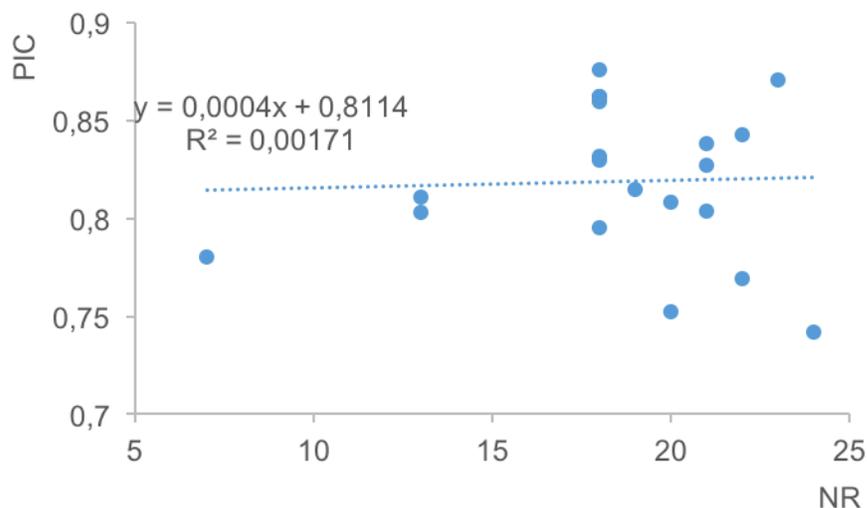


Figura 11. Frecuencia de repetición (número de veces que está la unidad de repetición, NR) en función del índice de contenido de polimorfismo en los tetraploides.

G. ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN

La prueba estadística de χ^2 bajo el modelo 1:2:1 resultó para todos los marcadores en un p-valor mayor a 0,05 a excepción de Pdva6 y Pdva16 por lo que únicamente la segregación de esos marcadores se vio desviada de los patrones de segregación mendeliana esperados (Cuadro 8). En el *locus* 1 del marcador Pdva15 no se pudo evaluar la segregación porque ambos padres presentaron el mismo alelo.

Cuadro 8. Resultados del análisis de la segregación de cada marcador en la población segregante de la cruce de un Flavescens y un Virasoro.

	F	H	V	p-valor	n
Pur1	9	10	11	0,17	30
Pur4	11	10	10	0,14	31
Pur5	9	15	5	0,57	29
Pur6	4	16	11	0,20	31
Pur11	10	12	10	0,37	32
Pur12	8	17	7	0,91	32
Pur13	9	15	8	0,91	32
Pur14	8	17	7	0,91	32
Pur15	5	14	13	0,11	32
Pur17	11	16	5	0,32	32
Pdva2	9	17	6	0,71	32
Pdva4	10	17	5	0,43	32
Pdva5	9	14	8	0,84	31
Pdva6	17	13	2	0,00	32
Pdva7	10	16	4	0,28	30
Pdva7 2	10	9	12	0,06	31
Pdva8	12	13	7	0,26	32
Pdva15	0	32	0	0,00	32
Pdva15 2	6	21	5	0,20	32
Pdva16	17	12	3	0,00	32
Pdva17	11	16	5	0,32	32
Pdva18	5	17	10	0,43	32
Pdva18 2	3	19	10	0,12	32

F: Número de individuos homocigotas para el alelo del padre Flavescens, V: Número de individuos homocigotas para el alelo del padre Virasoro, H: Número de individuos heterocigotas, n: Número de individuos en los que se logró amplificar el marcador para la prueba.

V. DISCUSIÓN

A. DISTRIBUCIÓN DE MICROSATÉLITES EN LOS GENOMAS DE LAS PLANTAS

El porcentaje del ensamblaje que representaron las repeticiones, entre 3,12 y 3,35 %, está dentro del rango de composición de repeticiones de los genomas de plantas revisados por Gao et al. (2013), de entre 0,85 y 7,5. Por otro lado, Kalia et al. (2011) mencionaba que la frecuencia de los microsatélites en un genoma está inversamente relacionada con el tamaño del mismo. Era de esperar entonces, que en estos *taxa* con un genoma de tamaño tan similar, de entre 1120 y 1188 Mb, estén representados en proporciones muy similares por repeticiones microsatélites.

Lawson y Zhang (2006) encontraron patrones de distribución de tipos de microsatélites diferentes en el estudio de dos plantas modelo, una monocotiledónea y otra eudicotiledónea (arroz y *Arabidopsis*). La mayor abundancia de repeticiones de tipo trinucleótido en todos los *taxa* coincide con lo reportado por estos autores para el genoma de la monocotiledónea que estudiaron. Sin embargo, el resto de las abundancias de los otros tipos de repeticiones, mononucleótidos, dinucleótidos, tetranucleótidos y pentanucleótidos, no sigue el mismo patrón que en el arroz, lo que se puede deber a divergencias entre los genomas de esta y las especies de *Paspalum* o al hecho de que la muestra de secuencias utilizada es aún pequeña para ser representativa del genoma de estos *taxa*.

B. DISEÑO A PARTIR DE SECUENCIACIÓN: ENSAMBLAJE

El proceso de ensamblaje realizado resultó positivo en diferentes aspectos: permitió aumentar más de tres veces la mediana del largo de las secuencias disponibles; aportó confianza a la secuencia y, como es discutido por Zalapa et al. (2012), limitó la redundancia de *loci*. Esto resultó en “contigs” de secuencia más confiable que las lecturas sin ensamblar, con espacio suficiente para diseñar cebadores no redundantes que cumplieron con todos los parámetros de calidad exigidos.

A pesar de la baja cobertura del genoma con el que se contaba, y que determinó que el porcentaje del genoma ensamblado, incluyendo las lecturas que quedaron sin ensamblar, no supere el 10 %, se puede afirmar que la información genómica disponible fue suficiente para diseñar el número de marcadores deseado.

C. ÉXITO DE AMPLIFICACIÓN

El éxito de amplificación de los marcadores en el panel de amplificación, en promedio 79 %, es similar al reportado por Sonah et al. (2011), que con una metodología similar obtuvieron un 80% de éxito de amplificación. Es importante destacar que a diferencia de lo realizado por estos últimos autores, en este trabajo todos los pares de cebadores se amplificaron con el mismo programa y para los pares de cebadores que no amplificaron no se probó ajustar la temperatura, metodología que podría haber aumentado el éxito de amplificación que se decidió no adoptar. Teniendo en cuenta esto, se puede afirmar que el porcentaje de éxito es muy bueno para todas las series de marcadores. Este resultado positivo es probable se deba, en una primera instancia al filtrado por calidad de las lecturas, recomendado por Wei et al. (2014) a partir del cual se descartó entre el 13 y el 18 % de las secuencias, y al ensamblaje que brindó mayor confianza a las secuencias. Posterior a esto, los estrictos parámetros exigidos en la etapa de diseño que resultaron en el descarte de un número muy grande de potenciales *loci* y de pares de cebadores también es probable que hayan influenciado positivamente el éxito de amplificación.

D. POLIMORFISMO Y TRANSFERENCIA

Mediante el panel de amplificación 2, se lograron detectar mayores polimorfismos que con el panel de amplificación 1. Esto se debe a que tres de los *taxa* pasaron a tener dos representantes en lugar de uno y a que, específicamente en el caso de *Vacaria*, se determinó que los individuos que se estaban utilizando en el panel de amplificación 1 eran muy similares y no representaban al biotipo de la mejor manera por lo que uno de ellos se sustituyó por otro menos relacionado con los individuos anteriormente utilizados. En el panel de variabilidad, se confirmó el alto nivel de polimorfismo característico de los microsátelites (Hoshino et al. 2012, Putman y Carbone 2014, Hodel et al. 2016). Los valores de PIC fueron diferentes para cada uno de los *taxa* considerados individualmente y variaron entre 0,22 y 0,60. Si asumimos que los fragmentos amplificados en diferentes especies son alélicos, todos los marcadores focales mostraron un PIC mayor a 0,7 en el conjunto de todos los materiales tetraploides analizados. Esta alta capacidad de discriminación y variabilidad será especialmente útil en el análisis de híbridos entre estos cinco *taxa*. En trabajos futuros con estos híbridos, podrá confirmarse la naturaleza alélica de las distintas variables de cada marcador.

Algunos pares de cebadores que en el panel de amplificación no habían amplificado en *P. umbrosum* y en *P. intermedium* sí fueron exitosamente

amplificados en este panel mayor. Esto se debe probablemente a la ocurrencia de alelos nulos, es decir, cambios en la región de unión del cebador en algunos individuos. Afortunadamente, la ampliación de la muestra de cada *taxon* permitió detectar la presencia de varios *loci* en ellos. Este mayor número de representantes también evidenció polimorfismos que no se habían podido apreciar en el panel de amplificación para todos los biotipos y especies, presentando la oportunidad de estimar de una mejor manera la cantidad de información que brindan, y el potencial de uso de los marcadores. Adicionalmente, si bien se priorizaron para seguir adelante los marcadores para los que en el panel de amplificación se observó variabilidad, la amplificación en el panel mayor mostró variabilidad inclusive en *taxa* que parecían ser monomórficos. Por lo tanto, de los marcadores diseñados que amplificaron en el panel de amplificación pero no fueron seleccionados por razones ajenas a la interpretación, hay varios potencialmente útiles para ser utilizados en el futuro. Por otro lado, los polimorfismos observados por *taxon* para ambas series de marcadores evaluados en el panel de variabilidad, Pur y Pdva, fueron similares. En base a esto, se podría afirmar que la metodología de selección de marcadores permitió cumplir con el objetivo de diseñar marcadores transferibles entre los *taxa* y minimizó el sesgo de descubrimiento, principal limitante de la transferencia de microsatélites (Li y Kimmel, 2014).

