

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
Stipa neesiana Trin. et Rupr. EN URUGUAY**

por

Rafael VIDAL ANDRÉ

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
Abril 2009

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: Ing. Agr. M Sc Mercedes RIVAS
LATORRE, (Dra. Graciela GARCÍA DE SOUZA, PhD Lucía GUTIÉRREZ
CHACÓN, el día 30 de Abril de 2009. Autor/a: Ing. Agr. Rafael VIDAL ANDRÉ.
Director PhD. Pablo Rafael SPERANZA GASATALDI.

Dedico este trabajo a mi familia; Inés, Maru y Agustín

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo agradecer al Dr Pablo Speranza director de esta tesis por el apoyo y orientación brindados durante este trabajo. También agradecer a la Dra. Lucia Gutiérrez, la Dra Graciela García y la Ing. Agr. Mercedes Rivas por su participación en el tribunal y sus invaluable aportes.

Al Prof. Enrique Estramil y la Dra. Cristina Mazzella por haberme impulsado desde el inicio de mi Maestría.

A la CSIC de la Universidad de la República por haber financiado esta investigación.

Al Dr. Valentín Picasso por su apoyo desde la Unidad de Posgrados

A la Dra. Clara Pritsch por su colaboración al abrirme las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología.

A los compañeros de los Laboratorios de Biotecnología y Genética por las horas compartidas.

¿Existe acaso un espectáculo más hermoso y maravilloso?
¿Dónde la inteligencia del hombre se nutre mejor de la realidad de las cosas
que cuando examina las siembras, los semilleros, los brotes, sus injertos y se
interroga sobre la secreta virtud de los gérmenes y de las raíces,
sobre el crecimiento y su esterilidad?

*S. Agustín de Hiponia,
“De genesi ad litteram” Libri duodecim VIII, 16*

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....	1
1.1. Género <i>Stipa</i>.....	1
1.1.1. Características de <i>Stipa neesiana</i>.....	2
1.1.1.1. Variabilidad Intraespecífica.....	5
1.2. ESTRUCTURA DE POBLACIONES	5
1.2.1Flujo de genes.....	6
1.2.2Modelos de flujo de genes.....	7
1.2.3Variabilidad intrapoblacional.....	8
1.2.4 Estadísticos <i>F</i>.....	9
1.2.5 Estimadores de distancia genética	11
1.3 ANALISIS MULTIVARIADO.....	11
1.3.1 Análisis de agrupamientos.....	11
1.3.2Análisis de coordenadas principales.....	12
1.4 MARCADORES RAPD.....	12
2. <u>ARTÍCULO CIENTÍFICO</u>.....	14
DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y SISTEMA REPRODUCTIVO DE <i>Stipa neesiana</i> Trin. et Rupr. EN URUGUAY	
2.1. SUMMARY.....	14
2.2. RESUMEN.....	15
2.3. INTRODUCCIÓN.....	16
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.4.1. Colecta y extracción de ADN.....	19
2.4.2. Análisis de datos.....	21

2.5. RESULTADOS.....	23
2.6. DISCUSIÓN.....	28
2.6.1. Sistema reproductivo.....	28
2.6.2. Diversidad intrapoblacional.....	28
2.6.3. Diversidad interpoblacional.....	30
2.6.4 Variación geográfica.....	31
2.7. BIBLIOGRAFÍA.....	34
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	42
4. <u>CONCLUSIONES</u>	44
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	45

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No. Página

1. Número cromosómico y contenido de ADN de diferentes especies del género <i>Stipa</i> presentes en Uruguay.....	2
2. Reproducibilidad y número de bandas de los iniciadores seleccionados.....	23
3. Datos de pasaporte de las poblaciones de <i>S. neesiana</i> estudiadas y estimación de la diversidad genética intrapoblacional.....	25
4. AMOVA para 270 individuos de <i>S. neesiana</i> usando RAPD.....	26
5. Matriz de distancias genéticas entre poblaciones.....	26

Figura No

Página

1. <i>S. neesiana</i> . Planta adulta y fruto.....	4
2. Ubicación de las poblaciones estudiadas.....	20
3. Patrones de bandas de RAPD.....	24
4. Análisis de Coordenadas Principales para los 270 individuos analizados con RAPD.....	25
5. Agrupamientos de las nueve poblaciones usando UPGM.....	27
6. Análisis de Coordenadas Principales de las nueve poblaciones analizadas mediante RAPD.....	27
7. Correlograma entre distancia geográfica y distancia genética para todos los individuos de las nueve poblaciones de <i>S. neesiana</i>	28

RESUMEN

Stipa neesiana es una especie forrajera invernal perenne ampliamente distribuida en el campo natural de Uruguay, se utilizó el marcador Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) para estudiar la diversidad genética y la estructura de poblaciones de *S. neesiana*. Se seleccionaron cinco cebadores que generaron 71 bandas de RAPDs, se estudiaron 270 plantas de nueve poblaciones de diferentes sitios de Uruguay. La diversidad genética fue examinada mediante el Índice de diversidad de Nei (h), la heterosis esperada (H_e), el porcentaje de bandas polimórficas (P), mostrando una amplia variabilidad dentro de las poblaciones. La comparación de la diversidad genética entre las poblaciones estudiadas mediante AMOVA prueba que a pesar de que la mayor parte de la variabilidad está dentro de las poblaciones hay una significativa diferenciación genética entre las poblaciones. Al estudiar la estructura de la diversidad el asilamiento por distancia no surge como relevante, sin embargo existe una estructura de poblaciones que se hace patente en los estudios de agrupamientos UPGMA y de AcoP.

Palabras clave: estructura genética, forrajeras nativas, marcadores moleculares, RAPD, recursos filogenéticos.

**STRUCTURE OF THE GENETIC DIVERSITY OF
Stipa neesiana Trin. et Rupr. IN URUGUAY**

SUMMARY

Stipa neesiana it's a winter perennial grass widely extend in the Uruguayan grasslands, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to characterize the genetic diversity and population genetic structure of *Stipa neesiana* populations. Five primers was selected, which generated 71 RAPD bands, were used to analyze 270 plants of nine populations from varied regions of Uruguay. The genetic diversity of *Stipa neesiana* it was revealed by Nei's diversity index (h), and the percentage of polymorphic bands (P) showing a significant diversity within populations. The study of genetic differentiation among populations by means of AMOVA proves that although most variation was within populations there was high diversity among populations. The fixation index estimator's Φ_{PT} illustrates an important diversity among populations. Studying diversity's structure the isolation by distance not emerges as relevant, but exists a population's structure since the clusters analysis UPMGA and PCA.

Keywords: native forage grass, genetic resources, genetic structure, molecular markers, RAPD

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GÉNERO *Stipa*

El género *Stipa* presenta un taxonomía compleja principalmente en lo referido a los límites entre *Stipa* y *Nassella* ...“el género *Nassella* es muy difícil de separarlo de *Stipa* y por ello no puedo decir claramente dónde termina el uno y comienza el otro” (Parodi 1947, p. 369). Así es que según algunos autores el género *Stipa* puede estar integrado por 400 especies (Barkworth y Everett 1988), o por 300 especies según otros (Torres 1993; Longhi-Wagner y Zanin 1998).

La primera referencia al género *Stipa* se debe a Linneo (1753), quien efectuó una descripción formal en la quinta edición de su *Genera Plantarum* (1754); Trinius (1820) reconoce en él cinco grupos: *Aristella*, *Jarava*, *Macrochloa*, *Strepachne* y *Lasiagrostis*. En 1969 Burkart lo subdivide en subgéneros. Recientemente Pohl (1980) y Barkworth (1990) segregan el género en *Stipa* y *Nassella* y ubican gran parte de las especies sudamericanas, dentro de *Nassella*. A su vez Peñailillo (2002) ubica dentro del género *Jarava* a otro subgrupo de *Stipa*. Estos cambios han estado sustentados básicamente en caracteres morfológicos. Utilizando caracteres morfológicos y espaciadores internos transcritos (ITS) Jacobs *et al.* (2000) encontraron una importante concordancia entre los resultados de los dos análisis donde se destaca el concepto más amplio de *Nassella* donde se incluyen algunas *Stipas* y la cercana relación entre *Nassella* y *Piptochaetium*.

Cromosómicamente el género *Stipa* es considerado un complejo poliploide de especies, de evolución reciente, que forman una serie aneuploide, teniendo las de origen americano $x=11$ y 12 (Stebbins y Löve, 1941). Para todo el género, los números básicos serían $x=9, 10, 11$ y 12 (Clayton y Renvoize, 1986; Bowden, y Senn, 1962) siendo los cromosomas de pequeño tamaño. En trabajos recientes orientados a resolver la taxonomía del género en Uruguay Cristina Mazzella (com. Pers. 2007) estudió los cariotipos y contenidos de ADN de 12 diferentes especies del

género *Stipa*. Los números cromosómicos observados van desde $2n=26$ en *S. leptocoronata* y *S. longiglumis* hasta $2n=44$ en *S. brachychaeta* (las especies *S. papposa*, *S. charruana*, *S. tricótoma*, *S. filifolia* y *S. melanosperma* presentan $2n=36$; *S. hyalina*, *S. pauciciliata*, *S. poeppigiana*, *S. megapotamia* $2n= 34$, y *S. neesiana* y *S. rosengurtii* 28 cromosomas)(**Cuadro 1**). Los valores de contenido de ADN (2C) variaron desde 1.48 pg en *S. papposa* ($2n=36$) hasta 2.31 pg en *S. longiglumis* ($2n=26$), con valores intermedios en el resto de las especies, por lo que están en los rangos considerados pequeños genomas.

Cuadro 2. Número cromosómico y contenido de ADN de diferentes especies del género *Stipa* presentes en Uruguay.

Especie	2n	2C (pg) \pm DS
<i>S. leptocoronata</i>	26 ⁺	2.29 \pm 0.01
<i>S. longiglumis</i>	26 ⁺	2.31 \pm 0.01
<i>S. neesiana</i>	28 ⁺ *	2.07 \pm 0.01
<i>S. rosengurtii</i>	28 ⁺	1.84 \pm 0,005
<i>S. hyalina</i>	34*	1.52 \pm 0.01
<i>S. pauciciliata</i>	34 ⁺	1.99 \pm 0.01
<i>S. megapotamia</i>	34 ⁺	1.99 \pm 0.005
<i>S. poeppigiana</i>	34 ⁺	1.97 \pm 0.01
<i>S. trichotoma</i>	36 ⁺ *	1.87 \pm 0.02
<i>S. papposa</i>	36 ⁺ ;40*	1.48 \pm 0.01
<i>S. filifolia</i>	36 ⁺	1.73 \pm 0,01
<i>S. charruana</i>	36 ⁺ *	1.70 \pm 0.005
<i>S. melanosperma</i>	36 ⁺	2,27 \pm 0,01
<i>S. brachychaeta</i>	44 ⁺ *	1.63 \pm 0.01

+ Mazzella (2007) ; *Bowden y Senn, 1962

El género *Stipa* se encuentra presente en todos los continentes y predomina en regiones templadas, sus representantes son principalmente perennes y cespitosas (Vázquez y Devesa 1996). En América del Sur se encuentran cerca del 40% de las especies del género siendo el principal centro de diversidad la región comprendida por Argentina, Chile y Uruguay (Longhi-Wagner y Zanin 1998).

1.1.1. Características de *Stipa neesiana*

Stipa neesiana Trin. & Rupr.1842 (syn. *Stipa setígera* Presl, 1830), $2n = 28$ (Bowden y Senn 1962) es una gramínea cespitosa perenne invernial. Presenta

espiguillas unifloras, aéreas y cleistógenas (Connor 1979). Los frutos de las espiguillas aéreas “flechillas” (**figura 1**) se caracterizan por la presencia de un *callus* muy agresivo para la piel de los animales que junto con las aristas bigeniculadas constituyen un excelente mecanismo de adaptación de esta especie para asegurar la efectiva diseminación (Izaguirre 1993, Rosengurtt *et al.* 1970).

Se distribuye por el sur y oeste de Sudamérica, sur de África, Islas Baleares, Canarias, Australia, Nueva Zelanda (Longhi-Wagner y Zanin 1998; Clayton *et al.* 2002). En Uruguay se la encuentra en todo el territorio (Rosengurtt *et al.* 1970). Adaptada a ambientes semiáridos y de baja fertilidad (Bourdôt y Hurrell 1989), resulta muy útil en la regeneración campestre para repoblar zonas erosionadas (Rosengurtt 1946; Burkart 1969). Descrita como un pasto fino de buena persistencia, resistente al pastoreo, es de las gramíneas invernales más frecuentes con un forraje apetecido y productivo (Rosengurtt 1979; Berreta *et al.* 1990), por lo que se constituye en un importante aporte invernal del campo natural para los rodeos de cría (Formoso 1987). Su calidad y persistencia aumentan con cortes aliviados (Boggiano 1990; Lacuague y Durán 1989) y con pastoreo controlado. Con la fertilización nitrogenada mejora el macollaje y la oferta forrajera (García *et al.* 2005).

Con motivo de la reunión de Recursos Fitogenéticos de Interés Agrícola en el Cono Sur, que tuvo lugar en Brasilia en 1983 Rosengurtt realizó una clasificación de las especies presentes en el país según su prioridad para la conservación. Para este ordenamiento se basó en: la diversidad, el grado de erosión genética sufrida, las colecciones existentes y el interés económico y social (Symonds y Villagrán 1988).

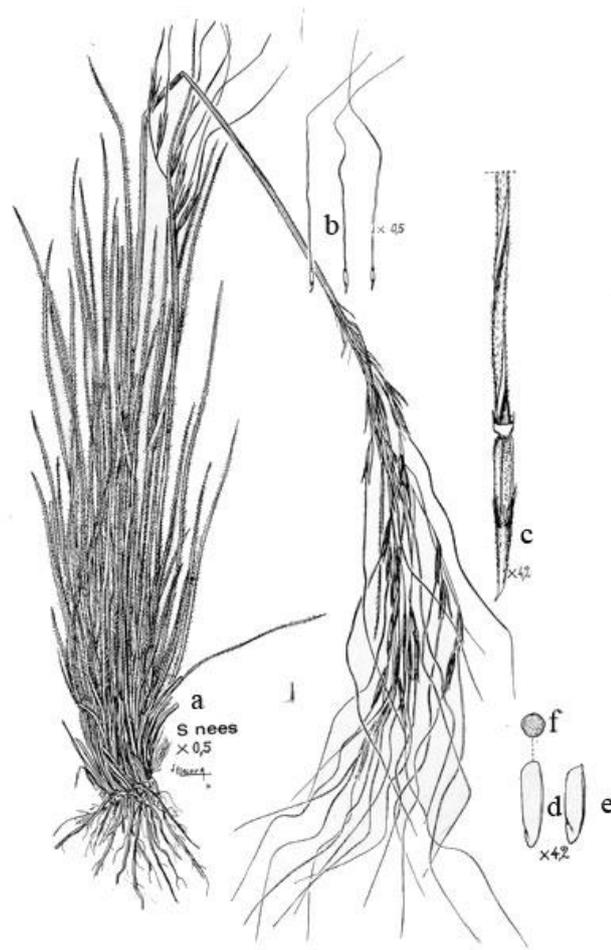


Figura 1. *S. neesiana*. Planta adulta y fruto.
 a: planta adulta, b: fruto, c: fruto ampliado, d y e: corte longitudinal, f: transversal.
 (Burkart. 1969)

Dentro de esta clasificación *S. neesiana* se encuentra en el grupo de especies de alta prioridad para su conservación debido a su diversidad, distribución e importancia forrajera. También con el objetivo principal de la conservación de especies nativas en 1978 en la Facultad de Agronomía creó el Banco de Germoplasma. Actualmente el género *Stipa* conforma una de las colecciones más numerosas del Banco siendo *S. neesiana* la mayor dentro del género.

No obstante dado que la distribución de dichas accesiones es poco representativa con regiones escasamente representadas como noreste y litoral sur y otras ausentes como las de areniscas y basalto norte, sería necesaria una revisión y ampliación de la colección de *S. neesiana* (Jaurena *et al.* 1997; Domínguez *et al.* 2002).

1.1.1.1. Variabilidad Intraespecífica

Rosengurtt (1979) identificó formas glabras, vellosas y ásperas, variabilidad en altura, largo de panojas y de tamaño de frutos. Burkart (1969) estudiando su distribución en Entre Ríos la describió como polimorfa haciendo hincapié en la necesidad de estudiar su variabilidad.

El primer estudio sistemático a nivel nacional de diversidad lo realizaron Symonds y Villagrán (1988). Estos autores analizaron las diferencias fenotípicas entre 20 accesiones del Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía y evaluaron 34 descriptores morfológicos. Para todos los descriptores estudiados la diversidad entre accesiones fue mayor y significativamente diferente a la diversidad dentro de las accesiones. Estudiando la asociación entre candidatos a descriptores con fertilidad del suelo y con la distribución geográfica, solo se encontró que aquellas accesiones con fechas de emergencia más temprana, largo y ancho de hoja mayor, mayor largo de panoja y mayor ancho de fruto se encuentran al Norte del país.

Se consideraron a los descriptores más adecuados por su poder de discriminación aquellos que al realizar un análisis de varianza mostraron mayores diferencias entre accesiones: porte, pigmentación de la lema, pigmentación de la corona, pigmentación de la gluma, largo de gluma, fecha de emergencia, largo de fruto, largo de hoja en estado vegetativo.

Dado la importante diversidad morfológica de *S. neesiana* y que es la especie en su género de mayor distribución geográfica del territorio nacional, se constituye en un modelo adecuado para estudiar la variabilidad genética y comenzar modelos de estructura genético poblacional para estas especies.

1.2. ESTRUCTURA DE POBLACIONES

Para definir a una especie como recurso filogenético es necesario contar con las etapas previas de caracterización y evaluación. La caracterización permite identificar y conocer la diversidad de la especie de interés, mientras que la evaluación permite estimar el valor agronómico de la misma.

Una vez definida la relevancia de la especie como recurso, el conocimiento de su diversidad y estructura genética, será una de las claves para el desarrollo de planes adecuados de muestreo, conservación y mejoramiento (Frankel *et al.* 1995). Por lo tanto cualquier intento de desarrollo y uso de *S. neesiana* necesitará de estrategias eficientes de colecta, conservación, caracterización para el uso de los recursos fitogenéticos disponibles.

La estructura genética de poblaciones es la distribución no aleatoria de la variación genética entre poblaciones, ella puede estar determinada por factores genéticos como la tasa de mutación, deriva genética, selección natural, flujo génico y sistema de reproducción, así como por factores ecológicos que incluyen la historia, la distribución geográfica y los mecanismos de dispersión de la especie (Hamrick y Godt 1990).

La determinación del modelo que mejor se ajusta a la variabilidad genética encontrada, por lo general, constituye una de las primeras etapas en el conocimiento de la biología poblacional de cualquier especie (Hillis *et al.* 1996), especialmente si se considera que las poblaciones naturales de casi todas las especies presentan algún grado de subdivisión, permitiendo que éstas evolucionen en forma separada y se diversifiquen.

1.2.1 Flujo de genes

La estructura genética es la manifestación del número de alelos intercambiados entre poblaciones lo que tiene consecuencias en la composición genética de los individuos. El intercambio de alelos entre poblaciones homogeniza las frecuencias alélicas entre ellas y hace más relativo el efecto de la selección y de las derivas.

Altos flujos de genes hacen impracticable la adaptación local (por ejemplo la fijación de alelos que son favorecidos por condiciones locales) y pueden también impedir el proceso de especiación (Barton y Hewitt 1985).

Por otra parte el flujo de genes genera nuevos polimorfismos y aumenta el tamaño efectivo de las poblaciones, oponiéndose a la deriva genética aleatoria, formando nuevas combinaciones de genes sobre las que la selección podría actuar.

Comprender el flujo de genes y sus efectos es esencial para muchos campos de investigación incluyendo la genética de poblaciones, la ecología de poblaciones y la biología de conservación (Balloux y Lougon – Moulin 2002).

Estimaciones confiables de las diferenciaciones entre poblaciones son cruciales en la biología de conservación, donde es a menudo necesario comprender cuáles poblaciones están genéticamente aisladas de cuáles y hasta dónde se extienden éstas.

Pequeñas poblaciones aisladas sufren deriva genética, la que afecta su potencial evolutivo mediante la fijación de mutaciones deletéreas (Higgins y Lynch 2001; Wright 1977; Madsen *et al.* 1996). El conocimiento de la estructura de poblaciones puede además ser una importante guía para las estrategias de conservación y de manejo (Rossiter *et al.* 2000; Eizirik *et al.* 2001).

1.2.2 Modelos de flujo de genes

El intercambio de genes entre poblaciones debido a la migración de los individuos entre ellas es otro factor importante de cambio genético en las poblaciones junto con las mutaciones y la deriva genética. Si dos poblaciones difieren en las frecuencias de los alelos de algunos de sus genes, entonces el intercambio de individuos entre las poblaciones producirá un cambio genotípico en cada una de las poblaciones.

La subdivisión de poblaciones como resultado de procesos migratorios puede producir diferentes divergencias genéticas entre las subpoblaciones (Barrett y Husband 1990). Para poder comprender la dinámica de las migraciones y colonizaciones son útiles algunos modelos.

En el modelo de **Islas** propuesto por Wright (1931), la probabilidad de migración de individuos entre poblaciones es la misma entre ellas. La diferenciación entre las poblaciones dependerá del número efectivo de cada subpoblación. Si consideramos subpoblaciones suficientemente grandes como para que no haya deriva, entonces a altas tasas de migración la tasa de homogenización de las subpoblaciones también será alta.

En el modelo **Isla-Continente** el flujo de genes es unidireccional y se da desde una población grande a poblaciones pequeñas como islas aisladas. En todos los casos, cuando se compara la diversidad genética de la población mayor y de las islas, estas últimas son menos diversas. La migración afecta solo a las islas y las hace más similares al continente.

El modelo **Paso a Paso**, similar al modelo de Islas pero en una dimensión, donde los individuos se moverían entre poblaciones vecinas en forma lineal (Kimura y Weiss 1964). Así las poblaciones pueden divergir y la correlación entre las poblaciones va a decrecer a medida que aumenta la distancia que las separa. El modelo de aislamiento por distancia en el cual los individuos se distribuyen en forma continua, existiendo una mayor probabilidad de migrar entre las poblaciones más cercanas respecto a las que se encuentran más distantes.

Un método extensamente utilizado para evaluar la existencia de correspondencia entre matrices de distancia genética y distancia geográfica es el propuesto por Mantel (1967) consistente en el coeficiente de regresión entre una medida y la otra. Para que dicha relación sea significativa la comparación de los datos observados con la distribución de las correlaciones surgidas de la aleatorización de una de las dos matrices debe ser diferente (Heywood 1991).

1.2.3 Variabilidad intrapoblacional

Para conocer la diversidad dentro de las poblaciones existen varios estadígrafos entre los que destacan el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis esperada (H_e). Polimórfico es aquel locus para el cual el alelo más común tiene una frecuencia de menos de 0.95, los alelos raros o poco comunes se definen como aquellos cuyas frecuencias son menores a 0.005. El límite de la frecuencia alélica, que se fija en 0.95 (ó 0.99) es arbitrario, y su objetivo es ayudar a identificar aquellos genes en los cuales es común la variación alélica (Hartl y Clark 1997).

El porcentaje de loci polimórficos, corresponde a la suma total de los loci que presentan polimorfismo (loci polimórficos observados), divididos por el número total de loci analizados. En el caso de marcadores dominantes, se considera que un locus es polimórfico cuando éste presenta sus dos variantes alélicas (presencia o ausencia

de banda) independientemente de su frecuencia y se estima mediante el porcentaje de bandas polimórficas (P).

La H_e se calcula asumiendo cruzamientos al azar donde **Presencia** será igual a la suma de las frecuencias de $AA + Aa = (p^2 + pq)$ y **Ausencia** es la frecuencia de $aa = p^2$, entonces $H_e = 1 - Sp^2$ (Lynch y Milligan 1994). La operación se repite para todos los loci y luego se obtiene el promedio. La H_e promedio de todos los loci es una estimación del grado de variabilidad genética en la población.

1.2.4 Estadísticos F

Los modelos que explican la estructura genética de poblaciones se fundamentan en la desviación de las mismas respecto a la ley de Hardy-Weinberg o panmixia, que asume tamaños poblacionales infinitos en poblaciones cerradas en las cuales no existe migración de individuos.

Los índices de fijación de Wright o estadísticos F son los más ampliamente utilizados para describir la estructura de poblaciones. Las subdivisiones en las poblaciones llevan a un exceso de homocigosis de modo que el efecto de subdivisión de poblaciones se mide en la reducción de la proporción de la heterocigosis total (Hartl y Clark 1997). Inicialmente los estadísticos F se desarrollaron para un locus y dos alelos (Wright 1951), posteriormente fue reformulado por Nei (1973) para datos multialélicos utilizando las medias de las heterocigosis de las subpoblaciones. Estos estadígrafos se definen como F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} .

Donde H_I es la heterocigosis promedio observada y si llamamos H_i al promedio de la heterocigosis de la i ésima subpoblación entonces para k poblaciones:

$$H_I = \sum H_i / k$$

H_S es la heterocigosis esperada de un individuo en una subpoblación en la que ocurren apareamientos al azar y $p_{i,s}$ es la frecuencia del i ésimo alelo en la subpoblación s .

$$H_S = 1 - \sum p_{i,s}^2$$

H_T es la heterocigosis esperada en un individuo si todas las subpoblaciones estuviesen fusionadas y ocurriesen apareamientos al azar.

$$H_T = 1 - \sum \bar{p}_{i,s}^2$$

El coeficiente de endocria F_{IS} , mide la reducción o el aumento en la heterocigosis observada en los individuos debido a los apareamientos no al azar dentro de su subpoblación y se define:

$$F_{IS} = (\bar{H}_s - H_i) / \bar{H}_s$$

Los efectos de la subdivisión poblacional son medidos mediante el índice de fijación (F_{ST}) que explica los cambios en la heterocigosis debido a la subdivisión poblacional y deriva genética, y es el estimador de diferenciación existente entre las poblaciones, se define:

$$F_{ST} = (\bar{H}_T - \bar{H}_s) / \bar{H}_s \text{ tiene valores entre 0 y 1.}$$

La reducción o el aumento en la heterocigosis observada en los individuos debido a los apareamientos no aleatorios dentro de su subpoblación se miden:

$$F_{IT} = (H_s - H_i) / H_s$$

Dependiendo del valor de F_{ST} , Hartl y Clark (1997) establecen el siguiente criterio para clasificar el grado de diferenciación entre poblaciones, así valores de F_{ST} entre 0.00 y 0.05 indican una diferenciación genética pequeña, entre 0.05 y 0.15 una diferenciación genética moderada, entre 0.15 y 0.25 diferenciación genética alta y F_{ST} mayores de 0.25 indican una diferenciación genética muy alta. En los casos para los cuales no es posible conocer las frecuencias de los alelos y por lo tanto tampoco medir la heterocigosis observada, se puede estimar la H_e .