1. Ciclo de vida de los microsatélites

Si bien se seleccionaron los microsatélites más largos en cada individuo para diseñar cebadores, la gran mayoría de los marcadores mostraron alelos con números de repeticiones mayores en otros individuos. Este mayor número de repeticiones en otros individuos evidencia que la mutación, interpretada como el “crecimiento” del microsatélite, es un proceso que sigue ocurriendo para ese *locus*. En base a esto, se podría concluir que estos microsatélites elegidos en base a estos estrictos criterios de selección, están “vivos” en al menos alguno de estos *taxa*. Respecto a los desvíos mínimos, estos también están ampliamente dispersos, evidenciando que en algunos individuos, es probable que la repetición microsatélite ya no esté presente o se haya reducido a un mínimo. Algunos marcadores mostraron un desvío máximo o mínimo del orden de los 100 pb de diferencia, lo que parece indicar la presencia de un *indel* ya que dada la dinámica del ciclo de vida de este tipo de repeticiones, resulta poco probable que un microsatélite de al menos 35 pb llegue a aumentar 100 más.

E. FACTORES QUE AFECTAN LA VARIACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

1. Largo de la repetición

Todos los marcadores focales mostraron un alto nivel de variación en el conjunto de los tetraploides independientemente del largo de la repetición o del número de unidades. Sin embargo, el largo mínimo es 30 pb, valor que resulta ya muy alto. En base a esto, se confirma que el largo mínimo de la repetición fue suficiente para detectar altos niveles de variación en todos los *loci* seleccionados y que probablemente se podría ser un poco menos estrictos con este parámetro.

Si bien existe un consenso acerca de que microsatélites con mayores largos promedio resultan en mayores niveles de variación genética (Ellegreen 2004, Merritt et al. 2015), en el grupo de marcadores seleccionados no se observó una correlación entre el largo de la repetición y el polimorfismo mostrado. Esto probablemente se deba a que si bien es cierto que la correlación entre largo de la repetición y polimorfismo es positiva, esto ocurre hasta cierto valor, a partir del cual se deja de cumplir. En este caso, incluso las repeticiones más cortas eran largas, ya que el mínimo valor fue de 30 pb, lo que determinó que todas las repeticiones muestren un muy alto valor de variación. Esto coincide con lo establecido por Buschiazzi y Gemmell (2006), quienes establecieron que la expansión de los alelos largos parece estar restringida a pocas decenas de repeticiones. Adicionalmente, Kruglyak et al. (1998) proponen que el crecimiento de este tipo de secuencias llega a un límite superior cuando el deslizamiento de la polimerasa es dificultado por imperfecciones en el arreglo de las repeticiones, momento a partir del cual se dice que el *locus* comienza a “decaer”, lo que parece estar observando en este caso para algunos marcadores.

2. Largo de la unidad de repetición

Respecto al largo de la unidad de repetición, la distribución del tipo de repeticiones mayores a 30 pb apoya la teoría de que repeticiones compuestas por dos nucleótidos tienen la mayor tasa de mutación (Buschiazzi y Gemmell 2006, Hoshino et al. 2012). Es de destacar que contrariamente a la menor riqueza de repeticiones de tipo dinucleótido encontradas en los ensamblajes, estas fueron las más abundantes en el grupo de repeticiones que cumplieron con los parámetros de calidad para el diseño, principalmente el de largo de la secuencia repetida. Esto probablemente se deba a la mayor tasa de mutación inherente a este tipo de repeticiones que determinó que la mayoría de las secuencias mayores a 30 pb sean de ese tipo.

Por otro lado, en coincidencia con los numerosos autores que afirman que generalmente se encuentran mayores polimorfismos en repeticiones más cortas (Ellegreen 2004, Buschiazzo y Gemmell 2006, Hoshino et al. 2012, Merritt et al. 2015), las repeticiones de tipo dinucleótido mostraron los mayores valores de PIC, mientras que los menores se encontraron en las repeticiones más largas, las de cinco nucleótidos. Al igual que habían determinado Merritt et al. (2015), se identificó una correlación negativa entre el largo de la unidad de repetición de los marcadores bajo estudio y su capacidad de brindar información.

3. Características propias del *taxon*

Las heterocigosis observadas en los tetraploides son muy similares a las reportadas por Speranza (2009). Este es el primer reporte de heterocigosis de *P. umbrosum* (0,01), especie reportada como autocompatible.

Se observó que los *taxa* con mayores heterocigosis observadas tenían también un mayor índice de contenido de polimorfismo en promedio. Esto apoya lo observado en otros materiales de que algunas características intrínsecas a la evolución del *taxon* afectan la tasa de mutación de los marcadores microsatélites, como ser el modo de reproducción, la tasa metabólica, y la adaptación selectiva (Buschiazzo y Gemmell 2006, Gao et al. 2013).

Por otro lado, al igual que lo detectado por Cooper et al. (1998) para los microsatélites en humanos diseñados tanto en chimpancés como en humanos y por Crawford et al. (1998) en ovejas con microsatélites diseñados tanto en vacas como en ovejas, *P. urvillei* mostró el mayor número de alelos promedio independientemente del origen del diseño de los marcadores. Esto se puede deber al probable mayor tamaño poblacional y variabilidad de esta especie, fruto de su distribución geográfica más amplia y sumado a esto, a la mayor representatividad de la lista de accesiones utilizadas de este biotipo respecto a otros con menor número de individuos o menos sitios de colecta representados.

F. UTILIDAD

Si bien algunos marcadores siguieron siendo monomórficos para algunos biotipos en el panel de variabilidad, a partir de la variabilidad observada, sus rangos de amplificación no se solapan con los de los otros *taxa*. Esto determina que tengan poder discriminante inter-biotípico e inter-específico y que sean de utilidad para estudios de flujo génico entre estos biotipos y

especies, análisis de híbridos sintéticos inter-biotípicos o construcciones de mapas genéticos inter-biotípicos o inter-específicos.

En este trabajo, se pudieron confirmar muchas de las ventajas de los marcadores microsatélites ampliamente citadas por diversos autores (Selkoe y Toonen 2006, Agarwal et al. 2008, Kalia et al. 2011, Hoshino et al. 2012, Merritt et al. 2015): la amplificación y detección resultó fácil y de bajo costo, se vieron casos de individuos heterocigotas, no se detectó contaminación y los resultados son reproducibles. Contrariamente a lo establecido por Merritt et al. (2015) respecto a que amplifican un solo *locus*, se encontraron marcadores que amplificaron más de uno pero esto se debe a la naturaleza aloploide del material vegetal y no a algo propio del marcador.

Si bien Sankhla y Malik (2015) afirman que se hereden de forma mendeliana, Selkoe y Toonen, 2006 sugieren que se pruebe explícitamente la segregación de los marcadores y en ese proceso se detectaron dos *loci* que no segregan de la forma esperada en la población biparental utilizada. Esta distorsión de la segregación es probablemente fruto de una homocigosis letal y determinaría que esos dos marcadores, Pdva6 y Pdva16, no deban ser utilizados por lo menos en los estudios poblacionales de los biotipos Flaves cens y Virasoro.

G. LOS TSGDP

El porcentaje del ensamblaje que representan las repeticiones fue muy similar entre los TSGDP. También fue muy similar entre los diferentes *taxa*, las abundancias de los tipos de repetición. Ambos resultados apuntan hacia una alta similitud en la composición genómica de los mismos. Adicionalmente, la muy alta tasa de transferencia entre los TSGDP, indica que la conservación de las secuencias genómicas entre ellos es muy alta. Muy pocos marcadores no amplificaron en uno de los tetraploides, probablemente no porque no exista el *locus* sino por mutaciones en la región de unión de los cebadores, siendo *P. dasyleurum* la especie con mayor incidencia de este fenómeno. Una explicación posible a esto es que *P. dasyleurum* sea el *taxon* TSGDP que haya divergido antes en la historia evolutiva de estos materiales o que la aislación al flujo génico debido a su distribución más distante del resto de los *taxa* haya determinado una mayor diferenciación entre este y el resto. Aún no ha sido publicada una filogenia de estos *taxa* que contemple las dificultades de su origen híbrido y permita confirmar o refutar la primera teoría.

Algunos marcadores amplificaron en todos los tetraploides y sólo en uno de los diploides por lo que se asume que ese marcador está presente en el genomio correspondiente a ese diploide. Sin embargo, otros marcadores

amplifican un solo *locus* en los tetraploides pero amplifican en ambos diploides. Si bien en una primera instancia se esperaría que, al amplificar en ambos diploides, los tetraploides muestren dos *loci*, es común que luego de la poliploidización se eliminen regiones redundantes del genoma (Leitch y Bennet 2004, Feldman y Levy 2012), siendo esta tal vez la causa de la falta del segundo *locus*. Por otro lado, la naturaleza alopoliploide de estos materiales, determinó que aproximadamente la cuarta parte de los marcadores amplificaron dos *loci* en los tetraploides (IIJJ) y un solo *locus* en los diploides (II y JJ). Se asume que un *locus* corresponde al genomio I y otro al *locus* homeólogo del genomio J. Estos marcadores, aunque en algunas ocasiones más difíciles de interpretar, resultan muy interesantes por brindar el doble de información que los que amplifican un solo *locus*.