Otro estimador de la diversidad entre poblaciones es el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA), se basa en un modelo jerárquico, que permite comparar diferentes niveles como regiones geográficas dentro de continentes o sitios dentro de regiones. Estima la variación de cada componente en porcentaje en función de la proporción de la varianza total, como tal podemos determinar cuál de los componentes de la variación es el más importante (Excoffier *et al.* 1992). Como estimador de F_{ST} se utiliza ϕ_{PT} , que se calcula:

$$\phi_{PT} = \text{Var}_{AP} / (\text{Var}_{AP} + \text{Var}_{WP})$$

Donde Var_{AP} es la *Varianza entre Poblaciones* y Var_{WP} es la *Varianza dentro de Poblaciones* (Peakall *et al.* 1995).

1.2.5 Estimadores de distancia genética

La distancia genética entre poblaciones se describe como la proporción de elementos genéticos (alelos, genes, gametos, genotipos) que no son compartidos por ambas muestras. La diversidad de Nei (1972) (h) es un estadístico con base biológica que expresa la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de dos poblaciones diferentes sean diferentes con relación a la probabilidad de que lo sean si son tomados de la misma población.

ϕ_{PT} puede ser también utilizado como indicador de la similitud entre poblaciones, al comparar las frecuencias alélicas, aquellas subpoblaciones que no presentan apareamiento entre sí tendrán frecuencias alélicas diferentes de las de la población total.

1.3ANALISIS MULTIVARIADO

1.3.1 Análisis de agrupamientos

Los análisis de agrupamientos o canónicos permiten formar conjuntos de muestras, poblaciones o individuos según sean similares o diferentes entre sí. Se basan en mediciones de similitud o disimilitud entre poblaciones o individuos.

Entre los muchos métodos para formar los grupos que existen, uno de los más usados son los agrupamientos jerárquicos. Esto significa formar grupos de jerarquías por similitud, de tal forma que los niveles superiores contengan a los niveles inferiores (Manly 1995).

Existen dos tipos de algoritmos, los aglomerativos son aquellos que parten de elementos individuales y se van agregando hasta formar grupos; y divisivos, que parten del conjunto de elementos y se van dividiendo sucesivamente hasta llegar a los elementos individuales.

UPGMA es un algoritmo aglomerativo. Construye un dendrograma sobre la base de la matriz de las distancias genéticas empezando por el par cuya distancia sea la menor, luego se continúa con las medias aritméticas de las distancias genéticas entre individuos poblaciones o regiones (Nei 1987).

1.3.2 Análisis de coordenadas principales

El Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) es un método multivariado de ordenamiento que se complementa con los métodos de agrupamiento. Los métodos de ordenamiento se consideran como una de las herramientas exploratorias que más se aproxima a la realidad biológica (Gauch 1982). El ACoP permite identificar vectores principales de conjuntos de datos, representa las distancias entre muestras y puede dar cabida a matrices de diferentes medidas de disimilitud. El procedimiento consiste en identificar el eje principal en base a la maximización de la correlación lineal de las variaciones de las muestras, cada uno de los ejes siguientes incorporará partes menores de la variación (Manly 1995).

1.4 MARCADORES RAPD

Desde la aparición en los años 80 de la tecnología de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), comenzó a tener un importante desarrollo en la biología el uso de técnicas con marcadores moleculares. Una de ellas es una técnica de marcadores moleculares dominantes llamada *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), (Williams *et al.* 1990). Utiliza cebadores arbitrarios de 10 pb para amplificar patrones de bandas polimórficas, se basa en la utilización de las condiciones poco restrictivas en la etapa de hibridación de los cebadores al ADN. Todas aquellas regiones del ADN en las cuales se produzca la unión de los cebadores resultarán amplificadas. El resultado es la obtención de un conjunto de fragmentos amplificadas, cuyo número y tamaño son característicos del cebador y del ADN molde utilizados. El polimorfismo (diferencias en el patrón de bandas) se produce por la existencia de diferencias entre individuos en la secuencia de bases del lugar de unión de los cebadores.

Los métodos en base a RAPDs requieren bajas cantidades de ADN, pueden brindar una buena caracterización de la cantidad y distribución de la variabilidad (Bachmann 2001). No requieren conocimiento previo del genoma a estudiar y tienen la capacidad de producir un número importante de bandas de información, lo que los hace muy atractivos para el estudio de especies cuyo genoma aún no se conoce (Kremer *et al.* 2005). Por esta razón es que se han realizado numerosos estudios de diversidad de poblaciones y estructura genética en diversas especies (Muthusamy *et al.* 2008; Wang *et al.* 2006; Vieira *et al.* 2004; Kapteyn y Simon 2002; Gustafson *et al.* 1999). Varios estudios de diversidad muestran que los marcadores dominantes brindan información comparable con los codominantes (Yang *et al.* 1996; Nybom y Bartish, 2000; Belaj, 2003; Nybom, 2004; Yu *et al.* 2005) con procedimientos más simples, menores necesidades de inversión, bajo costo por análisis (Hadrys *et al.* 1992).

2. DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y SISTEMA REPRODUCTIVO DE *Stipa neesiana* Trin. et Rupr. EN URUGUAY

2.1. SUMMARY

Stipa neesiana is a cool-season perennial grass valued as an important genetic resource in Uruguay. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) molecular markers were used in order to characterize the distribution of genetic diversity and breeding system in this species. Five primers were selected which generated 71 RAPD bands. Using these primers, 270 individuals from nine populations and seven progenies were studied. Our results show a selfing rate close to 100%. The parameters expected heterozygosity (H_e) and percentage of polymorphic bands (P), showed that considerable genetic variability can be found within populations. The study of genetic variability among populations as analyzed by the estimator of Wright's fixation index (F_{ST}) yielded a value of 0.44 which shows that there is significant differentiation among populations. A pattern of isolation by distance was not observed; however, structuring in the genetic distances among populations can be observed in the groupings recovered.

2.2. RESUMEN

Stipa neesiana es una gramínea forrajera invernal perenne de gran valor como recurso fitogenético en Uruguay. Para caracterizar la distribución de la diversidad genética y el sistema reproductivo de esta especie se utilizó la técnica de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Se seleccionaron cinco iniciadores que generaron 71 bandas de RAPD; se estudiaron 270 plantas de nueve poblaciones y siete progenies. Los resultados obtenidos muestran un porcentaje de autogamia cercano al 100%. Los parámetros heterocigosis esperada (H_e) y porcentaje de bandas polimórficas (P), evidenciaron una amplia variabilidad dentro de las poblaciones. El análisis de la diversidad genética entre las poblaciones estudiadas mediante el estimador de índice de fijación de Wright (F_{ST}) generó un valor de 0,44, lo que demuestra una significativa diferenciación genética entre las poblaciones. No se observó aislamiento por distancia, sin embargo las distancias genéticas entre poblaciones muestran una estructuración que se hizo evidente en los agrupamientos obtenidos.

2.3. INTRODUCCIÓN

El campo natural es una de las principales riquezas del Uruguay. Ocupa el 71% de la superficie útil, con más de 11 millones de hectáreas (DIEA, 2001). Es el recurso natural renovable que sustenta la producción ganadera y una pieza clave para la conservación de otros recursos como suelo, agua y fauna (Altesor *et al.*, 2006).

Presenta una gran abundancia de especies (Rosengurtt *et al.*, 1939) y es donde ocurre la mayor diversidad de forrajeras nativas, el recurso fitogenéticos más importante del país (Berretta *et al.*, 2007). La diversidad de especies se explica en parte por las variaciones en las características de topografía, propiedades físico químicas del suelo (Coughenour, 1991).

En particular las diferentes formas de pastoreo de la ganadería pueden aumentar la diversidad del campo natural al evitar la predominancia de especies o disminuir la diversidad al homogeneizar áreas muy diversas donde las especies más palatables son más afectadas (Cingolani *et al.*, 2008, Adler *et al.*, 2001, Millot *et al.*, 1987).

Dentro de las forrajeras promisorias, Rosengurtt (1979) destaca gramíneas y leguminosas de los géneros *Bromus*, *Paspalum*, *Stipa*, *Adesmiay Trifolium*, entre otras.

A la fecha se han realizado estudios de la diversidad genética de unas pocas especies en Uruguay (Speranza, 2005, Rivas, 2001), sin embargo hay muchas especies que no han sido estudiadas (Berretta *et al.*, 2007). *Stipa neesiana* Trin. & Rupr. 1842 (syn. *Stipa setigera* Presl. 1830; *Nassella neesiana* (Trin. & Rupr.) Barkworth), $2n = 2x = 28$ (Bowden y Senn, 1962) es una gramínea cespitosa perenne invernal del campo natural.

Originaria de América del Sur (Longhi-Wagner y Zanin, 1998) se encuentra en Uruguay en todo el territorio (Rosengurtt *et al.* 1970). Se ha reportado en Australia y Nueva Zelanda (Clayton *et al.*, 2006) y en Islas Canarias e Islas Baleares (Wildpret de la Torre *et al.*, 1999) como invasora.

Esta especie es conocida por su fruto «flechilla» provisto de un apéndice punzante o *callus*, que favorece su diseminación (Izaguirre, 1993). Por ser una de las gramíneas invernales más frecuentes de nuestros campos y por sus buenas

características productivas (Rosengurtt, 1979), se constituye en el principal aporte invernal a los rodeos de cría (Berreta *et al.*, 1990).

Su calidad y persistencia mejoran con cortes aliviados (Lacuague y Durán, 1989; Boggiano, 1990) así como pastoreos controlados y la fertilización nitrogenada pueden aumentar su macollaje y oferta forrajera (García *et al.*, 2005). Esta especie resulta muy útil además en la regeneración de praderas naturales y para repoblar zonas erosionadas por su capacidad colonizadora (Burkart, 1969; Rosengurtt, 1946).

El sistema reproductivo se considera como autógeno en base a observaciones morfológicas realizadas en esta especie, que ha sido descrita como cleistógama con espiguillas cleistógenas (Connor 1979, Rosengurtt *et al.*, 1970, Rosengurtt, 1946).

Si bien estas observaciones permiten considerar que la especie se reproduce principalmente por autogamia, no se han llevado a cabo estudios del sistema reproductivo efectivo de la especie.

La proporción de fecundación cruzada que presenta una especie en condiciones naturales, puede ser determinada a través del análisis de los genotipos de familias de medios hermanos con marcadores genéticos codominantes o dominantes, con o sin control parental (Frankel y Galun, 1977, Ritland y Jain, 1981).

Respecto a la diversidad de *Stipa neesiana*, Arechavaleta (1894-97) y Burkart (1969) describen en conjunto cinco variedades para la especie en base a caracteres como volumen y pilosidad de nudos, ángulo de entrenudos, forma y pilosidad de hojas, tamaño y superficie de antecio y longitud de corona y aristas. Rosengurtt *et al.* (1970) mencionan para Uruguay las variedades *neesiana* y *longiaristata*.

Arechavaleta (1894-97) basa esta diferenciación en la ausencia de pelos tanto en nudos como en hojas y en las dimensiones de las espiguillas y sus aristas («espiguillas grandes con aristas larguísimas»), mientras que Rosengurtt *et al.* (1970) definen esta variedad como aquellos ejemplares de la especie que poseen lemmas de base lisa y brillante, sin hacer referencia al tamaño de la espiguilla ni al largo de sus aristas.

Las poblaciones naturales suelen mostrar diferencias en las frecuencias de alelos y genotipos de una región geográfica a otra. Esas estructuras geográficas en subpoblaciones pueden tener profundos efectos en la evolución de las especies (Hartl

y Clark, 1997). Las diferenciaciones genéticas entre las poblaciones están afectadas por los sistemas reproductivos. En las autógamias la autopolinización aumenta los niveles de homocigosis y también incrementa la diversidad entre poblaciones (Hamrick y Godt., 1990). El conocimiento de estas características de diversidad y estructura genética son claves para la valoración de las especies nativas como recurso fitogenético, y para desarrollar estrategias óptimas de muestreo, conservación y mejoramiento (Frankel *et al.*, 1995).

A nivel morfológico, Rosengurtt *et al.* (1970) hacen referencia a una cierta zonificación en la distribución geográfica de la variedad *longiaristata*. Por otra parte, Symonds y Villagrán (1988), buscando descriptores morfológicos adecuados para la especie analizaron 34 variables.