El mapeo de los 155 pares cebadores ya reportados para *Paspalum spp.* (Liu et al. 1995, Speranza y Malosetti, 2007 Cidade et al. 2009, 2010, 2013, Giordano et al. 2014, Jia et al. 2015, Olivera et al. 2016). y los diseñados en este trabajo para las diferentes series contra los “contigs” sobre los que se diseñaron los cebadores permitió descartar un par de cebadores que hubieran amplificado el mismo *locus* que otro par de otra serie, aportando información redundante al análisis. Esto es consecuencia de que estos *taxa* están estrechamente emparentados, por lo que es de esperar que algunas de las secuencias obtenidas se correspondan a regiones homólogas entre ellos. De hecho, en esta homología es que se basa la capacidad de poder transferir los marcadores. Por otro lado, la ausencia de mapeo con los marcadores ya reportados para *Paspalum spp.* muestra que todos los pares de cebadores reportados en el presente trabajo amplifican regiones diferentes a estas por lo que son nuevos marcadores.

1. Posibles sesgos del material vegetal

A pesar de que *Flavescens* está igual de representado que *P. urvillei* en número de individuos estudiados y *Vacaria* está cerca de estar igual representado, estos biotipos, si bien mostraron cerca de un 80 % de *loci* polimórficos, no mostraron altos números de alelos promedio. Esto se puede deber a la menor variabilidad presentes en ellos o a la baja representatividad de la variabilidad presente en el panel. Esto es más probable para *Vacaria* que para *Flavescens* ya que en el primero, se dispuso de todo el material disponible mientras que en el segundo, se seleccionaron los individuos para ser representativos en base al sitio de colecta y a la caracterización morfológica y genotípica reportada por Sandro (2014). Si bien se detectaron valores medios-altos de % de *loci* polimórficos en Virasoro y *P. dasypleurum*, seguramente sus bajos valores de número de alelos por *locus* sí se deban a la baja

representatividad de los 4 individuos con los que se contaba para cada uno de estos *taxa* en el panel de amplificación.

VI. CONCLUSIONES

La metodología utilizada que incluyó el filtrado y ensamblaje de las lecturas y las exigencias en cuanto a estructura de la repetición y secuencia flanqueante resultaron en una alta eficiencia y éxito del proceso de desarrollo de marcadores a partir de información de secuenciación.

A partir de las lecturas de baja cobertura con las que se contaba se desarrollaron al menos 20 marcadores microsatélites nuevos para cada *taxon*, transferibles entre todos ellos y de alta capacidad informativa con índices de contenido de polimorfismo promedio por *taxon* entre 0,22 y 0,60.

Luego del proceso de filtrado por los diferentes parámetros de calidad establecidos, las repeticiones de tipo dinucleótido fueron las más abundantes entre las repeticiones microsatélites más largas detectadas en los TSGDP y también las más informativas.

Al menos a partir de los 30 pb, no existe una correlación entre el número de repeticiones o el largo de la repetición exigidos en la secuencia utilizada para diseñar el marcador y la capacidad informativa de los marcadores resultantes.

La alta transferibilidad de los marcadores entre los TSGDP es congruente con un alto nivel de identidad del genoma nuclear entre estos *taxa*.

Algunos pares de cebadores amplificaron más de un *locus* dada la naturaleza aloploiploide de estos materiales. El hecho de que varios marcadores amplifiquen alternativamente en un diploide II o en el diploide JJ y que los marcadores que amplifican dos *loci* amplifiquen un *locus* en cada diploide, apoya la teoría de que estos TSGDP tienen genomas I y J, emparentados con estos diploides.

Los marcadores producto de este trabajo representan el primer reporte de marcadores desarrollados sobre *Vacaria*, *Virasoro* y *P. urvillei*, son altamente informativos en todos los *taxa* TSGDP y pueden ser utilizados con diversos objetivos, tanto en estudios poblacionales de estos *taxa* como en la domesticación y mejoramiento genético de los mismos.

VII. RESUMEN

Incorporar una gramínea estival perenne a las pasturas sembradas aportaría enormemente a la intensificación sostenible de los sistemas pastoriles del país ya que daría resiliencia y estabilidad ecológica, entre otros servicios ecosistémicos. La especie nativa con mayor potencial para cumplir ese rol es *Paspalum dilatatum* Poir. Sin embargo, tiene limitantes para su domesticación y adopción que por ser alopentaploide y apomíctica no se han podido levantar. El grupo Dilatata de *Paspalum* representa un complejo aloploiploide de especies, donde existen cinco formas tetraploides sexuales que no presentan las limitantes del biotipo común de *P. dilatatum*. Estos tetraploides sexuales del grupo Dilatata de *Paspalum* (TSGDP) presentan una amplia variabilidad para características de interés agronómico y se podrían hibridar entre sí para generar cultígenos adaptados a diversas situaciones productivas utilizando métodos de mejoramiento convencional. El mejoramiento genético de los TSGDP requiere del mayor grado de información posible sobre la diversidad presente en cada uno de ellos para ser exitoso y eficiente. Por este motivo, es fundamental contar con herramientas para estudiar el alcance de la diversidad disponible de cada *taxon* tetraploide. Los marcadores moleculares tipo microsatélites permiten este tipo de estudio y son de uso fácil y económico. Sin embargo, al momento existen muy pocos marcadores de este tipo disponibles para estos materiales, insuficientes para realizar inferencias consistentes. En el presente trabajo se desarrollaron 82 marcadores microsatélites a partir de secuenciación genómica de baja cobertura de cuatro de los TSGDP. Estos se probaron en un panel de amplificación representado por uno o dos individuos de cada TSGDP y dos diploides relacionados, mostrando un éxito de amplificación de 79 %. Los 65 marcadores amplificados representaron 84 *loci* ya que 16 pares de cebadores amplificaron dos *loci*, lo que es de esperar dada la naturaleza aloploiploide de estos materiales y un par de cebadores amplificó cuatro *loci*. La mayoría de los pares de cebadores diseñados amplificó en todos los TSGDP. Se evaluó el polimorfismo y segregación de 20 marcadores, correspondientes a los 10 marcadores diseñados sobre dos de los TSGDP potencialmente más informativos. Los índices de contenido de polimorfismo promedio por *taxon* variaron entre 0,22 y 0,60, lo que evidencia que estos marcadores tienen una alta capacidad informativa. A excepción de dos marcadores, todos segregaron mendelianamente lo que los hace marcadores confiables. Estas herramientas permitirán estudios de diversidad y la aplicación de metodologías utilizadas en cultivos mayores a programas de hibridación y retrocruza entre los TSGDP.

Palabras clave: *Paspalum*; Alotetraploides; Microsatélites; Secuenciación de próxima generación.

VIII. SUMMARY

Incorporating a warm-season perennial grass to forage systems of Uruguay would contribute to their sustainable intensification by improving their resilience and ecologic stability, among other ecosystem services. *Paspalum dilatatum* Poir. is the most promising native species for that purpose. Its domestication and adoption have been limited due to the fact that it is allopolyploid and apomictic. The Dilatata group of *Paspalum* represents an allopolyploid complex of species, which includes five sexual and allotetraploid forms that do not show many of the limitations of *P. dilatatum*. This sexual tetraploids of the Dilatata group of *Paspalum* (STDGP) present wide variability for agronomic traits and as they all have the same genomic formula, they could be hybridized to produce cultigens adapted to different production situations by conventional breeding approaches. A successful and efficient application of plant breeding to the STDGP requires as much information as possible about the diversity present in each one of them. For this reason, it is essential to develop tools to be able to study the diversity available of each tetraploid *taxon*. Microsatellites molecular markers allow this type of study and are easy to use and convenient. However, there are very few available microsatellite markers for these materials, insufficient to make consistent inferences. In the present work, 82 microsatellite markers were developed from low coverage next generation genomic sequences of four of the STDGP. All markers were tested in an amplification panel represented by one or two individuals of each STDGP and two related diploids, showing an amplification success rate of 79%. The 65 amplified markers represented 84 loci since 16 pairs of primers amplified two loci, which is to be expected given the allopolyploid nature of these materials and one pair of primers amplified four loci. The vast majority of pairs of designed primers amplified in all STDGP. Polymorphism and segregation patterns were evaluated for 20 markers, corresponding to the 10 potentially most informative markers designed over two of the STDGP. The average PIC per *taxon* varied among 0.22 and 0.60, which shows that the markers have a high information contents. With the exception of two markers, all segregated in a Mendelian fashion which makes them reliable markers. These tools will allow diversity studies and the application of methodologies used in major crops to hybridization and backcrossing programs among the STDGP.