Estos autores encontraron que las diferencias entre poblaciones fueron mayores que dentro de poblaciones para todos los descriptores analizados, aunque el número de individuos estudiados por población fue bajo (10). Sólo se consideraron con mayor poder de discriminación ocho descriptores, de los cuales las variables: fecha de emergencia, largo y ancho de hoja, largo de panoja y ancho de fruto se correlacionaron con la distribución geográfica encontrándose fechas de emergencia más tempranas y dimensiones de fruto y hoja mayores en las poblaciones del norte del país respecto a los de poblaciones del sur. A pesar de esto, la información es fragmentaria y no existen resultados concluyentes.

Para diseñar adecuadamente estrategias de conservación y uso con resultados exitosos, es imprescindible conocer previamente la magnitud y distribución de la variabilidad genética de las especies a estudiar (Ramanatha Rao y Hodgkin, 2002). La información publicada indica que *S. neesiana* presenta mecanismos morfológicos que favorecen la autogamia y por lo tanto se espera que una proporción considerable de la variabilidad genética se encuentre distribuida entre poblaciones.

El objetivo del presente trabajo es determinar el sistema reproductivo y cuantificar la variabilidad genética que existe entre y dentro de las poblaciones naturales de *S. neesiana* utilizando marcadores moleculares. Teniendo en cuenta lo fragmentario de la información y las inconsistencias entre los distintos autores, se tomará la especie como un todo.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Colecta y extracción de ADN

Para el estudio de diversidad se trabajó con dos poblaciones colectadas en el campo y siete regeneradas a partir de semillas conservadas en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía. Las poblaciones colectadas (1 y 2) se encuentran en dos predios del departamento de Soriano, distantes entre sí 20 km. Se seleccionaron muestras de hojas de 30 plantas individuales por sitio. Las muestras fueron secadas y almacenadas en bolsas plásticas con silica gel para su traslado y conservación.

Las poblaciones regeneradas (3 a 9) se escogieron por ser representativas de sitios diferentes y alejados entre sí dentro del Uruguay (Figura 2). Se regeneraron en invernáculo 30 individuos por población, las plántulas se trasplantaron al jardín de la Facultad de Agronomía y de cada planta regenerada se colectó una hoja para la extracción de ADN. Para el estudio del sistema reproductivo se cosecharon semillas producidas en condiciones naturales por cinco individuos en su población de origen (Población 2).

Las semillas fueron cosechadas en el mismo momento en que se muestrearon las plantas madres en el campo por lo que cada muestra consistió en la semilla presente en ese momento en cada individuo. La muestra se complementó con semillas de dos individuos pertenecientes a diferentes poblaciones regeneradas; en este caso las plantas madres estaban instaladas en una misma parcela junto con toda la colección de poblaciones regeneradas.

Toda la semilla obtenida se utilizó para confeccionar germinadores y las plántulas resultantes fueron conservadas en invernáculo. Se analizó un total de 71 individuos para las siete progenies además de las siete plantas madres. El número de individuos recuperados por progenie varió entre tres y veinte. La extracción del ADN se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Agronomía siguiendo un protocolo estándar CTAB-Cloroformo: Alcohol isoamílico (Doyle y Doyle, 1987). El

ADN extraído fue cuantificado en un NanoDrop «Thermo Scientific1000» mediante el análisis directo de un micro-volumen de muestra sin diluir, obteniendo la concentración de ADN en ng/uL y el valor del cociente entre la absorbancia a 260 y 280 nm.



Figura 2. Ubicación de las poblaciones estudiadas. 1 y 2 corresponden a las colectas en Soriano. 3 a 9 corresponden a las ubicaciones de las accesiones del Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía.

Para la amplificación de ADN con iniciadores de RAPD (Williams *et al.* 1990) se utilizó una mezcla de reacción de 20 μ L conteniendo alrededor de 120 ng de ADN con un cociente de absorbancia a 260/280 nm de aproximadamente 1,8. La mezcla de reacción consistió en concentraciones finales de 1,8 mM de $MgCl_2$, 0,14 mM de dNTPs, 0,36 μ M de iniciador, en el tampón provisto por el fabricante conteniendo 0,8 U de Taq ADN polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador «Thermo PX2» con las siguientes condiciones: una pre-desnaturalización de 5 min a

94 °C, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 30s (desnaturalización), 35 °C por 30s (hibridación), 72 °C por 2 min (extensión) y 5 min a 72 °C de extensión final. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,8% con tampón TBE 1X a 5 V/cm durante tres horas.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 mg/mL), se visualizaron bajo luz ultravioleta y fueron fotografiados digitalmente para su análisis posterior.

Previo al análisis de las poblaciones se evaluaron doce iniciadores de la serie Operon Technologies, (Alameda, Estados Unidos) con 20 individuos de cinco poblaciones. Los iniciadores fueron elegidos según el número de bandas amplificadas, número y porcentaje de bandas polimórficas (*P*). Para los cinco iniciadores seleccionados, se realizó un ensayo de reproducibilidad con los mismos once individuos.

Las imágenes obtenidas fueron convertidas en matrices de presencia/ausencia con la ayuda del programa de análisis de imágenes Cross-Checker V 2.91 (Buntjer 2000) utilizando el criterio de que las bandas teñidas con similar intensidad en repetidas reacciones son las más predecibles (Heun y Helentjaris 1994). Para ello se estableció un umbral relativo en la intensidad de las bandas que se consideraron para confeccionar la matriz. Éste se estableció en base a los valores mínimos que presentaron las bandas que resultaron consistentes entre diferentes reacciones del mismo individuo con un mismo iniciador.

2.4.2. Análisis de datos

El análisis de reproducibilidad se realizó asignando valores de 1 para las bandas consistentes y de 0 para las inconsistentes en sucesivas repeticiones del mismo individuo con el mismo iniciador en distintas reacciones. El promedio obtenido para el total de individuos evaluados por iniciador refleja por lo tanto la proporción de bandas consideradas reproducibles con cada iniciador.

El nivel de autofecundación se estimó calculándola tasa de alogamia para múltiples loci (*t_m*) con el método de máxima verosimilitud implementado en el programa MLTR 3.2 (Ritland, 2002). Para evaluar el error estándar se tomaron 1000 muestras bootstrap.

La diversidad genética de las poblaciones se estimó con el número de loci polimórficos (P) como índice de riqueza genética y la heterocigosis esperada (H_e) como índice de diversidad. La H_e se estima bajo el supuesto de equilibrio utilizando la frecuencia de las ausencias para cada locus como la frecuencia del genotipo homocigoto recesivo, mientras que bajo el supuesto de homocigosis total la frecuencia de los fenotipos presencia y ausencia son iguales a las frecuencias de los alelos correspondientes. Las evaluaciones se realizaron bajo ambos supuestos con el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse 2006).

Para estudiar la relación entre poblaciones se estimó el índice de diversidad genética de Nei (h), (Nei, 1972) y se construyeron dendrogramas usando el algoritmo UPGMA, basados en una matriz de distancias de Nei tanto asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg como homocigosis completa. Las matrices de distancia y los dendrogramas fueron obtenidas con el programa POPGENE 1.32 (Yehy Boyle, 1997).

Con el fin de poder conocer la estructura de la diversidad genética entre y dentro de poblaciones se realizó un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) para obtener un estimador del índice de fijación de Wright (1951), (F_{ST}). Mediante la prueba de Mantel (Mantel, 1967) se evaluó la hipótesis de aislamiento por distancia como modelo de estructura de poblaciones. Para ello se usó una matriz de distancias geográficas en base a las coordenadas decimales de latitud y longitud de cada sitio de colecta y una matriz de distancias de Nei.

Con fines exploratorios, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) por poblaciones y por individuos. Para estas estimaciones se utilizó el programa GenAIEx 6.0 (Peakall y Smouse, 2006).

2.5. RESULTADOS

Los 12 iniciadores evaluados presentaron entre cinco y 20 bandas amplificadas y de tres a 10 bandas polimórficas. Los cinco iniciadores seleccionados (OPA-11, OPB-06, OPD-03, OPF-06 y OPV-14) mostraron una reproducibilidad de entre 60 y 80 por ciento con un promedio de 13 bandas polimórficas por iniciador (Cuadro 2).

En el estudio de las nueve poblaciones, estos iniciadores amplificaron 71 bandas analizables totales de un tamaño molecular estimado de entre 1933 y 311 pb.

Cuadro 2. Reproducibilidad y número de bandas de los iniciadores seleccionados

Cebador	Secuencia	%Rep.	BP
OPA-11	5'CAATCGCCGT3'	60	13
OPB-06	5'TGCTCTGCCC3'	63	16
OPD-03	5'GTCGCCGTCA3'	75	15
OPF-06	5'GGGAATTCGG3'	60	13
OPV-14	5'AGATCCCGCC3'	80	14

(%Rep.) Porcentaje de Repetibilidad; (BP) Número de bandas polimórficas.

En consideración a las distorsiones en la forma del frente de la corrida electroforética, se consideró que fragmentos con diferencias de hasta un 3% en el tamaño estimado por el programa Cross Checker en diferentes geles podían corresponder aun mismo locus.

No se observó ninguna variabilidad consistente dentro de las progenies analizadas mientras que cada progenie produjo un patrón de bandas claramente diferente (Figura 3). El resultado del análisis de estos datos arrojó valores de t_m de 0,001 con un error estándar menor a 0,0001 tanto para las progenies colectadas en el campo como para las progenies obtenidas de la población con individuos regenerados de poblaciones diferentes.

Un resumen de la diversidad dentro de las poblaciones estudiadas se presenta en el Cuadro 3. Los valores de P máximo y mínimo variaron entre 46 y 18% respectivamente con una media de 34%. El índice H_e para las distintas poblaciones varió entre 0,180 y 0,052 con una media de 0,129 bajo el supuesto de equilibrio y entre 0,187 y 0,073 con una media de 0,130 bajo el supuesto de homocigosis. Estos valores muestran un amplio rango de variación entre las poblaciones estudiadas

donde la población6 presentó la mínima diversidad y la población4 la máxima bajo ambos supuestos.

En el ACoP de los 270 individuos (Figura 4) la Coordenada 1 explica el 26% de la variación total y con la Coordenada 2 ambos ejes acumulan un 45%de la variación. El diagrama muestra a la mayoría de las poblaciones agrupadas aunque los individuos de algunas poblaciones aparecen distribuidos en más de un grupo. En particular, la población 3 se distribuye ampliamente en los dos cuadrantes superiores aunque predomina en el izquierdo (23 individuos),mientras que más concentrada, la población 8 se distribuye en forma opuesta entre los cuadrantes inferiores y predominantemente sobre el derecho (24individuos). Las poblaciones 1, 9 y 4 se encuentran en su totalidad en un cuadrante diferente cada una.

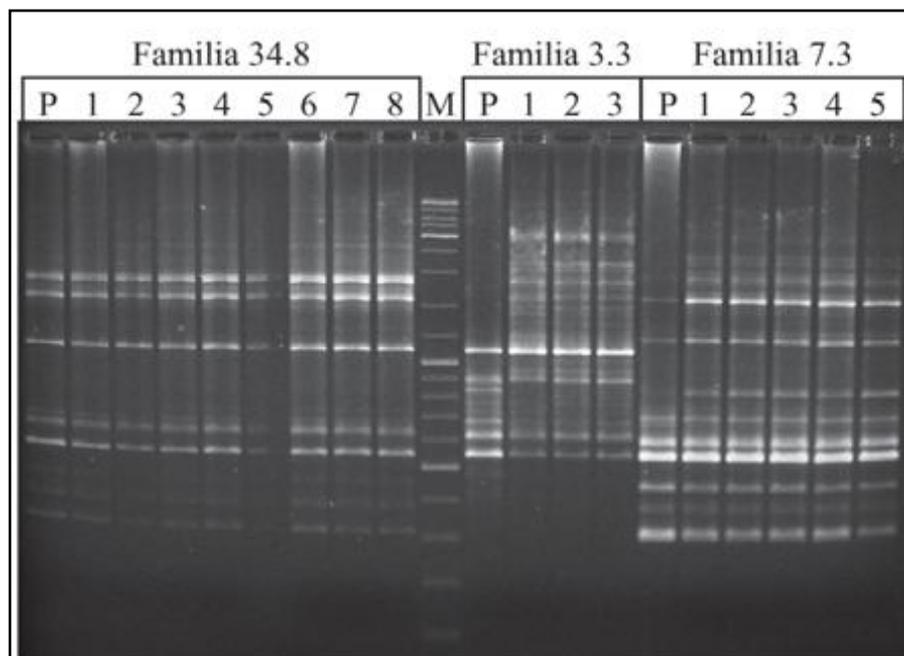


Figura 3. Patrones de bandas de RAPD obtenidos con el iniciador OPV14 para individuos de tres familias constituidas por una planta madre (P) y la progenie obtenida de la semilla producida en condiciones de libre polinización. El carril correspondiente al marcador de peso molecular se indica con M.

Cuadro 3. Datos de pasaporte de las poblaciones de *S. neesiana* estudiadas y estimación de la diversidad genética intrapoblacional.

Localidad	Depto	Año	Lat.	Long.	N	H _{e1}	H _{e2}	BP	P
A° Las Asperzas	Soriano	2005	S33.52435	W57.60397	30	0,159	0,123	27	38,0%
A° del Perdido	Soriano	2005	S33.50590	W57.38617	30	0,146	0,165	29	40,9%
R. 13; A° Z. Honda	Rocha	1986	S34.05185	W54.07912	30	0,095	0,124	23	32,4%
R. 3 K. 424	Paysandú	1980	S32.16320	W57.99907	30	0,181	0,187	33	46,5%
R.3; Río Dayman	Paysandú	1979	S31.44815	W57.86624	30	0,154	0,131	26	36,6%
R. 26 K 113;Glencoe	Paysandú	1979	S31.85663	W57.00173	30	0,052	0,073	13	18,3%
R. 12 Sierra Carapé	Lavalleja	1979	S34.31451	W54.78506	30	0,119	0,119	19	26,8%
R. 6 Est. El Rincón	Florida	1979	S33.50038	W56.00181	30	0,154	0,139	28	39,4%
R. 1 K.112 A° Cufre	Colonia	1982	S34.34272	W57.12679	30	0,106	0,118	20	28,2%
Media					30	0,130	0,131	24	34,1%
Total					270			69	97,2%

N= número de individuos utilizados para el análisis; H_{e1} = Heterocigosis esperada (en equilibrio H-W), H_{e2} = Heterocigosis esperada(enHomocigosis), BP= número de bandas polimórficas; P= porcentaje de bandas polimórficas

La población 1 es la predominante junto con la mayor parte de la población 8 en el cuadrante inferior derecho. La sección superior derecha reúne a las poblaciones 4; 2 y parte de la 3. Las poblaciones 5; 6 y 7 en su mayoría se concentran en el cuadrante inferior izquierdo.

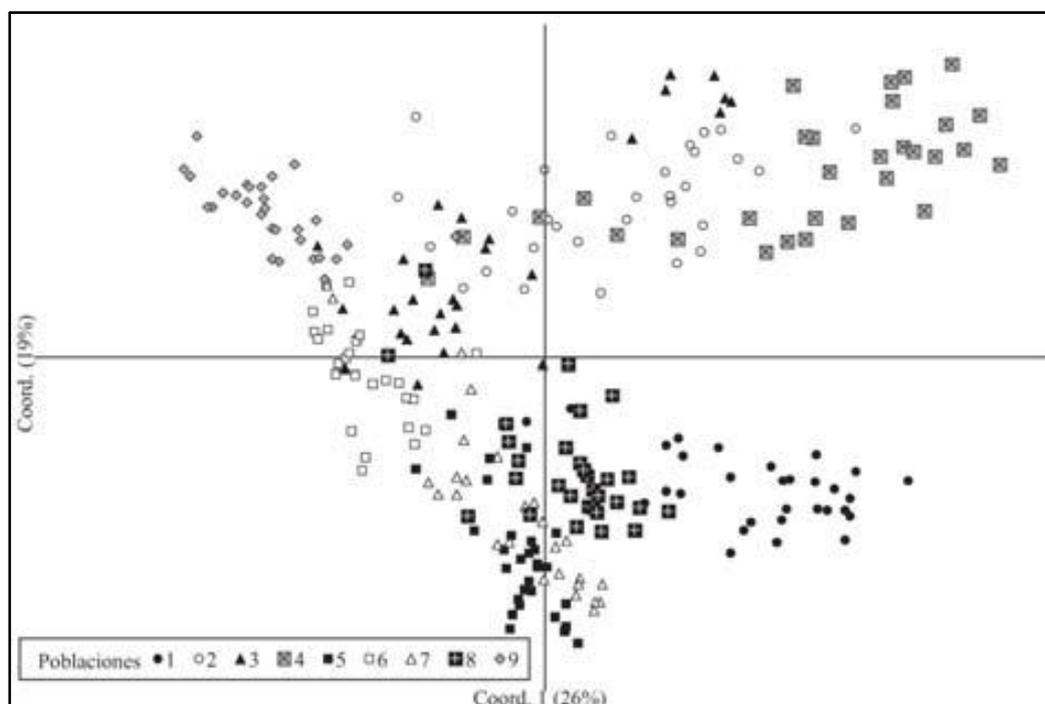


Figura 4. Análisis Coordenadas Principales para los 270 individuos analizados con RAPD.

Existe una diversidad entre poblaciones del 44% y dentro de las poblaciones del 56% (Cuadro 4). El valor de Φ_{ST} de 0,440 fue altamente significativo ($p < 0,001$; 1000 permutaciones). En cuanto a las diferencias entre las poblaciones, el Cuadro 5 resume el índice de la diversidad de Nei (h) y Φ_{ST} . Los valores de h con una media de 0,175 varían entre 0,071 (poblaciones 3 y 6) para las más similares y 0,295 (poblaciones 9 y 1) para las más distantes. Los valores de Φ_{ST} varían entre 0,273 para las poblaciones más cercanas (poblaciones 2 y 3) y 0,593 para las poblaciones más distantes (poblaciones 1 y 9) con una media de 0,4395.

En el dendrograma bajo el supuesto de homocigosis total no hay grandes diferencias entre las poblaciones; las poblaciones 1 y 8 aparecen más agrupadas pero distantes entre sí y las poblaciones 3, 6 y 7 se mantienen agrupadas (Figura 5A). Con el supuesto de Equilibrio de Hardy-Weinberg se encuentra la población 1 más distante y las poblaciones 3, 6 y 7 agrupadas (Figura 5 B).

Cuadro 4. AMOVA para 270 individuos de *Stipa neesiana* usando RAPD.

Fuentes de Variación	g. de l.	S. de C.	Comp. Var.	% Var.
Entre Poblaciones	8	1322,674	5,287	44%
Dentro de Poblaciones	261	1752,933	6,716	56%
Total	269	3075,607	12,003	

Cuadro 5. Matriz de distancias genéticas entre poblaciones.

	<i>Pob1</i>	<i>Pob2</i>	<i>Pob3</i>	<i>Pob4</i>	<i>Pob5</i>	<i>Pob6</i>	<i>Pob7</i>	<i>Pob8</i>	<i>Pob9</i>
<i>Pob1</i>	X	0,443	0,504	0,41	0,57	0,572	0,414	0,471	0,593
<i>Pob2</i>	0,186	X	0,273	0,307	0,487	0,408	0,426	0,432	0,44
<i>Pob3</i>	0,225	0,105	X	0,308	0,418	0,312	0,392	0,394	0,403
<i>Pob4</i>	0,182	0,15	0,143	X	0,462	0,462	0,434	0,4	0,441
<i>Pob5</i>	0,233	0,236	0,154	0,249	X	0,523	0,393	0,469	0,558
<i>Pob6</i>	0,187	0,132	0,071	0,198	0,162	X	0,395	0,451	0,439
<i>Pob7</i>	0,112	0,166	0,126	0,188	0,108	0,085	X	0,458	0,463
<i>Pob8</i>	0,186	0,228	0,159	0,211	0,204	0,155	0,183	X	0,478
<i>Pob9</i>	0,302	0,195	0,126	0,218	0,254	0,099	0,145	0,227	X

Por encima de la diagonal: Φ_{ST} . ($p < 0.001$ basadas en 1000 permutaciones); por debajo: h .

Los primeros tres ejes en el ACoP para las nueve poblaciones explican el 78% de la variación total (Figura 6). Existen algunas poblaciones agrupadas como 3, 5, 6 y 7, y otras aisladas como 1, 2, 4, y 8. La población 8 está separada y muy distante del

resto. Las poblaciones 1 y 4 son opuestas y alejadas del núcleo. La población 2 también se encuentra alejada del grupo central pero cercana a la 4.

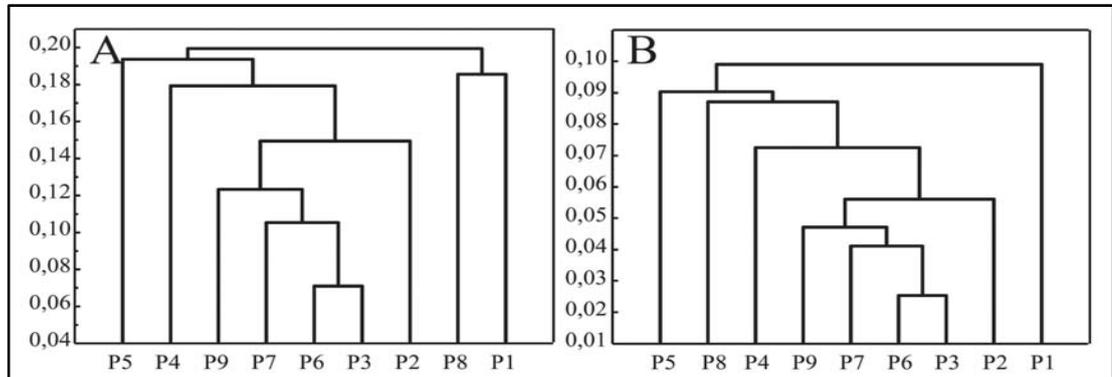


Figura 5. Agrupamientos basados en h para las nueve poblaciones usando UPGMA. A) supuesto de homocigosis. B) supuesto de equilibrio de H-W.

El resultado obtenido con la prueba de Mantel para las matrices de distancia genética y geográfica muestra que la correlación entre ambas es prácticamente nula ($r = 0,0008$; $p < 0,001$; 1000 permutaciones), con una importante dispersión $r^2 = 0,011$ (Figura 7).

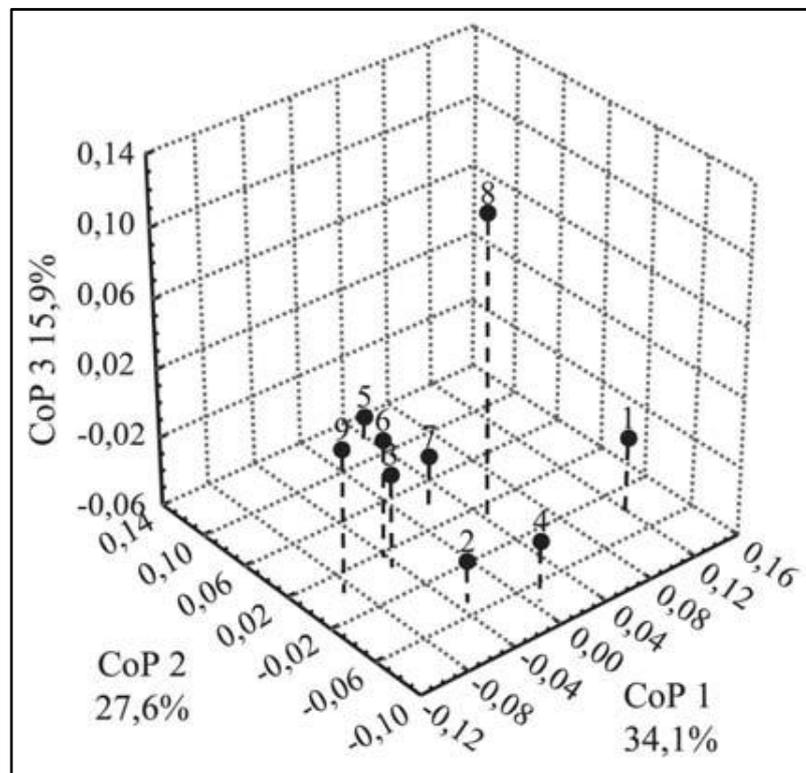


Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales de las nueve poblaciones analizadas mediante RAPD.

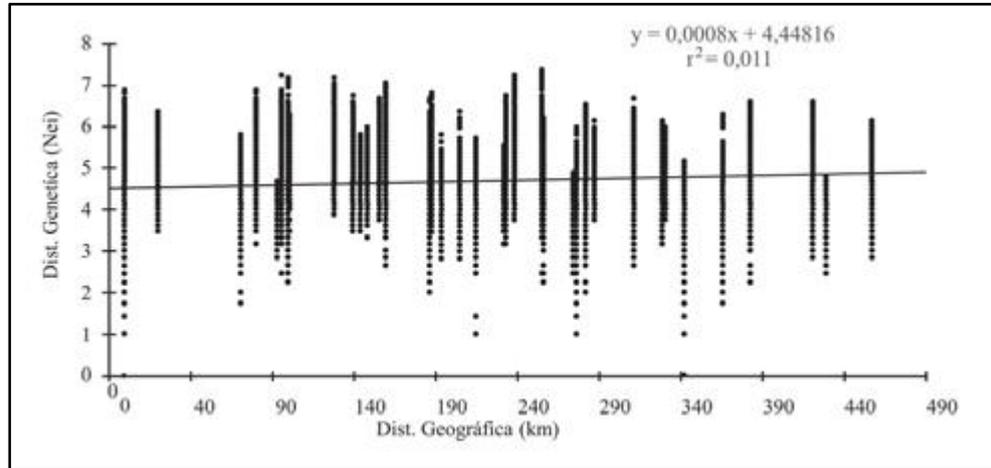


Figura 7. Correlograma entre distancia geográfica distancia genética para todos los individuos de las nueve poblaciones de *S. neesiana*.