Key words: *Paspalum*; Allotetraploids; Microsatellites; Next Generation Sequencing.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelkrim, J.; Robertson, B. C.; Stanton, J. A. L.; Gemmell, N. J. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*. 46(3): 185-192.
2. Acosta, G.; Deregibus, V. A.; Zucchini, F. 1994. Inclusión de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir.) en pasturas. *Revista Argentina de Producción Animal*. 14(3): 175-186.
3. Adams, R. I.; Brown, K. M.; Hamilton, M. B. 2004. The impact of microsatellite electromorph size homoplasy on multilocus population structure estimates in a tropical tree (*Corythophora alta*) and an anadromous fish (*Morone saxatilis*). *Molecular Ecology*. 13(9): 2579-2588.
4. Afgan, E.; Baker, D.; van den Beek, M.; Blankenberg, D.; Bouvier, D.; Čech, M.; Chilton, J.; Clements, D.; Coraor, N.; Eberhard, C.; Grüning, B.; Guerler, A.; Hillman-Jackson, J.; Von Kuster, G.; Rasche, E.; Soranzo, N.; Turaga, N.; Taylor, J.; Nekrutenko, A.; Goecks, J. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. (en línea). *Nucleic Acids Research*. 44(W1): W3-W10. Consultado 7 nov. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
5. Agarwal, M.; Shrivastava, N.; Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27(4): 617-631.
6. Ananda, G.; Walsh, E.; Jacob, K. D.; Krasilnikova, M.; Eckert, K. A.; Chiaromonte, F.; Makova, K. D. 2012. Distinct mutational behaviors differentiate short tandem repeats from microsatellites in the human genome. *Genome Biology and Evolution*. 5(3): 606-620.
7. Andersen, J. C.; Mills, N. J. 2014. iMSAT: a novel approach to the development of microsatellite *loci* using barcoded Illumina libraries. *BMC Genomics*. 15: 858-866.
8. Andrews, S. 2016. FastQC A quality control tool for high throughput sequence data. (en línea). Cambridge, Babraham Institute. s.p. Consultado 8 nov. 2017. Disponible en <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

9. Angelo, P. C. da S.; Lira, M. do P. S.; Amado, M. V.; Yamaguishi, A. T.; Silva, G. F.; Porto, J. I. R.; Atroch, A. L. 2014. Microsatellites and the polyploid Guarana plant: diversity under a sea of alleles. *Open Journal of Genetics*. 4(3): 190-201.
10. ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, UY). 2017. Becas de maestría nacionales. Áreas estratégicas, bases 2017. (en línea). Montevideo, Uruguay. 7 p. Consultado 8 nov. 2017. Disponible en <http://www.anii.org.uy/upcms/files/llamados/documentos/bases-pos-nac-2017-1-mae-ae-.pdf>
11. Anmarkrud, J. A.; Kleven, O.; Bachmann, L.; Lifjeld, J. T. 2008. Microsatellite evolution: mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology*. 8(1): 138-147.
12. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.; Lesin, V.; Nikolenko, S.; Pham, S.; Prjibelski, A.; Pyshkin, A.; Sirotkin, A.; Vyahhi, N.; Tesler, G.; Alekseyev, M.; Pevzner, P. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 19(5): 455-477.
13. Baréa, K.; Scheffer-Basso, S.; Dall'Angol, M.; de Oliveira, B. N. 2007. Manejo de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo Virasoro. 1. Produção, composição química e persistência. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36(4): 992-999.
14. Barreto, I. L. 1974. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Porto Alegre, Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 258 p.
15. Barshaw, E.; Forbes, I. 1958. Chromosome numbers and microsporogenesis in Dallisgrass *Paspalum dilatatum* Poir. *Agronomy Journal*. 50: 441-445.
16. Bastías, A; Correa, F; Rojas, P; Almada, R; Muñoz, C; Sagredo, B. 2016. Identification and characterization of microsatellite *loci* in maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stunz) using Next-Generation Sequencing (NGS). (en línea). PLoS ONE 11(7): 1-17. Consultado 26 nov. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159825>

17. Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. (en línea). *Bioinformatics*. 30(15): 2114-2120. Consultado 8 nov. 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
18. Boutin-Garnache, I.; Raposo, M.; Raymond, R.; Deschepper, C. 2001. M13-Tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*. 31: 24-26.
19. Brock, G. J. R.; Anderson, N. H.; Monckton, D. G. 1999. Cis-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Human Molecular Genetics*. 8(6): 1061-1067.
20. Burson, B. 1979. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum* hybrids. *Crop Science*. 19: 534-538.
21. _____. 1983 Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. In: International Grassland Congress (14th., 1981, Lexington, Kentucky). Proceedings. Boulder, Colorado, Westview. pp. 170-173.
22. 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.
23. Buschiazzo, E.; Gemmell, N. J. 2006. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays*. 28(10): 1040-1050.
24. CABI (Commonwealth Agricultural Bureau International, GB). 2014. Invasive species compendium *Paspalum urvillei*. (en línea). Boston, MA. s.p. Consultado 7 nov. 2017. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/datasheet/109621>
25. Campbell, B. D.; Mitchell, N. D.; Field, T. R. O. 1999. Climate profiles of temperate C3 and subtropical C4 species in New Zealand pastures. *New Zealand Journal of Agricultural*. 42(3): 37-41.
26. Caponio, I.; Quarín, C. 1987. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana*. 19: 35-45.

27. _____.; _____. 1990. Intra- and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. *Crop Science*. 30(2): 362-364.
28. Carámbula, M. 1977. Producción y manejo de pasturas sembradas. Montevideo, Hemisferio Sur. 464 p.
29. _____. 1982. *Paspalum dilatatum*, características agronómicas y su rol en las pasturas. *Revista Argentina de Producción Animal*. 2(1): 68-84.
30. _____. 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. Montevideo, INIA. 46 p.
31. _____. 2002. Pasturas y forrajes, potenciales y alternativas para producir forraje. Montevideo, Hemisferio. Sur. t.1, 357 p.
32. Castoe, T. A.; Poole, A. W.; de Koning, A. P. J.; Jones, K. L.; Tomback, D. F.; Oylor-McCance, S. J.; Pollock, D. D. 2012. Rapid microsatellite identification from illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS ONE*. 7(2): 1-10.
33. Chase, A. 1929. North American species of *Paspalum*. Contributions from the US National Herbarium. Washington, USPTO. v. 28, pt. 1, 310 p.
34. Cidade, F. W.; de Souza-Chies, T. T.; Batista, L. A. R.; Dall'agnol, M.; Zucchi, M. I.; Jungmann, L.; Souza, A. P. 2009. Isolation and characterization of microsatellite *loci* in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae). *Conservation Genetics*. 10(6): 1977-1980.
35. _____.; _____.; de Souza, F. H. D.; Batista, L. A. R.; Agnol, M. D.; Valls, J. F. M.; Souza, A. P. 2010. Microsatellite *loci* for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. *American Journal of Botany*. 97(11): e1-e4.
36. _____.; Vigna, B. B.; de Souza, F. H.; Valls, J. F. M.; Dall'Agnol, M.; Zucchi, M. I.; Souza, A. P. 2013. Genetic variation in polyploid forage grass: assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. *BMC Genetics*. 14(50): s.p.
37. Clayton, W. D.; Renvoize, S. A. 1986. Genera Graminum, grasses of the world. London, Royal Botanic Gardens, Kew. 389 p. (Kew Bulletin Additional Series no. 13).

38. Collins, G.; Symons, R. 1992. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Molecular Biology*. 10: 233-235.
39. Costa, N. 2015. Efecto de la incorporación de dos gramíneas perennes estivales en mezclas forrajeras convencionales. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 42 p.
40. Creste, S.; Tulmann, A.; Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 299-306.
41. Da Costa, I.; Scheffer-Basso, S. M. 2003. A caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir . biótipo virasoro e *Festuca arundinacea* Scherb. 1. desenvolvimineto morfologico. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32(5): 1054-1060.
42. Dall'Angol, M.; Gomes, K. E. 1987. Avaliação inicial da produção de materia seca de especies do gênero *Paspalum*. In: Encontro Internacional sobre Melhoramiento Genético de *Paspalum* (1987, Nova Odessa). Anais. Nova Odessa, São Paulo, BR, Instituto de Zootecnia. pp. 51-55.
43. Danner, M. A.; Ribeiro, J. Z.; Zanette, F.; Bittencourt, J. V. M.; Sebbenn, A. M. 2013. Mendelian segregation in eight microsatellite *loci* from hand- and open-pollinated progenies of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). *Silvae Genetica*. 62(2): 18-25.
44. Davey, J. W.; Hohenlohe, P. A.; Etter, P. D.; Boone, J. Q.; Catchen, J. M.; Blaxter, M. L. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*. 12(7): 499-510.
45. _____; Cezard, T.; Fuentes-Utrilla, P.; Eland, C.; Gharbi, K.; Blaxter, M. L. 2013. Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. *Molecular Ecology*. 22(11): 3151-3164.
46. De Patta Pillar, V.; Muller, C.; De Souza, S.; Ávila Jacques, A. V. 2009. Campos Sulinos-conservação e uso sustentável da biodiversidade. (en línea). Brasilia, DF, Ministerio Medio Ambiente. 403 p. Consultado 7 nov. 2017. Disponible en <http://www.mma.gov.br/publicacoes/biomas/category/64->

pampa?download=1060:campos-sulinos-conservacao-e-uso-sustentavel-da-biodiversidade

47. del Puerto, O. 1987. Vegetación del Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía. 16 p.
48. Deng, P.; Wang, M.; Feng, K.; Cui, L.; Tong, W.; Song, W.; Nie, X. 2016. Genome-wide characterization of microsatellites in Triticeae species: abundance, distribution and evolution. *Scientific Reports*. 6: 32224-32236.
49. Doyle, J. J.; Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
50. Durán, H.; La Manna, A. 2009. Criterios para rehacer las rotaciones forrajeras en el tambo. *Revista INIA*. no. 17: 48-50.
51. Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews*. 5: 435-445.
52. Estoup, A.; Jarne, P.; Cornuet, J. M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite *loci* and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. 11: 1591-1604.
53. Feldman, M.; Levy, A. A. 2012. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics*. 192(3): 763-774.
54. Frankel R, Galun E. 1977. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Berlin, Springer. 281 p.
55. Gao, C.; Ren, X.; Mason, A. S.; Li, J.; Wang, W.; Xiao, M.; Fu, D. 2013. Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. *Functional Plant Biology*. 40(7): 645-661.
56. Gao, H.; Cai, S.; Yan, B.; Chen, B.; Yu, F. 2009. Discrepancy variation of dinucleotide microsatellite repeats in eukaryotic genomes. *Biological Research*. 42(3): 365-375.
57. García, J. 1995. Gramilla y praderas. Montevideo, INIA. 15 p.
58. Gibbons J. G.; Rokas A. 2009. Comparative and functional characterization of intragenictandem repeats in 10 *Aspergillus* genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 26: 591-602.
59. Giordano, A.; Cogan, N. O. I.; Kaur, S.; Drayton, M.; Mouradov, A.; Panter, S.; Spangenberg, G. C. 2014. Gene discovery and

molecular marker development, based on high-throughput transcript sequencing of *Paspalum dilatatum* Poir. PLoS ONE. 9(2): 1-10.

60. Glison, N.; Viega, L.; Cornaglia, P.; Gutiérrez, L.; Speranza, P. 2015 Variability in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds is genotype dependent. Grass and Forage Science. 70(1): 144-153.
61. Grover, A.; Sharma, P. C. 2011. Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution?. Current Science. 100(6): 859-869.
62. Hancock, J. 2006. Plant evolution and the origin of the crop species. 2nd. ed. London, CABI. 313 p.
63. Hickenbick, M.; Flores, A.; Cavalli-Molina, S.; Weber, L.; Kersting, A.; Costa, L.; Souza-Chies, T.; Albarus, M. 1992. Mode of reproduction seed production in *Paspalum dilatatum* Poir. Virasoro biotype-Dilatata group (Gramineae). Revista Brasileira de Genetica. 15: 85-102.
64. Hodel, R. G. J.; Segovia-Salcedo, M. C.; Landis, J. B.; Crowl, A. A.; Sun, M.; Liu, X.; Soltis, P. S. 2016. The report of my death was an exaggeration: a review for researchers using microsatellites in the 21st. century. Applications in Plant Sciences. 4(6): 1-13.
65. Hoshino, A. A.; Bravo Pereira, J.; Nobile Macedo, P.; Morelli, K. A. 2012. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. (en línea). In: Caliskan, M. ed. Genetic diversity in microorganisms. Rijeka, Croacia, InTech. pp. 149-170. Consultado 7 nov. 2017. Disponible en <https://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-microorganisms>
66. Huang, H.; Lacey Knowles, L. 2016. Unforeseen consequences of excluding missing data from next-generation sequences: simulation study of rad sequences. Systematic Biology. 65(3): 357-365.
67. Jarne, P.; Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution. 11(10): 424-429.

68. Jia, X.; Deng, Y.; Sun, X.; Liang, L.; Ye, X. 2015. Characterization of the global transcriptome using Illumina sequencing and novel microsatellite marker information in seashore paspalum. *Genes and Genomics*. 37(1): 77-86.
69. Johnston, W. H. 1996. The place of C4 grasses in temperate pastures in Australia. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 39: 527-540.
70. Judd, B. I. 1975. New world tropical forage grasses and their management. *World Crops*. 27 (3): 113-117.
71. Kalia, R. K.; Rai, M. K.; Kalia, S.; Singh, R.; Dhawan, A. K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177(3): 309-334.
72. Kalinowski, S. T.; Taper, M. L.; Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 16: 1099-1106.
73. Kashi, Y.; King, D. 2006. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*. 22(5): 253-259.
74. Kruglyak, S.; Durrett, R. T.; Schug, M. D., Aquadro, C. F. 1998. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 10774-10778.
75. Laval, G.; San Cristobal, M.; Chevalet, C. 2002. Measuring genetic distances between breeds: use of some distances in various short term evolution models. *Genetics Selection Evolution*. 34: 481-507.
76. Leitch, I. J.; Bennet, M. D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*. 82(4): 651-663.
77. Li, B.; Kimmel, M. 2014. Factors influencing ascertainment bias of microsatellite allele sizes: impact on estimates of mutation rates. *Genetics*. 195(2): 563-572.
78. Li, Y. C.; Fahima, T.; Korol, A. B.; Peng, J.; Röder, M. S.; Kirzhner, V.; Nevo, E. 2000. Microsatellite diversity correlated with ecological-
edaphic and genetic factors in three microsites of wild emmer

wheat in North Israel. *Molecular Biology and Evolution*. 17(6): 851-862.

79. _____.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 11(12): 2453-2465.
80. Liu, Z. W.; Jarret, R. L.; Kresovich, S.; Duncan, R. R. 1995. Characterization and analysis of simple sequence repeat (SSR) *loci* in seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz.). *Theoretical and Applied Genetics*. 91(1): 47-52.
81. López, A. 2012. Incorporación de gramíneas perennes estivales del género *Paspalum*; una alternativa para solucionar la crisis forrajera estival, invasión prematura de especies espontáneas y baja persistencia de mezclas forrajeras convencionales en sistemas lecheros intensivos de base pastoral. Tesina de pasantía final de grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 71 p.
82. Loveles, J. L.; Hamrick, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15: 65-95.
83. 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.
84. Marriage, T. N.; Hudman, S.; Mort, M. E.; Orive, M. E.; Shaw, R. G.; Kelly, J. K. 2009. Direct estimation of the mutation rate at dinucleotide microsatellite *loci* in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Heredity*. 103(4): 310-317.
85. Mayer, C. 2010. Phobos 3.3.11. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 8 nov. 2017. Disponible en http://www.rub.de/ecoevo/cm/cm_phobos.htm
86. Merritt, B. J.; Culley, T. M.; Avanesyan, A.; Stokes, R.; Brzyski, J. 2015. An empirical review: characteristics of plant microsatellite markers that confer higher levels of genetic variation. *Applications in Plant Sciences*. 3(8): p. irr.
87. Miller, M. P.; Knaus, B. J.; Mullins, T. D.; Haig, S. M. 2013. SSR-pipeline: a bioinformatic infrastructure for identifying microsatellites from

paired-end illumina high-throughput DNA sequencing data. *Journal of Heredity*. 104(6): 881-885.

88. Millot, J. 1969. Mejoramiento de gramíneas forrajeras. *Miscelánea CIAAB*. no. 7: 101-110.
89. Mohammadi, S. A.; Prasanna, B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Science*. 43: 1235-1248.
90. Muir, P.; Li, S.; Lou, S.; Wang, D.; Spakowicz, D. J.; Salichos, L.; Gerstein, M. 2016. The real cost of sequencing: scaling computation to keep pace with data generation. *Genome Biology*. 17(1): p. irr.
91. Narum, S. R.; Buerkle C. A.; Davey, J. W.; Miller, M. R.; Hohenlohe P. A. 2013. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular Ecology*. 22(11): 2841-2847.
92. Oliveira, F. A.; Cidade, F. W.; Fávero, A. P.; Vigna, B. B. Z.; Souza, A. P. 2016. First microsatellite markers for *Paspalum plicatum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum* species of the Plicatula group. *BMC Research Notes*. 9(1): p. irr
93. Orbea, J. R.; Cauhepe, M. A. 1982. Forrajeras de la Pampa deprimida. Balcarce, Buenos Aires, INTA. 6 p.
94. Peakall, R.; Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
95. _____; _____. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
96. Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P. M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology Evolution*. 16(3): 142-147.
97. Putman, A. I.; Carbone, I. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*. 4(22): 4399-4428.
98. Quarín, C. L. 1987. Mejoramiento en *Paspalum* por medio de hibridaciones interespecíficas. In: *Encontro Internacional sobre*

Melhoramiento Genético de *Paspalum* (1987, Nova Odessa. Anais. Nova Odessa, São Paulo, BR, Instituto de Zootecnia. pp. 27-29.

99. _____.; 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.
100. Quintans, I. 2013. Determinación de la producción, estacionalidad y calidad de forraje en una colección de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir.). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 124 p.
101. Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current Opinion in Plant Biology. 5: 94-100.
102. Ramsay, L.; Macaulay, M.; Cardle, L.; Morgante, M.; Degli Ivanissevich, S.; Maestri, E.; Waugh, R. 1999. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. Plant Journal. 17(4): 415-425.
103. Rao, I.; Peters, M.; Castro, A.; Schultze-Kraft, R.; White, D.; Fisher, M.; Rudel, T. 2015. LivestockPlus - the sustainable intensification of forage-based agricultural systems to improve livelihoods and ecosystem services in the tropics. Tropical Grasslands. 3(2): 59-82.
104. Roorkiwal, M.; Grover, A.; Sharma, P. C. 2009. Genome-wide analysis of conservation and divergence of microsatellites in rice. Molecular Genetics and Genomics. 282(2): 205-215.
105. Rosengurtt, B.; Arrillaga, B. R.; Izaguirre, P. 1970. Gramíneas uruguayas. Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. pp. 347-383.
106. _____. 1979. Tablas de comportamiento de las especies de plantas de campos naturales en el Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía, UdelaR. División Publicaciones y Ediciones. 86 p.
107. 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.