2.6. DISCUSIÓN

El presente trabajo enmarca el primer esfuerzo para estudiar la diversidad genética de *S. neesiana* con marcadores moleculares. Los valores promedio de reproducibilidad obtenidos son cercanos al 75% logrado en diferentes evaluaciones de reproducibilidad para RAPD (Jones *et al.*, 1997; Penner *et al.*, 1993) lo que indica que se obtuvieron condiciones de confiabilidad esperables para la técnica utilizada.

2.6.1. Sistema reproductivo

En base a los resultados obtenidos, se estima que el porcentaje de autogamia es cercano al 100%, lo que es coincidente con las observaciones de Connor (1979) y Rosengurtt (1946) y con los valores de diversidad (Hamrick y Godt, 1990). Si bien en el muestreo de progenies presentado en este trabajo no se detectó ningún evento de fecundación cruzada, es posible que exista un bajo porcentaje de alogamia que genera variabilidad en las poblaciones. La detección de estos eventos requeriría un muestreo más extenso que el que se presenta aquí, sin embargo los resultados obtenidos permiten considerar la especie como altamente autógena.

2.6.2. Diversidad intrapoblacional

La riqueza genética puede ser determinada mediante los parámetros de diversidad genética, porcentaje de bandas polimórficas y heterocigosis esperada. El P promedio para las nueve poblaciones estudiadas fue de 34%. Estos valores fueron inferiores a los encontrados con RAPD para otras especies del género *Stipa* como *S. grandis* con valores entre 89% (Shan *et al.*, 2006) y 76% (Zhao *et al.*, 2008), *S. kriyovii* 97% (Wang *et al.*, 2006) y otras gramíneas también autógenas como *Poa trivialis* 85% (Rajasekar *et al.*, 2006).

Los valores obtenidos para *S. neesiana* son intermedios y congruentes con el rango obtenido por Hamrick y Godt (1990) para pasturas perennes a partir de estudios realizados con isoenzimas (28% y 39%) y similares a los valores para otras gramíneas autógenas como *Oryza rufipogon* 32% (Ge *et al.*, 1999) con RAPD. El valor de H_e promedio de las poblaciones estudiadas de 0,13 es menor al hallado con la misma técnica para especies autógenas de *Stipa* como *S. grandis* 0,32 (Zhao *et al.*,

2008), *S.krylovii* 0,162 (Wang et al. 2006) y 0,226 (Han et al., 2003). Es similar al promedio de 0,12 para ocho especies autógamas (Schoen y Brown, 1991) y superior al 0,09 obtenido por Hamrick y Godt (1990) para siete especies autógamas. En base a estos parámetros, la diversidad intrapoblacional en las poblaciones estudiadas resulta media a alta para especies con el mismo sistema reproductivo y forma de dispersión, lo que deberá ser tomado en cuenta al planificar futuras colecciones de esta especie en Uruguay.

2.6.3 Diversidad intrapoblacional

La comparación de la diversidad genética entre las poblaciones estudiadas mediante AMOVA refleja una significativa diversidad. El valor de Φ_{ST} de 0,44 obtenido está revelando una alta variabilidad entre las poblaciones de *S. neesiana* y se considera como indicador de una importante estructura entre las poblaciones (Heywood 1991), así mismo para Hartl y Clark (1997) los valores de F_{ST} superiores a 0,25 reflejan un alto grado de diferenciación entre poblaciones. En la actualidad está claramente establecido que la estructura de las poblaciones de plantas está definida entre otros factores por el sistema reproductivo, flujo de genes (la forma de dispersión del polen, la dispersión y reclutamiento de semillas), deriva, selección y adaptación (Hamrick y Godt, 1990). En comparación con gramíneas perennes con diferentes sistemas reproductivos, *S. neesiana* presenta una diversidad entre poblaciones superior a especies alógamas del género como *S. krylovii*, con 36% (Wang et al., 2006), de *S. grandis* con el 25% (Zhao et al., 2008) y 38% para *Sesleria albicans* (Reisch, 2003).

En un estudio de resultados experimentales de 32 especies autógamas, los valores de F_{ST} variaron de entre 0,026 a 0,78. Con un valor promedio de 0,51 (Hamrick y Godt, 1990). Asimismo es coincidente la media de h hallada de 0,13 con los valores encontrados por Schoen y Brown (1991) para ocho especies autógamas usando isoenzimas (máximo 0,294, mínimo 0,008 y una media de 0,125). En el caso de *Poa annua*, con RAPD, el índice h para 47 poblaciones fue de 0,241 (Mengistu et al., 2000). Los datos obtenidos estarían indicando no sólo la existencia de una importante diversidad entre las poblaciones estudiadas sino que los niveles

detectados son típicos de especies autógamas. En las especies en que las semillas representan la principal etapa de traslado, su dispersión es el proceso demográfico preponderante, de modo que influye en la estructura genética (Nathan y Muller-Landau, 2000). Hamrick y Godt (1990) en una revisión de trabajos de diversidad con isoenzimas para 52 especies con dispersión por zoocoría encontraron valores de G_{ST} de 0,25. Por otra parte, Green *et al.* (2001) para un estudio de diversidad con dos niveles de muestreo (predio y país) de *Anisantha sterelis*, una especie reportada como autógama, encontraron contrastes en la diversidad dentro de los sitios de colecta (F_{ST} entre 0,41 a 0,11; media 0,31).

Una de las explicaciones propuestas para este fenómeno es un escenario de aumento de las migraciones de larga distancia de las semillas debido a los traslados de maquinaria y de los rastrojos de cosechas para la alimentación del ganado. Vittoz y Engler (2007) establecen que las especies con semillas capaces de adherirse a los animales mayores como ovejas y vacunos pueden dispersarse a grandes distancias, las que se incrementan por los fenómenos de trashumancia en períodos secos. Gardener *et al.* (2003) estudiaron los mecanismos de dispersión de *S. neesiana* concluyendo que el 25% de los frutos se mantenían en la lana luego de cinco meses y cerca del 50% se mantenían viables luego de ser digeridas por el ganado; por otra parte en la dispersión por viento la mayoría de las semillas quedaron a 1 m de la planta madre. Connor *et al.* (1993) y Bourdôt y Hurrel (1989) estudiando la dispersión de *S. neesiana* en Nueva Zelanda establecieron que los principales mecanismos son el traslado del ganado y la maquinaria. Si bien los valores de diversidad obtenidos para *S. neesiana* son levemente superiores a los esperables para especies con estos mecanismos de dispersión, los muestreos realizados no permiten asociar el patrón de distribución de la diversidad de las poblaciones con los traslados de animales requeridos para las sucesivas etapas de cría, recría y engorde. Esto deberá ser considerado en el diseño de futuros trabajos.

2.6.4 Variación geográfica

Los dendrogramas y los análisis de Coordenadas Principales permiten visualizar un conjunto de poblaciones agrupadas aunque diferenciadas entre sí

rodeado de un grupo de poblaciones que ocupan posiciones más periféricas en el ordenamiento y que no aparecen agrupadas. Este ordenamiento no pudo ser asociado con factores geográficos o ecológicos por lo que no surge ningún patrón evidente de distribución espacial de la variabilidad genética interpoblacional.

Para otros modelos de especies herbáceas suficientemente estudiados en Uruguay, se han encontrado diferencias entre las regiones norte y sur en general tanto utilizando marcadores moleculares como en el caso de *Turnera sidoides* (Speranza *et al.*, 2007) o morfológicos como en el caso de *Petunia axillaris* (Ando *et al.*, 1994). Estos patrones son congruentes con la información preliminar disponible para *S. neesiana* (Symonds y Villagrán, 1988).

Sin embargo en el presente trabajo, la prueba de Mantel para la escala geográfica estudiada no muestra un nivel de correlación significativa entre las distancias geográficas y genéticas entre poblaciones, como se esperaría bajo un modelo de aislamiento por distancia y como sucede con *Stipa capillata* cuyas poblaciones del centro de Europa son relictuales con escasa dispersión de polen y semillas (Hensen *et al.*, 2009). Esto puede suceder en los casos en que la distribución de la variabilidad es no lineal, o casos extremos de patrones de variación regulares o alternos (Heywood, 1991). Por otra parte, si la variación observada es el resultado de la selección natural ambientalmente inducida, la similitud entre poblaciones deberá reflejar la similitud entre ambientes, será independiente de la distancia geográfica y no se verá reflejada en la distribución demarcadores genéticos neutros (Volis *et al.*, 2001).

Si bien la caracterización fenotípica de los materiales no fue el objetivo del presente trabajo, se realizaron observaciones morfológicas preliminares en algunos individuos de cada población. Estas observaciones sugieren que la población 9 podría corresponder a la subespecie *longiaristata* descrita por Arechavaleta (1895). Esta población sin embargo no aparece como genéticamente diferenciada de las demás. La determinación de la diferenciación genética entre entidades infraespecíficas de *S. neesiana* probablemente requiera de una estrategia de muestreo específicamente diseñada con este propósito.

En conclusión los resultados obtenidos muestran que *Stipa neesiana* es una especie autógama y que las colecciones disponibles muestran una importante diversidad entre y dentro de poblaciones. Futuras colectas deberían priorizar la cantidad de sitios diferentes al ser éste el factor que más influye sobre la diversidad, incluyendo la representación de un alto número de individuos por población debido a que algunas poblaciones pueden incluir individuos genéticamente muy diferentes entre sí. Se deberían incluir las zonas ausentes, incluso las tradicionalmente consideradas de poco aporte a la diversidad debido a su desarrollo agrícola como los departamentos de Soriano y Colonia, pues nuestros resultados sugieren que pueden contener gran diversidad incluso entre poblaciones cercanas.

2.7. BIBLIOGRAFÍA

- Adler P, Raff D, Lauenroth W. 2001. The Effect of Grazing on the Spatial Heterogeneity of Vegetation. *Oecologia*, 128 (4): 465-479.
- Altesor A, Piñeiro G, Lezama F, Jackson R, Sarasola M, Paruelo J.M. 2006. Ecosystem Changes Associated with Grazing in Subhumid South American Grasslands. *J. Vegetal. Science*. 17(3): 323-332.
- Ando T, Iida S, Kokubun H, Ueda Y, Marchesi E. 1994. Distribution of Intraspecific Taxa of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay as Revealed by Discriminant Analyses. *Acta Phytotaxon. Geobotanica*. 45(2): 95-109.
- Arechavaleta J. 1895. Las gramíneas uruguayas. Montevideo: Oriental. 553p.
- Arechavaleta J. 1894-97. Las Gramíneas uruguayas. *Anales del Museo Nacional de Montevideo*; 1(1-4): 29-581.
- Berretta A, Condón F, Rivas M. 2007. 2do. informe país sobre el estado de los recursos fitotegénicos para la alimentación y la agricultura. 114p.
- Berretta EJ, Formoso D, Carvajal CM, Fernández J, Gabachutto IR. 1990. Producción y calidad de diferentes especies forrajeras nativas en condiciones de campo. En: II Seminario Nacional de Campo Natural, Tacuarembó. Montevideo: Hemisferio Sur. pp. 49-62.
- Boggiano P. 1990. Evaluación de 14 gramíneas perennes bajo pastoreo. En II Seminario Nacional de Campo Natural, Tacuarembó. Montevideo: Hemisferio Sur. pp. 185-195.

- Bourdôt GW, Hurrell GA. 1989. Cover of *Stipa neesiana* Trin. & Rupr. (Chilean needle grass) on Agricultural and Pastoral Land Near Lake Grassmere, Marlborough. New Zealand. J. Botany.; 27: 415-420.
- Bowden W M, Senn HA. 1962. Chromosome Number in 28 Grass Genera from South American Canadian. J. Botany.; 40:1115 - 1123.
- Buntjer B J. 2000. CROSSCHECKER: Computer-assisted Scoring of Genetic AFLP Data. En: Plant & Animal Genome VIII Conference, San Diego, CA. Disponible en: <http://www.intlpag.org/pag/8/abstracts/pag8664.html>. Consultado: 11 abril 2011.
- Burkart A. 1969. Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina) : Parte 2. Buenos Aires:INTA. 551p.
- Cingolani AM, Noy-Meir I, Renison D D, Cabido M. 2008. La ganadería extensiva, ¿es compatible con la conservación de la biodiversidad y de los suelos? Ecología Austral; 18:253-271.
- Clayton WD, Vorontsova MS, Harman KT, Williamson H. 2006. GrassBase - The Online World Grass Flora. <http://www.kew.org/data/grassesdb.html>. Consultado 08 Agosto 2008.
- Connor H E. 1979. Breeding System in the Grasses: a Survey. New Zealand. J. Botany. 17:547-574.
- Connor H. E., Edgar E. and Bourdôt G. W. 1993. Ecology and Distribution of Naturalized Species of *Stipa* in New Zealand. New Zealand. J. of Agronomy. Res.; 36: 301-306.
- Coughenour M.B. 1991. Spatial Components of Plant-herbivore in Pastoral, Rangeland Native Ungulate Ecosystems. J. Range Manage.; 44: 530-542.

- DIEA. 2001. CGA 2000. Programa SICA. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,64>. Consultado: agosto 2008.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry. Bull.*; 19: 11-15.
- Frankel OH, Brown AHD, Burdon JJ. 1995. *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge: Cambridge University Press. 299 p.
- Frankel R, Galun E. 1977. *Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding*. Berlín: Springer- Verlag. 281p.
- García MA, González OA, Queheille F. 2005. Efectos de la fertilización nitrogenada y la intensidad de pastoreo sobre los componentes de la producción de forraje de *Stipasetigera* Presl. en campo natural (Tesis de grado). Montevideo: Facultad de Agronomía. 168p.
- Gardener M.R, Whalley RDB, Sindel BM. 2003. Ecology of *Nassella neesiana*, Chilean Needle Grass, in Pastures on the Northern Tablelands of New South Wales: I. Seed production and dispersal. *Australian. J. Agronomy. Research.*; 54: 621-626.
- Ge S, Oliveira GC, Schaal BA, Gao LZ, Hong DY. 1999. RAPD Variation within and between Natural Populations of the Wild Rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil *Heredity*, 82:638-644.
- Green JM., Barker JHA, Marshall EJP, Froud-Williams RJ, Peters NCB, Arnold GM, Dawson, et al. 2001. Microsatellite Analysis of the Inbreeding Grass weed

- Barren Brome (*Anisantha sterilis*) Reveals Genetic Diversity at the within- and between-farm Scales. *Molecular Ecology*; 10:1035-1045.
- Hamrick JL, Godt MW. 1990. Allozyme Diversity in Plant Species. En: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS. (Eds.) *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Massachusetts: Sinauer Associates. pp. 43-63.
- Han B, Wang J, Zhao ML. 2003. Genetic Differentiation of *Stipa krylovii* in Different Degraded Soil. *Acta Agrícola Sinica*, 2: 146-153.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3th. ed. Sunderland: Sinauer Associates. 542 p.
- Hensen I, Kilian C, Wagner V, Durka W, Pusch J, Wesche K. 2009. Low Genetic Variability and Strong Differentiation among Isolated Populations of the Rare Steppe Grass *Stipa capillata* L. in Central Europe. *Plant Biology*, 11:812-820.
- Heun M, Helentjaris JP. 1994. Inheritance of RAPDs in *F1* Hybrids of Corn. *Theoretical Applied Genetics*; 87: 689-696.
- Heywood JS. 1991. Spatial Analysis of Genetic Variation in Plant populations. *Annual Review of Ecology*, 22: 335-55.
- Izaguirre, P. 1993. Notas en *Stipeae* I. La región de la corona. *Boletín. Investigación. (Fac. Agron.)*; (34): 24p
- Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van De Wiel, G, et al. 1997. Reproducibility Testing of RAPD, AFLP and SSR Markers in Plants by a Network of European Laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381-390.

- Lacuague L, Durán V. 1989. Evaluación del rendimiento y calidad de cinco estirpes nativas bajo dos sistemas de corte. (Tesis de grado). Montevideo: Facultad de Agronomía. 661p.
- Longhi-Wagner HM, Zanin A. 1998. Padrões de distribuição geográfica de espécies de *Stipa* L. (Poaceae-Stipeae) ocorrentes no Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 21: 167-175.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209-220.
- Mengistu LW, Mueller-Warrant GW, Barker RE. 2000. Genetic Diversity of *Poa annua* in Western Oregon Grass Seed Crops. Theoretical Applied. Genetic, 101:70-79.
- Millot JC, Methol R, Risso D. 1987. Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay: Informe técnico de la Comisión Honoraria del Plan Agropecuario. Montevideo: Consultora F.U.C.R.E.A. 199 p.
- Nathan R, Muller-Landau HC. 2000. Spatial Patterns of Seed Dispersal, their Determinants and Consequences for Recruitment. TREE; 15: 278-285.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. American Naturalist, 106: 283-292.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. Molecular. Ecology, 6:288-295.

- Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, et al. 1993. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among Laboratories. *Genome Research*. 2: 341-345.
- Rajasekar S, Fei S, Christians NE. 2006. Analysis of Genetic Diversity in Rough Bluegrass Determined by RAPD. *Crop Science*, 46:162-167.
- Ramanatha Rao V, Hodgkin T. 2002. Genetic Diversity and Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources. *Plant Cell Tiss. Org.*; 68: 1-19.
- Reisch C, Poschlod P, Wingender R. 2003. Genetic Differentiation among Populations of *Sesleria albicans* Kit. ex Schultes (Poaceae) from Ecologically Different Habitats in Central Europe. *Heredity*.; 91: 519-527.
- Ritland K, Jain SK. 1981. A Model for the Estimation of Outcrossing Rate and Gene Frequencies Using n Independent Loci. *Heredity*; 47: 35-52.
- Ritland K. 2002. Extensions of Models for the Estimation of Mating Systems Using Independent Loci. *Heredity*; 88: 221-228.
- Rivas M. 2001. Sistema reproductivo y estructura genética de poblaciones de *Bromusauleticus* Trinius ex-Nees (Poaceae): Estudio mediante isoenzimas. *Agrociencia*, 5: 32- 40.
- Rosengurt B. 1979. Tablas de comportamiento de las especies de plantas de campos naturales del Uruguay. Montevideo: Universidad de la República. 86 p.
- Rosengurt B. 1946. Gramíneas y leguminosas de Juan Jackson; comportamiento en el campo y en el cultivo. En: Estudios sobre praderas naturales del Uruguay. Montevideo. pp. 215 - 346.

- Rosengurt B, Arrillaga de Maffei BR, Izaguirre de Artucio P.1970.Gramíneas Uruguayas. Montevideo: Universidad de la República. 489 p.
- Rosengurt B, Gallinal JP, Aragone L, Campal EF.1939. La variabilidadde la composición de las praderas. Rev Asociación Ingenieros Agronomos. 11(3): 28-33.
- Shan D, Zhao ML, Han B, Han GD. 2006. Genetic Diversity of *Stipa grandis* under Different Grazing Pressures. Acta Ecologica Sinica, 26: 3175 - 3183.
- Schoen DJ, Brown AHD. 1991. Intraespecific Variation in Population Gene Diversity and Effective Population Size Correlated with Mating System in Plants. Proc Natural. Academic Science, 88: 4494-4497.
- Speranza PR. 2005. Evolutionary Patterns in the Dilatata Group (*Paspalum*, Poaceae): a Polyploid/agamic Complex. (Tesis Doctorado) Florida: University of Florida. 119p.
- Speranza P R, Seijo JG, Grela I A, Solís Neffa V G.2007 ChloroplastDNA Variation in the *Turnera sidoides* L. Complex (Turneraceae): Biogeographical Implications. Journal of Biogeography.; 34(3): 427-436.
- Symonds G, Villagrán A. 1988. Pautas para tener en cuenta y comparación de metodologías para elaboración de descriptores, un caso: *Stipa setigera* Presl. (Tesis de grado). Montevideo: Facultad de Agronomía.
- Vittoz P, Engler R. 2007. Seed Dispersal Distances: a Typology Based on Dispersal Modes and Plant Traits. Botanical Helvetica. 117: 109-124.

- Volis S, Yakubov B, Shulgina I. 2001. Tests for Adaptive RAPD Variation in Population Genetic Structure of Wild Barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biological Journal of the Linnean Society*; 74: 289-303.
- Wang J L, Zhao N X, Gao Y B, Lin F, Ren A Z, Ruan W B, Chen L. 2006. RAPD Analysis of Genetic Diversity and Population Genetic Structure of *Stipa krylovii* Reshov. in Inner Mongolia Steppe. *Genetika*; 42: 468-475.
- Wildpret de la Torre W, Martín Osorio VM, Reyes Betancort JA, 1999. *Nassella neesiana* (Trin. & Rupr.) Barkworth, una especie invasora en los espacios naturales protegidos de Canarias. *Anuario del Instituto de Estudios Canarios*; 44: 35-46.
- Williams JG, Kubelik AR., Livak KJ, Rafalski LA, Tingey SV. 1990. DNA Polymorphism Amplified by arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Wright S. 1951 The Genetical Structure of Populations. *Ann. Eugenics.*; 15: 323-54.
- Yeh FC, Boyle TJB. 1997. Population Genetic Analysis of Co-Dominant and Dominant Markers and Quantitative Traits. *Belgian Journal Botany*, 129: 157.
- Zhao N, Gao Y, Wang J, Ren A. 2008. Population Structure and Genetic Diversity of *Stipa grandis* P. Smirn, a Dominant Species in the Typical Steppe of Northern China. *Biochemical Systematic Ecology*, 36: 1-10.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si bien en la actualidad no hay dudas sobre la relevancia de la conservación, en las últimas décadas ha existido un largo debate entre los científicos acerca de cuáles son los caminos más apropiados para su abordaje. Este debate se ha centrado en dos visiones, una llamada ecológica y otra genética. Así algunos autores han puntualizado que la cuantificación de la diversidad genética es esencial para el correcto diagnóstico del estatus y viabilidad de las poblaciones, mientras que para otros es más relevante la distribución espacial de la diversidad. La diversidad genética puede aparecer espacialmente estructurada a nivel de poblaciones, subpoblaciones o entre individuos vecinos. Esta distribución es necesariamente el resultado de la influencia ambiental, lo que incluye las actividades humanas. El conocimiento de la distribución espacial de la estructura genética es una herramienta invaluable para inferir las causas de la diversidad (Escudero *et al.* 2003).

En el presente trabajo se cuantificó la diversidad y la distribución existentes demostrando una baja diversidad dentro de las poblaciones y una significativa diversidad entre poblaciones, superior a la de otras especies del género *Stipa* como *S. grandis* (Zhao *et al.* 2008), *S. krylovii* (Wang *et al.* 2006) y 0,226 (Han *et al.* 2003) e inferior a la de otras forrajeras nativas como *P. dilatatum* ssp. *flavescens* (Speranza 2005). En cuanto a la estructura de la diversidad, no hay correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Los métodos gráficos de agrupamiento UPMGA y ACoP revelan diferencias entre las poblaciones y estructuras de distribución, sin embargo no se identificó un patrón geográfico determinado. Algunos estudios sugieren que la arquitectura de poblaciones de gramíneas perennes es de unos pocos individuos predominantes en grandes áreas, robustos, adaptados, de considerable edad y tamaño. La colonización por semillas en lugares temporalmente abiertos da lugar a la presencia de otros genotipos, la mayoría de los cuales están representados por poco individuos (Richards 1990), así las diferencias mayores se darían entre poblaciones. Las diferencias ambientales de composición y profundidad del suelo, precipitaciones o cantidad de radiación serán mucho más determinantes para explicar esas diferencias que la simple distancia geográfica. Los muestreos de

poblaciones en determinadas áreas siempre tendrán patrones de correlación en uno o más loci con variaciones en parámetros ambientales (Hedrick *et al.* 1976).

Si bien la dispersión genética es posible tanto en la propagación del polen a los estigmas como la dispersión de semillas, la dispersión a través de semillas esporofíticas tiene el doble de influencia que la dispersión del polen gametofito. (Richards 1990) En el caso de *S. neesiana* aún no existe información determinante en cuanto a la dispersión del polen, la dispersión de semillas ha sido descrita como zoocoría (Izaguirre 1993; Bourdôt y Hurrel 1989) por lo cual los patrones de trashumancia de los ganados y los hábitos de la fauna local también deberían ser considerados. Más recientemente la circulación de maquinaria entre establecimientos ha sido incluida como uno de los elementos de dispersión de este tipo de semillas (Green *et al.* 2001).

La estructura genética de las poblaciones puede afectar en sí misma al sistema reproductivo y viceversa, de este modo se conforman dos vías de respuesta entre el sistema reproductivo y la estructura de las poblaciones, dependiendo si la estrategia es de sobrevivencia o de colonización (Richards 1990). Los resultados de esta investigación son concluyentes en cuanto al sistema reproductivo por autofecundación de la especie, que sumado con la capacidad de producir semillas cleistógenas que emergen luego de la muerte de los tallos podrían determinar la presencia de conjuntos de individuos idénticos entre sí luego de varios ciclos de autofecundación.

Los sucesivos macollos también afecta su estructura al formar un conjunto de clones con reemplazos anuales lo que aumenta la longevidad de las plantas. Evaluaciones de cespitosas en Kazajstán que incluyen *Stipas* entre otras especies sugieren longevidades de 30 a 80 años para los clones (Vorontzova y Zauglonova 1985), en ese mismo sentido para *Hyparrhenia diplandra* en la Sabana africana Barot y Gignoux (2006) mencionan 150 años. El proceso desde plántula a senescencia de los clones supone un serie de etapas pre-reproductiva, reproductiva y post reproductiva. Durante la fase reproductiva los clones desarrollan coronas que se pueden fragmentar en varias decenas de unidades durante la etapa pos reproductiva. Cada fragmento es potencialmente capaz de desarrollarse independientemente. Los

fragmentos clonales de gran longevidad los hace capaces de contribuir a la existencia del genotipo y el mantenimiento de la población. La habilidad de los clones para acumular recursos del suelo representa el posible mecanismo para el éxito ecológico de estas formas de crecimiento (Briske y Derner 1998).