108. Sandro, P. 2014. Caracterización genotípica y fenotípica de una colección de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 59 p.
109. Sankhla, A. K.; Malik, C. P. 2015. Microsatellites: a review. *Journal of Plant Science Research*. 31(1): p. irr.
110. Santiñaque, F. 1979. Estudios sobre productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 86 p.
111. _____; Carámbula, M. 1981. Productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras. *Investigaciones Agronómicas*. no. 2: 16-21.
112. Savidan, Y. 1987. Introdução. In: Encontro Internacional sobre Melhoramiento genético de *Paspalum* (1987, Nova Odessa). Anais. Nova Odessa, São Paulo, BR, Instituto de Zootecnia. pp. 1-2.
113. Sawasato, J. T.; Agnol, M. D.; Priscila, D.; Junior, T.; 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
114. Scheffer-Basso, S. M.; Rodrigues, G. L.; Bordignon, M. V. 2002. Caracterização morfofisiológica e anatômica de *Paspalum urvillei* (Steudel). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 31(4): 1674-1679.
115. Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 109(6): 365-371.
116. Schrauf, G.; Blanco, M. 2003. Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. *Tropical Grasslands*. 37: 182-186.
117. Selkoe, K. A.; Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9: 615-629.
118. Senan, S.; Kizhakayil, D.; Sasikumar, B.; Sheeja, T. E. 2014. Methods for development of microsatellite markers: an overview. *Notulae Scientia Biologicae*. 6(1): 1-13.

119. Skerman, P. J.; Riveros, F. 1992. Gramíneas tropicales. Roma, FAO. 849 p.
120. Sonah, H.; Deshmukh, R. K.; Sharma, A.; Singh, V. P.; Gupta, D. K.; Gacche, R. N.; Rana, J. C.; Singh, N. K.; Sharma, T. R. 2011. Genome-wide distribution and organization of microsatellites in plants: an Insight into Marker Development in *Brachypodium*. PLoS One. 6(6): e21298.
121. Souza-Chies, T.; Cavalli-Molina, S. 1995. Variability in seed production and germination in *Paspalum*; Dilatata group (Gramineae). Revista Brasileira de Biologia. 55(1): 127-139.
122. Speranza, P.; Malosetti, M. 2007. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). Plant Genetic Resources. 5(1): 14-26.
123. _____. 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). Plant Systematics and Evolution. 282(2): 43-56.
124. Sreenu, V. B.; Kumar, P.; Nagaraju, J.; Nagarajaram, H. A. 2007. Simple sequence repeats in mycobacterial genomes. Journal of Biosciences. 32(1): 3-15.
125. Star, P.; Brooking, T. 2006. Fescue to the rescue: chewings fescue, *Paspalum*, and the application of non-British experience to pastoral practice in New Zealand, 1880-1920. Agricultural History. 80(3): 312-335.
126. Strand, M.; Prolla, T.A.; Liskay, R.M. Petes, T.D. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature. 365: 274-276.
127. Strassburg, B. B. N.; Latawiec, A. E.; Barioni, L. G.; Nobre, C. A.; da Silva, V. P.; Valentim, J. F.; Assad, E. D. 2014. When enough should be enough: improving the use of current agricultural lands could meet production demands and spare natural habitats in Brazil. Global Environmental Change. 28(1): 84-97.
128. Tejera, M. 2014. Inclusión del género *Paspalum* en mezclas forrajeras; efecto sobre la disponibilidad de forraje, la resistencia a la invasión, y la estabilidad. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 68 p.

129. _____.; Speranza, P.; Astigarraga, L.; Picasso, V. 2016. Forage biomass, soil cover, stability and competition in perennial grass-legume pastures with different *Paspalum* species. *Forage and Grass Science*. 71(4): 575-583.
130. Terra, R. 1973. Evaluación de mezclas forrajeras con inclusión de *Paspalum dilatatum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 85 p.
131. Tian, X.; Strassmann, J. E.; Queller, D. C. 2011. Genome nucleotide composition shapes variation in simple sequence repeats. *Molecular Biology and Evolution*. 28(2): 899-909.
132. Trapnell, D. W.; Hamrick, J. L.; Parker, K. C.; Braungart, K. W.; Glenn, T. C. 2011. Evaluating the utility of microsatellites for investigations of autopolyploid taxa. *Journal of Heredity*. 102(4): 473-478.
133. Treco, D.; Arnheim, N. 1986. The evolutionary conserved repetitive sequence d(TG-AC)_n promotes reciprocal exchange and generates unusual recombinant tetrads during yeast meiosis. *Molecular and Cellular Biology*. 6: 3934-3947.
134. Udupa, S. M.; Malhotra, R. S.; Baum, M. 2004. Tightly linked di- and tri-nucleotide microsatellites do not evolve in complete independence: evidence from linked (TA)_n and (TAA)_n microsatellites of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 108(3): 550-557.
135. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B. C.; Remm, M.; Rozen, S. G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15): e115.
136. Vaio, M.; Mazzella, C.; Porro, V.; Speranza, P.; López-Carro, B.; Estramil, E.; Folle, G. 2007. Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Systematics and Evolution*. 265: 109-121.
137. Valls, S. F. M.; Pozzobon, M. 1987. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: Encontro Internacional sobre Melhoramiento Genético de *Paspalum* (1987, Nova Odessa). Anais. Nova Odessa, São Paulo, BR, Instituto de Zootecnia. pp. 15-21.

138. Viard, F.; Franck, P.; Dubois, M. P.; Estoup, A.; Jarne, P. 1998. Variation of microsatellite size homoplasmy across electromorphs, *loci*, and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution*. 47(1): 42-51.
139. Volaire, F.; Barkaoui, K.; Norton, M. 2014. Designing resilient and sustainable grasslands for a drier future: adaptive strategies, functional traits and biotic interactions. *European Journal of Agronomy*. 52: 81-89.
140. Wang, M. L.; Chen, Z. B.; Barkley, N. A.; Newman, M. L.; Kim, W.; Raymer, P.; Pederson, G. A. 2006. Characterization of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz) germplasm by transferred SSRs from wheat, maize and sorghum. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53(4): 779-791.
141. Wei, N.; Bemmels, J. B.; Dick, C. W. 2014. The effects of read length, quality and quantity on microsatellite discovery and primer development: from Illumina to PacBio. *Molecular Ecology Resources*. 14(5): 953-965.
142. Yu, J. M.; Zhang, Z. W.; Zhu, C. S.; Tabanao, D. A.; Pressoir G.; Tuinstra, M. R.; Kresovich, S.; Todhunter, R. J.; Buckler, E. S. 2009. Simulation appraisal of the adequacy of number of background markers for relationship estimation in association mapping. *Plant Genome*. 2: 63-77
143. Zalapa, J. E.; Cuevas, H.; Zhu, H.; Steffan, S.; Senalik, D.; Zeldin, E.; Simon, P. 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) *loci* in the plant sciences. *American Journal of Botany*. 99(2): 193-208.
144. 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). St. Louis, Missouri Botanical Garden, USA. 297 p.

X. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de los cebadores diseñados sobre Vacaria, unidad de repetición de la secuencia microsatélite y longitud de la secuencia flanqueante.

	“Contig”	Cebador F	Cebador R	UR	LSF
Pdva1	NODE_33122	GTGCCAAGATACAAGAGAAG	CTTCTTCACTTGGTTCTTCC	(AG) ₂₃	170
Pdva2	NODE_66898	AGAGGACTGTATAAACCCCTG	TGACAAGTACGACGAGAG	(AG) ₂₂	157
Pdva3	NODE_4884	CCGGGAGAATATTAGATTGG	GATAAGCCATTGTGCTCTG	(AG) ₂₁	152
Pdva4	NODE_177977	TAGTATTGTGATGACGTGGG	AACGCCCTTCTAAATCTCTG	(AG) ₂₁	233
Pdva5	NODE_185136	GCACGCTAATACATCCATG	CTTTAATGCCATGCAGGAC	(AG) ₂₀	139
Pdva6	NODE_84861	TGATCTACTAACCTCGCTG	TGATGAGAGCTGGAAATGG	(AG) ₁₉	184
Pdva7	NODE_1486	GCAACATCCCATTCCATG	CCTTCTGATCCGACATCC	(AG) ₁₈	156
Pdva8	NODE_7777	TATGTCAAGATGGAGGGAAG	TGTCAGTCCATTGTAGTCAC	(AG) ₁₇	175
Pdva9	NODE_60630	GGCTCTATCACTCATTAACTG	GAAGTGTTGAAGGGCTAAAG	(AG) ₁₇	211
Pdva10	NODE_165440	CTATCGGAGTTGTGGAGTG	CAGCCTTGGTTGACAGAC	(AAG) ₁₈	182
Pdva11	NODE_87214	TCATGGAGAAGAGCTGTTG	CACAAATATGGGTCGTCTTC	(AAG) ₁₆	177
Pdva12	NODE_65885	AAGTCTGTGAGGGTTTGAG	TCTTCTATTAACCTCCAGC	(AAG) ₂₃	177
Pdva13	NODE_8781	GAGGGAAGAAAGAACAAG	AGTCACAGTTTCTTAGCAGG	(AAAG) ₉	190
Pdva14	NODE_184846	TCCAACGCAATAATCTATGC	AACTGAACCAGCGTTTG	(AAGAG) ₈	154
Pdva15	NODE_201960	AATCCTAGAAATCCCTGGAG	TCTCCTGGTCAACATATTCG	(AATCT) ₇	211
Pdva16	NODE_11105	CCGGGATAGTACATGACTAC	CTTCTTTCTTGCGTACACAG	(AC) ₁₈	145
Pdva17	NODE_64932	GCATCATACTCGTTGATCAG	GATCCTGTCAACTTATTGGG	(AG) ₁₈	187
Pdva18	NODE_85390	GCTCTGTTCTTTACTAGGG	GAGGGATTTCTTGGGTTAAC	(AG) ₁₈	181
Pdva19	NODE_68742	CGACGTGTAGCTATAGAGG	ATTCCATCTATCGCGAAATC	(ACG) ₁₂	168

UR: Unidad de Repetición de la secuencia microsatélite, LSF: Longitud de la Secuencia Flanqueante.

Anexo 2. Secuencias de los cebadores diseñados sobre *P. urvillei*, unidad de repetición de la secuencia microsatélite y longitud de la secuencia flanqueante.

	"Contig"	Cebador F	Cebador R	UR	LSF
Pur1	NODE_125939	GTGGGTGGGTAGTCTATTTT	TCTTGGAATGTGAGGCC	(AG) ₂₂	131
Pur2	NODE_4783	GATTGATTACTGACTGGTGC	ACAACGCATAAATAGGACAAG	(AG) ₂₂	162
Pur3	NODE_54090	GGTACTATGGCTATCGAAAC	TATTCCTTTCCTCCCGTTTC	(AG) ₂₂	205
Pur4	NODE_33070	TGGACTCATGGAGAAAGATC	GAAGCGGTTTCCATATTTGC	(AG) ₂₁	164
Pur5	NODE_39310	AATGCTGATGACCAACATG	TGCTAACTTGCTACAACAAC	(AG) ₂₀	164
Pur6	NODE_130085	ATGTTGCAGTTCTGAATTCC	ACAATGAAACGAACCACTTG	(AG) ₂₀	193
Pur7	NODE_19548	CTCCGGAGTTACTTCACG	ACTGCAACAATCTTTAACCC	(AG) ₁₉	164
Pur8	NODE_63721	ATGTATGGCTATGGGTGC	TCCAGTCCAAATGTCCAATC	(AG) ₁₉	188
Pur9	NODE_142336	TTTCCTGATCACGCGAAG	AAACAATCGGCACAATGC	(AG) ₁₉	162
Pur10	NODE_27046	GTAGAGGAGTCCGAGGTG	CTAGCACAAATCAAAGGTGCG	(AG) ₁₈	179
Pur11	NODE_13483	AAATCATCCCAAGCAGTTC	TGGTTCTTGTTTCCTTTG	(AG) ₁₇	184
Pur12	NODE_80829	GATGAATCGAGGCTGAATG	GGTATCAGCAACGCAATG	(AAG) ₂₄	127
Pur13	NODE_143949	CTAGATGACCAAGCACATG	TGTTTCGAGCCTATAATCCTC	(CTT) ₁₉	185
Pur14	NODE_86706	TTTGCTACGATAGATCAAGC	CATTTTCGAGCTACAGCAATG	(AAG) ₁₇	165
Pur15	NODE_124238	ATCATTAGTGTCTCCCTTCC	ATAGATCGACGACGCATC	(AAG) ₁₂	196
Pur16	NODE_44334	TAGCTCTAGTAGTTCCTTGC	AAATATGGTCCTTGCATAAGC	(AAC) ₁₂	180
Pur17	NODE_49031	CACAACAGACAGATGCAAG	TCTGCTGTTCTGGAAATAATG	(ACAT) ₁₃	153
Pur18	NODE_52775	CTTCACCATACCCGAGTC	TACTGCCTGTATGCTTGC	(ATCC) ₁₂	229
Pur19	NODE_2466	ATTGAAACAAGCTATGGACC	AGTATAGAATGCTGGCTCTG	(AAAG) ₁₂	174
Pur20	NODE_113307	AGCATTAGACCATCTCTAGC	CATCAACTATAATGACTGGCC	(AAAG) ₁₁	176
Pur21	NODE_71941	TTTGGAAGCATTTCGAAGCAG	TCTTAATCTGTGCCCTGTAC	(AGATT) ₁₅	161
Pur22	NODE_6341	GGATCGAGATCGGATCAAC	GTGTTTGTGGTTCAGGAC	(ACTCC) ₈	193
Pur23	NODE_41000	CCAGATAAGGAAGAGGTCAG	CTATGGTAAGCAGGCAATG	(AGATC) ₇	170

UR: Unidad de Repetición de la secuencia microsatélite, LSF: Longitud de la Secuencia Flanqueante.

Anexo 3. Secuencias de los cebadores diseñados sobre Virasoro, unidad de repetición de la secuencia microsatélite y longitud de la secuencia flanqueante.

	“Contig”	Cebador F	Cebador R	UR	LSF
Pdvi1	NODE_21681	TAGTGCCAAATGATGACAAC	TACGCTAACCTCTGCATG	(AG) ₃₁	150
Pdvi2	NODE_38225	ACCACACAGATGAGCAAG	CGCATCTCCTTTGAACAC	(CTT) ₁₇	163
Pdvi3	NODE_26779	TTGTCGTCAAGTCAATTAGTG	TTCTTGTTTCATGTAGCTGC	(AACAG) ₉	174
Pdvi4	NODE_53368	GAATGTAGCAGTCGAACAAG	TGCGGTATCCATCATCTAC	(ATCC) ₁₁	181
Pdvi5	NODE_44885	CTTGTTCCAAGTGAAGGTG	CTACAACACGACAGCTTTG	(AG) ₂₁	158
Pdvi6	NODE_4901	AAAGAGAAATGCATGGAGTG	ACCCTGTAGATATGGACAAG	(TGCC) ₁₀	184
Pdvi7	NODE_51268	ATTGCCGATGTTGTAATGG	ACAGTCCAGGATATCTAACC	(AG) ₂₅	154
Pdvi8	NODE_26750	AGGTAGAATATCACTGCTGG	CAGTATAGCAGCATAAGATGG	(AAG) ₁₃	172
Pdvi9	NODE_35492	CCACGAACACGTAACATAC	AAACATATCACAAGCTGCTG	(AAAG) ₁₀	178
Pdvi10	NODE_8507	TAACAGATTTGTGAAGCGAG	TACTAATCTGACACTGCACC	(AC) ₁₉	185
Pdvi11	NODE_29354	AGTCTCCACCAGAAGATAATG	CTGTGATATGATATGCGTCTG	(AGATC) ₇	190
Pdvi12	NODE_2588	TATGTGTCCGAGCATGTG	AGTAGCATGAGATGGAGATG	(AATCC) ₇	210
Pdvi13	NODE_7044	TTTCGTGGATAATGATGTGC	GAAGAGGTATATTCATGGATGTC	(AG) ₁₈	221
Pdvi14	NODE_30788	ACTCAGAACACATTGCTTAC	ATTCCAATAACAGAGCCAAG	(AG) ₁₈	209
Pdvi15	NODE_19193	CGCTTGCTTGTCTCTTC	AGATCACCAAATTGTCCAC	(AG) ₁₇	187
Pdvi16	NODE_24140	AATCGTGGACCTTAATTAGC	GCAAGCAAGGTCCTGATG	(AG) ₁₇	143
Pdvi17	NODE_36861	CGTGTGATCCAGATGCTC	GATGTGGTGGTCATTGCG	(AAGGG) ₇	124
Pdvi18	NODE_48149	AATGTCATCTAGAGCCGTG	TTACTTCTGCATGCACAAC	(AAG) ₁₁	204
Pdvi19	NODE_24555	CCGGTCAGTGATGAGTTAG	TCTTGTGGACCTCTTCTATAG	(AG) ₁₆	172
Pdvi20	NODE_19969	CTGCCTTCTAAGTTGATCTG	CAGAATCTGCCTGCACAAG	(AAG) ₁₀	150

UR: Unidad de Repetición de la secuencia microsatélite, LSF: Longitud de la Secuencia Flanqueante.

Anexo 4. Secuencias de los cebadores diseñados sobre Flavescens, unidad de repetición de la secuencia microsatélite y longitud de la secuencia flanqueante.