4. CONCLUSIONES

Intentando dar respuestas a la cuestión de la conservación de *S. neesiana*, de los datos obtenidos emergen elementos claros para estrategias de colecta y conservación. En primer lugar existe una importante diversidad entre las poblaciones. Esta diversidad se encuentra representada en parte en las colecciones actuales. A pesar de lo cual, debido a la significativa diferencia entre poblaciones, resulta imprescindible realizar nuevas colectas teniendo en cuenta la selección de nuevos sitios y de los individuos que los representen.

La selección de sitios de colecta deberá ampliarse más allá de la simple distancia geográfica. Se debería profundizar en el conocimiento de cuáles puedan ser las características biológicas y ambientales, y los efectos de la acción humana que diferencian los ambientes, de modo tal que en un análisis en conjunto se pudiera alcanzar una comprensión más acabada de las causas de la diversidad existente y responder a las preguntas sobre la evolución de la especie.

En lo referente al número de individuos a colectar, dentro de cada sitio claramente identificado en sus características bastará con unos pocos individuos para que en conjunto representen el sitio. Estos criterios junto con una acabada descripción de los sitios de colecta, permitirán, además de la conservación, identificar aquellos genotipos que en un futuro sean de mayor aporte a las diferentes regiones y usos del territorio.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bachmann K. 2001. Evolution and the genetic analysis of populations: 1950-2000. *Taxon*, 50:7-45.
- Balloux F, Lougon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.
- Barkworth ME. 1990. *Nassella* (Gramineae, Stipeae). Revised interpretation and nomenclatural changes. *Taxon*, 33 (4) 597-614.
- Barkworth ME, Everett J. 1988. Evolution in the Stipeae: identification and relationships of its monophyletic taxa. En: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth ME (Eds.) *Grasses systematics and evolution*. Washington D.C. pp 1274-1276.
- Barot S, Gignoux J. 2006. Modeling Tree and Grass Dynamics: From Demographic to Spatially Explicit Models. En: Abbadie, L.; Gignoux, J.; Le Roux, X.; Lepage, M. (Eds.) *Structure, Functioning, and Dynamics of a Savanna Ecosystem*. New York: Springer, Series: Ecological Studies. 179: 365-378.
- Barton NH, Hewitt GM. 1985. Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. of Ecology and Systematics*. 16: 113-148.
- Barrett SCH, Husband BC. 1990. The genetic of plant migration and colonization. en: Brown A.H.D. *et al.* (Eds.); *Plant Population Genetic Breeding, and Genetic Resources*, Ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. pp. 254-278.
- Berreta EJ, Formoso D, Carvajal CM, Fernández J, Gabachutto IR. 1990. Producción y calidad de diferentes especies forrajeras nativas en condiciones de campo.

- En: II Seminario Nacional de Campo Natural, Tacuarembó. Montevideo: Hemisferio Sur. pp. 49-62.
- Boggiano P. 1990. Evaluación de 14 gramíneas perennes bajo pastoreo. En II Seminario Nacional de Campo Natural, Tacuarembó. Montevideo: Hemisferio Sur. pp. 185-195.
- BourdôtGW, Hurrell GA. 1989. Cover of *Stipa neesiana* Trin. & Rupr.(Chilean needle grass) on agricultural and pastoral land near Lake Grassmere, Marlborough New Zealand Journal of Botany. 27: 415-420.
- Bowden WM, Senn HA. 1962. Chromosome number in 28 grass genera from South America. Canadian Journal of Botany, 40:1115 – 1123.
- Briske DD, Derner JD. 1998. Clonal Biology of caespitose grasses. En Cheplichk, G.P. (ed.) Population biology of grasses, Cambridge University Press pp. 106-135.
- Burkart A. 1969. Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina): Parte 2. Buenos Aires: INTA. 551p.
- Clayton, WD, Renvoize SA. 1986. *Genera graminum*. Grasses of the world Kew London: Bull. 389p.
- Connor H E. 1979. Breeding System in the Grasses: a Survey. New Zealand. Journal of Botany. 17:547-574.
- Dominguez P, Galante L, Tardaguila A. 2002. Propuesta para la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos de la especie *Stipasetígera*. Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay 19p. (mimeo.)

- Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG, O'Brien SJ, Johnson WE. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 10: 65–79.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113: 351–365.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA restriction Data. *Genetics*, 131:479 – 791.
- Formoso D. 1987. Efecto del pastoreo sobre el tapiz natural en campos de Basalto. *SUL Boletín Técnico* 16: 53-62.
- Frankel OH, Brown AHD, Burdon JJ. 1995. *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge: Cambridge University Press. 299 p.
- García MA, González OA, Queheille F. 2005. Efectos de la fertilización nitrogenada y la intensidad de pastoreo sobre los componentes de la producción de forraje de *Stipasetigera* Presl. en campo natural (Tesis de grado). Montevideo: Facultad de Agronomía. 168p.
- Gauch, H.G., Jr. 1982. *Multivariate Analysis and Community Structure*. Cambridge University Press.
- Green JM, Barker JHA, Marshall EJP, Froud-Williams RJ, Peters NCB, Arnold GM, Dawson K, Karp A. 2001. Microsatellite analysis of the inbreeding grass weed Barren Brome (*Anisantha sterilis*) reveals genetic diversity at the within- and between-farm scales. *Molecular Ecology* 10:1035-1045.

- Gustafson DJ, Gibson DJ, Nickrent DL. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among remnant big bluestem [*Andropogon gerardii* Vitman] populations from Arkansas' Grand Prairie. *Molecular Ecology* 8: 1693–1701.
- Hadrys H, Balick M, Schierwater B. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1: 55-63.
- Hamrick JL, Godt MW. 1990. Allozyme Diversity in Plant Species. En: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS. (Eds.) *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Massachusetts: Sinauer Associates. pp. 43-63.
- Han B, Wang J, Zhao ML. 2003. Genetic Differentiation of *Stipa krylovii* in Different Degraded Soil. *Acta Agricola Sinica*, 2: 146-153.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3th. ed. Sunderland: Sinauer Associates. 542 p.
- Hedrick PW, Ginevan M.E, Ewing EP. 1976. Genetic Polymorphism in heterogeneous environment, *Annual Review. Ecological Systems* 7: 1-32.
- Heywood JS. 1991. Spatial Analysis of Genetic Variation in Plant populations. *Annual Review of Ecology*, 22: 335-55.
- Higgins K, Lynch M. 2001. Metapopulation extinction caused by mutation accumulation. *Proceedings of the Natural Academy of Science of the USA*, 98:2928–2933.

- Hillis D, Moritz C, Mable B. 1996. Molecular systematics, Sunderland: Sinauer, Associates, Inc. Publishers.655p.
- Izaguirre, P. 1993. Notas en *Stipeae*. Boletín de Investigación N° 34. Montevideo: Facultad de Agronomía. 24p.
- Jacobs SWL, Everett J, Barkworth, ME, Hsiao C. 2000.Relationships within the stipoid grasses (Gramineae).En: Jacobs, SWL, Everett J, (Eds.) Grasses, systematics and evolution. pp. 75–82. CIRO, Melbourne.
- Jaurena M, González A, Tardaguila A, Domínguez P. 1997. Estado actual de la colección de *Stipa setigera*. Banco de Germoplasma, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay 14p (mimeo.)
- Kapteyn J, Simon JE. 2002. The Use of RAPDs for Assessment of Identity, Diversity, and Quality of *Echinacea*. En Trends in new crops and new uses. Janick J, Whipkey A. (Eds.) Alexandria, VA: ASHA Press pp. 509-513.
- Kimura M, Weiss GH. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 461-576.
- Kremer A, Caron H, Cavers S, Colpaert N, Gheysen G, GribelR, LemesM, Lowe AJ, Margis R, Navarro C, Salgueiro F. 2005. Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers.*Heredity*, 95:274-280.
- Lacuague L, Durán V. 1989. Evaluación del rendimiento y calidad de cinco estirpes nativas bajo dos sistemas de corte. (Tesis de grado). Montevideo: Facultad de Agronomía. 661p.
- Linneo C. 1753. *Species Plantarum*, 1. Holmiae.

Linneo C. 1754. *Genera Plantarum*, ed.5. Holmiae.

Lynch M, Milligan BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99.

Longhi-Wagner, HM, Zanin, A. 1998. Padrões de distribuição geográfica das espécies de *Stipa* L. (Poaceae-Stipeae) ocorrentes no Brasil. *Revista Brasileira Botânica*, 21; (2) 167-175.

Madsen T, Stille B, Shine R. 1996. Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation*. 75: 113-118.

Manly BFJ. 1995. *Multivariate statistical methods*. Londres: Chapman & Hall, 215 p.

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.

Muthusamy, S.; Kanagarajan, S.; Ponnusamy, S. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. [En línea]. *Electronic Journal of Biotechnology* 1; 3 (Visitado 5 Dic 08 <http://www.ejbiotechnology.info>)

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 512p.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*: 70, 3321-3323.

- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13 (5) 1143-1155.
- Nybom H, Bartish IV. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution, and Systematics*, 3:93-114.
- Parodi LR. 1947. Las especies de gramíneas de género *Nassella* de la Argentina y Chile. *Darwiniana*, 7 (3) 363-395.
- Peñailillo J. 2002. El género *Jarava* Ruiz et Pavon (Stipae -Poacea). Delimitaciones y nuevas combinaciones. *Gayana*, 59, 27:34.
- Pohl RW. 1980. Gramineae, Family 15. En: Burger W, (Ed.) *Flora Costaricensis*. Chicago:Fieldiana.Botany New Series 4.608p.
- Richards AJ. 1990. En Chapman, G.P. (ed.) *Reproductive versatility in the grasses*. Cambridge University Press pp 131- 153.
- Rosengurt B. 1946. Gramíneas y leguminosas de Juan Jackson; comportamiento en el campo y en el cultivo. En: *Estudios sobre praderas naturales del Uruguay*. Montevideo pp. 215 – 346.
- Rosengurt B. 1979. Cuadros de comportamiento de las especies de plantas de campo naturales del Uruguay. Montevideo: Universidad de la República, 86p.

- Rosengurtt B, Arrillaga de Maffei BR, Izaguirre de Artucio P, 1970. Gramíneas uruguayas. Montevideo: Departamento de Publicaciones de la Universidad de la República,
- Rosengurtt B, Gallinal JP, Aragone L, Campal EF. 1939. La variabilidad de la composición de las praderas. Estudios sobre praderas naturales del Uruguay (2 da. Cont.) Revista Asociación de Ingenieros Agronomos 3;(11) 28-33.
- Rossiter SJ, Jones G, Ransome RD, Barratt EM. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. Molecular Ecology, 9:1131-1135.
- Speranza PR. 2005. Evolutionary patterns in the dilatata group (*Paspalum*, Poaceae): a polyploid/agamic complex. Tesis Doctorado University of Florida.
- Stebbins GL, Löve RM. 1941. A cytological study of California forage grasses. American Journal of Botany 28 (5) 371-382.
- Symonds G, Villagrán A. 1988. Pautas para tener en cuenta y comparación de metodologías para elaboración de descriptores, un caso: *Stipa setigera* Presl. (Tesis de grado). Montevideo: Facultad de Agronomía.
- Torres, M. A. 1993. Revisión del género *Stipa* (Poaceae) en la provincia de Buenos Aires. Monografía. Comisión Investigación Científica, 12: 1-62.
- Trinius, C B. 1820. *Fundamenta agrostografica*. Viennae

- Vázquez FM, Devesa JÁ. 1996. Revisión Del Género *Stipa* L. y *Nassella* Desv. (*Poaceae*) En La Península Ibérica e Islas Baleares. Acta Botánica Malacitana. 21: 125-189.
- Vieira EA, Marques Castro C, Costa deOliveira G, Irajá F, de Carvalho F, Zimmer P. 2004. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD. Scientia Agricola, 61 (4) 407-413.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski, LA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.
- Wang JL, Zhao NX, Gao YB, Lin F, Ren AZ, Ruan WB, Chen L. 2006. RAPD Analysis of Genetic Diversity and Population Genetic Structure of *Stipa krylovii* Reshov. in Inner Mongolia Steppe. Genetika; 42: 468-475.
- Vorontzova LI, Zaugolnova LB. 1985. Population biology of steppe plants. En White, J. (Ed.) The population structure of vegetation, pp 78-143.
- Wright S. 1977. Evolution and the Genetics of Population, Volume 3: Experimental Results and Evolutionary Deductions. The University of Chicago Press, Chicago. 619p.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics, 15: 323-354.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian populations, Genetics 16,97-159.
- Yang W, de Oliveira AC, Godwin I, Schertz K, Bennetzen JL. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinese sorghum. Crop Science 36: 1669-1676.

Yu G, Bao Y, Shi C, DongC, Ge S. 2005. Genetic diversity and population differentiation of Liaoning weedy rice detected by RAPD and SSR markers Biochemical Genetics, 43: (5/6) 261-270.

Zhao N,Gao Y, WangJ, Ren A. 2008. Population structure and genetic diversity of *Stipa grandis* P. Smirn, a dominant species in the typical steppe of northern China. Biochemical Systematics and Ecology, 36: 1-10.