	"Contig"	Cebador F	Cebador R	UR	LSF
Pdf130	NODE_2602	CTCTTGCTACCAACTAAC	TTCCACCTCTTATGCTCTTG	(AAG) ₃₅	106
Pdf131	NODE_4	ATTATGAGGAACCAGAGTCC	AGGAAGAGCAGTCATACTTG	(AATAG) ₁₁	152
Pdf132	NODE_72426	TCAAGCTCATATACCACAAAGC	CCCATGAACAGCTTCAGC	(AG) ₂₄	112
Pdf133	NODE_42198	AGATGTCTTATTTGCTACGTG	TCCTACCTAGCAATCTGTTC	(ACT) ₁₅	153
Pdf134	NODE_40815	CAAGGTAAGAATCGGCTTG	GACTGACTGTAATGAACGTC	(AAG) ₁₄	167
Pdf135	NODE_43358	TGCATGATCTCCTACTCC	GAGAGGAAGGAGACGGTC	(AG) ₂₁	141
Pdf136	NODE_4768	TAGTGAGATGCATGGTGTAG	CTTTGTCCATCTCTATGTGC	(AG) ₂₀	182
Pdf137	NODE_43187	AGGCGGGAAGAAGCTAAG	CATCCATATGTTCCATTGATG	(AAG) ₁₃	147
Pdf138	NODE_12826	GAGTCGCGAGGAGAATAAAC	GTATTGCGAGCGAGGATG	(AG) ₁₉	166
Pdf139	NODE_40820	TCTCCAAGAAGCTGAACTAG	ACCAGGTGATGATCTAGTTC	(AC) ₁₉	161
Pdf140	NODE_12060	CTGCGAACACATCTGATTC	AAGTCATATTCTGGTTCAGC	(AG) ₁₉	279
Pdf141	NODE_33615	CGCTTGCACTACTGTAAC	CCACTCTTCCGATCGATC	(AG) ₁₈	372
Pdf142	NODE_36925	TTCGTCATCTTCATCACTTG	TGCTCCTCTTATGGTTCAAC	(AAG) ₁₂	152
Pdf143	NODE_1769	TAAGTCCAGTCCATGTTC	TAGCTGAACGTAAGTACTAGG	(AG) ₁₈	172
Pdf144	NODE_14279	TGGATGTACTGCGACTAAAG	AGCTCGTAATGCAAGATATG	(AGAT) ₉	547
Pdf145	NODE_18251	CGACGGCAAGATTAGATTAG	GTAATCCTCGATTAGTCCCTG	(ATCCC) ₇	175
Pdf146	NODE_2562	AGCAGTCAGTCAGCATTG	AGTACTAGTCTGTTGAGGAAG	(AATCT) ₇	157
Pdf147	NODE_6990	GAGAATGCAGCCGTCTTG	AGCAACCACTCCTCGATG	(ATC) ₁₂	136
Pdf148	NODE_15744	ATAATCCTAGCCAGCTAACG	CTCCAGAATCCAGATCGAG	(AG) ₁₈	195
Pdf149	NODE_30777	GCAACATCATCTCCTTCATG	TAGATCCACAGCATCGCG	(AG) ₁₈	212
Pdf150	NODE_59771	CTCCATCCACCTCCTCTG	CATGCTGCTCGGTTTCTC	(AG) ₁₈	229

UR: Unidad de Repetición de la secuencia microsatélite, LSF: Longitud de la Secuencia Flanqueante.

Anexo 5. Número de alelos (Na), rango de alelos, heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada (He) e índice de contenido de polimorfismo (PIC) para cada marcador según *taxa*.

		Flavescens	Vacaria	Virasoro	<i>P. dasy- pleurum</i>	<i>P. urvillei</i>	<i>P. inter- medium</i>	<i>P. umbrosum</i>
Pur1	Na	3	2	3	3	8	2	2
	Rango	144-164	166-170	176-315	144-162	166-195	144-146	152-152
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,44	0,00
	He	0,34	0,47	0,63	0,63	0,79	0,35	0,24
	PIC	0,314	0,359	0,555	0,555	0,765	0,286	0,215
Pur4	Na	1	2	1	1	8	10	4
	Rango	177	176-206	176	181	198-212	178-196	181-210
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,10	1,00	0,22
	He	0,00	0,12	0,00	0,00	0,84	0,88	0,38
	PIC	0	0,11	0	0	0,817	0,862	0,354
Pur5	Na	3	3	2	2	5		1
	Rango	169-228	169-221	227-233	183-187	185-203		231
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10		0,00
	He	0,58	0,41	0,44	0,50	0,69		0,00
	PIC	0,492	0,371	0,346	0,375	0,649		0
Pur6	Na	3	1	2	1	4	1	5
	Rango	227-237	220	222-224	229	232-241	220	208-275
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,11
	He	0,54	0,00	0,38	0,00	0,54	0,00	0,70
	PIC	0,466	0	0,305	0	0,498	0	0,65
Pur11	Na	3	3	1	1	4	5	5

	Rango	202-208	208-212	212	206	202-218	198-212	200
	Ho	0,00	0,38	0,00	0,00	0,10	0,60	0,11
	He	0,62	0,62	0,00	0,00	0,58	0,59	0,73
	PIC	0,548	0,544	0	0	0,526	0,544	0,69
Pur12	Na	1	3	1	1	7		1
	Rango	142	175-257	175	142	168-251		140
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00
	He	0,00	0,53	0,00	0,00	0,82		0,00
	PIC	0	0,468	0	0	0,798		0
Pur13	Na	3	2	1	3	5		3
	Rango	247-279	250-256	220	241-253	132-250		223-241
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00		0,11
	He	0,37	0,38	0,00	0,59	0,72		0,29
	PIC	0,34	0,305	0	0,511	0,676		0,269
Pur14	Na	3	5	2	3	5	1	1
	Rango	209-215	196-215	233-258	153-233	200-231	187	215
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
	He	0,54	0,68	0,38	0,67	0,75	0,00	0,00
	PIC	0,466	0,641	0,305	0,593	0,704	0	0
Pur15	Na	2	3	2	0	5		
	Rango	214-215	217-233	222-224		233-263		
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,22		
	He	0,18	0,51	0,38	0,00	0,58		
	PIC	0,164	0,428	0,305	0	0,544		
Pur17	Na	2	1	1	2	4		2

	Rango	139-152	149	165	151-213	165-205		97-149
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10		0,00
	He	0,18	0,00	0,00	0,44	0,69		0,32
	PIC	0,164	0	0	0,346	0,632		0,269
Pdva2	Na	2	3	1	3	5		2
	Rango	179-194	182-206	175	202-206	173-199		146-154
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00
	He	0,20	0,41	0,00	0,63	0,74		0,20
	PIC	0,178	0,371	0	0,555	0,701		0,178
Pdva4	Na	2	1	2	2	3	7	4
	Rango	260-162	278	254-261	262-265	253-257	253-263	265-312
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,00
	He	0,22	0,00	0,38	0,38	0,54	0,79	0,52
	PIC	0,195	0	0,305	0,305	0,466	0,763	0,485
Pdva5	Na	2	2	2	1	2	1	
	Rango	153-197	153-197	191-197	153	153-255	152	
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	He	0,18	0,22	0,44	0,00	0,32	0,00	
	PIC	0,164	0,195	0,346	0	0,269	0	
Pdva5 2	Na	1	2	3	1	2		4
	Rango	159	176-183	172-197	316	155-157		192-316
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00		0,11
	He	0,00	0,43	0,67	0,00	0,18		0,56
	PIC	0	0,337	0,593	0	0,164		0,512
Pdva6	Na	4	1	1	1	5	9	

Pdva7	Rango	226-238	226	212	206	210-220	201-243	
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,89	
	He	0,64	0,00	0,00	0,00	0,77	0,85	
	PIC	0,581	0	0	0	0,729	0,828	
	Na	2	2	2	2	6	5	4
Pdva7 2	Rango	182-184	190-195	177-191	179-184	179-192	181-190	177-191
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,63	0,11
	He	0,42	0,38	0,38	0,38	0,80	0,70	0,62
	PIC	0,332	0,305	0,305	0,305	0,765	0,642	0,557
	Na	3	1	2	3	3		
Pdva8	Rango	209-215	202--19	211-219	209-218	194-198		
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10		
	He	0,58	0,00	0,38	0,63	0,57		
	PIC	0,492	0	0,305	0,555	0,482		
	Na	4	3	2	2	8	2	4
Pdva15	Rango	203-207	209-216	230-231	205-211	200-242	216-224	205-214
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
	He	0,48	0,54	0,50	0,50	0,85	0,50	0,72
	PIC	0,45	0,447	0,375	0,375	0,826	0,375	0,663
	Na	2	2	1	1	2	2	1
Pdva15 2	Rango	237-242	237-238	242	237	237-242	223-233	233
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
	He	0,18	0,12	0,00	0,00	0,32	0,18	0,00
	PIC	0,164	0,11	0	0	0,269	0,164	0
	Na	3	1	2	2	4		

	Rango	248-257	248	276-280	252-266	238-280		
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	He	0,62	0,00	0,38	0,44	0,66		
	PIC	0,548	0	0,305	0,346	0,61		
Pdva16	Na	5	3	1	1	6	1	3
	Rango	208-223	183-188	144	166	166-188	183	164-181
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
	He	0,64	0,32	0,00	0,00	0,77	0,00	0,49
	PIC	0,61	0,294	0	0	0,737	0	0,438
Pdva17	Na	2	2	2	4	4	1	3
	Rango	228-230	209-224	252-255	200-246	174-220	224	220-232
	Ho	0,00	0,13	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
	He	0,32	0,12	0,38	0,75	0,49	0,00	0,37
	PIC	0,269	0,11	0,305	0,703	0,458	0	0,34
Pdva18	Na	2	2	1	2	4		3
	Rango	203-204	203-205	205	205-207	201-207		196-200
	Ho	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00
	He	0,32	0,49	0,00	0,38	0,64		0,57
	PIC	0,269	0,37	0	0,305	0,581		0,489
Pdva18 2	Na	2	4	3	3	5		
	Rango	206-209	213-222	238-263	257-263	209-222		
	Ho	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00		
	He	0,32	0,66	0,63	0,67	0,76		
	PIC	0,269	0,615	0,555	0,593	0,72		