

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

MECANISMOS DE FORMACIÓN DE POLEN NO REDUCIDO Y
DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES
NATURALES DE *Solanum commersonii* (Solanaceae) DE URUGUAY

Por

María Manuela SILVEIRA ETCHEVERRY

Tesis presentada como uno de los requisitos
para obtener el título de Magíster en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Montevideo

URUGUAY

Septiembre 2018

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Elsa Camadro, Gustavo Heiden, y Paola Gaiero, el 19 de Septiembre de 2018. Autora: María Manuela Silveira Etcheverry. Director Pablo Speranza.

Dedico este trabajo a mi madre y mi padre

AGRADECIMIENTOS

A mis orientadores Pablo Speranza y Cristina Mazzella por sus enseñanzas y sobre todo por la paciencia.

A Paola Gaiero y Magdalena Vaio por sus aportes en los temas citogenéticos.

A Eliana Monteverde por su apoyo en la tarea de laboratorio.

A todos los compañeros del laboratorio: Gabriela, Joaquín, Mariana, Pablo, Venancio.

A Viviana Solís-Neffa por permitirme trabajar en su laboratorio en Corrientes (Argentina).

A Celeste, Gabriela, Gisela, Natalia, Jonathan, Juan Manuel, Sara y Yanina,

A mi familia por su constante apoyo, a mamá por estar siempre presente y aguantar todos mis ataques.

A Joaquín por su amor incondicional y su compañía en este camino recorrido.

TABLA DE CONTENIDO

	páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1 BARRERAS REPRODUCTIVAS E HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA	2
1.2 GAMETOS NO REDUCIDOS EN <i>SOLANUM</i> SECCIÓN PETOTA ..	5
1.3 MECANISMOS DE FORMACIÓN DE POLEN NO REDUCIDOS EN <i>SOLANUM</i> SECCIÓN PETOTA.....	8
1.4 VARIABILIDAD DEL POLEN... ..	10
1.5 TAMAÑO DE LOS GRANOS DE POLEN.....	12
1.6 ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES.....	13
2. <u>RIQUEZA CLONAL, DISPERSIÓN CLONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES DE <i>SOLANUM COMMERSONII</i> DE URUGUAY ANALIZADAS MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES</u>	17
2.1 RIQUEZA CLONAL, DISPERSIÓN CLONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES DE <i>SOLANUM COMMERSONII</i> DE URUGUAY ANALIZADAS MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES	18
2.2 CLONAL RICHNESS, CLONE DISPERSAL AND GENETIC STRUCTURE IN NATURAL POPULATIONS OF <i>SOLANUM COMMERSONII</i> FROM URUGUAY ANALYZED THROUGH MICROSATELLITE MARKERS	19
2.3 INTRODUCCIÓN.....	20
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23

2.4.1 <u>Material vegetal</u>	23
2.4.2 <u>Extracción de ADN</u>	25
2.4.3 <u>Loci SSR y condiciones de amplificación</u>	26
2.4.4 <u>Análisis estadísticos</u>	28
2.5 RESULTADOS.....	28
2.6 DISCUSIÓN.....	33
2.7 BIBLIOGRAFÍA.....	38
3. <u>MECANISMOS CITOLÓGICOS DE FORMACIÓN DE POLEN NO REDUCIDOS EN SOLANUM COMMERSONII</u>	45
3.1 MECANISMOS CITOLÓGICOS DE FORMACIÓN DE POLEN NO REDUCIDOS EN SOLANUM COMMERSONII	46
3.2 CYTOLOGICAL MECHANISMS OF UNREDUCED POLLEN PRODUCTION IN SOLANUM COMMERSONII	47
3.3 INTRODUCCIÓN.....	48
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.4.1 <u>Materiales vegetales</u>	50
3.4.2 <u>Microesporogénesis</u>	52
3.4.3 <u>Análisis de esporadas</u>	52
3.4.4 <u>Viabilidad del polen</u>	53
3.5 RESULTADOS.....	54
3.5.1 <u>Análisis de meiosis en células madre del polen</u>	54
3.5.2 <u>Análisis de esporadas y de viabilidad de polen</u>	61
3.5.3 <u>Análisis de meiosis en individuos triploides</u>	64
3.6 DISCUSIÓN.....	70
3.7 BIBLIOGRAFÍA.....	76
4. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</u>	82
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	85

RESUMEN

Solanum commersonii es un pariente silvestre de los cultivos (CWR) y tiene utilidad para el mejoramiento genético de la papa. Para analizar la producción de gametos no reducidos ($2n$) y la diversidad genética, se colectaron poblaciones en Uruguay. Mediante citometría de flujo se identificó poblaciones formadas por individuos $2x$, $3x$ y mezcla de ambos niveles de ploidía. En las últimas se analizó la microesporogénesis y sólo en una población se identificó polen $2n$ en muy baja proporción (un individuo con 3 % y otro con 1 %), aunque en todas se identificó díadas y tríadas. La meiosis fue altamente irregular, con 39 a 42% de husos paralelos en metafase II (posible mecanismo de formación de gametos $2n$ en estas poblaciones). En los individuos $3x$, las irregularidades indicaron una alta homología entre los tres genomios, con lo cual se comportan como si fueran autoploiploides. En los tres marcadores SSR amplificados de los ocho ensayos, el número de alelos varió entre 6 y 9, con valores promedios de PIC = 0,67. El análisis de coordenadas principales no detectó estructura poblacional, salvo una separación de las poblaciones del litoral y el sur. Se identificaron hasta cinco clones por población y los ramets de un clon tendieron a agruparse sin mezclarse con los de otro clon. Los rangos de dispersión clonal fueron desde 3,90 m a 83,45 m. Se observó que las barreras geográficas (ej.: cursos de agua) tienden a separar clones diferentes de una misma población. La diversidad genética encontrada mostró que los $3x$ no se separan genéticamente de los $2x$. Al momento de realizar una colecta, los ramets deben estar separados entre sí por lo menos unos 50 m para capturar la mayor variabilidad genética de *S. commersonii*, prestando atención a las alteraciones antrópicas y las barreras naturales.

SUMMARY

Solanum commersonii is a promising crop wild relative (CWR), useful for potato breeding. To analyze the production of unreduced gametes ($2n$) and the genetic diversity in this species, we collected samples from populations in Uruguay. Populations with $2x$, $3x$ and both ploidy levels were identified through flow cytometry. Only one mixed-ploidy population displayed $2n$ pollen in a very low proportion (3 % in one individual and 1 % in the other), although all the individuals produced dyads and triads. Meiosis was highly irregular, with 39 to 42 % of parallel spindles during metaphase II, the most likely mechanism of $2n$ gamete formation in these populations. In triploids, meiotic irregularities indicated high homology among the three genomes. They were probably autopolyploids. The three SSR markers that were amplified from the eight markers tested displayed 6 to 9 alleles, with average PIC = 0.67. The Principal Coordinates Analysis (PCoA) did not detect population structure, except for a separation between populations from the northwest and the south. We identified up to five clones per population. Ramets from the same clone grouped together without overlapping with other clones. Clonal dispersion ranged from 3.90 m to 83.45 m. Geographic barriers (e.g. water courses) separated different clones within a population. Triploid individuals were not discriminated from the $2x$ individuals from the same populations. The number of individuals collected did not affect the genetic diversity captured. We suggest that during a collection trip, collected ramets should be separated at least 50 m to capture most of the genetic variability from natural populations of *S. commersonii*, bearing in mind anthropic disturbances and natural barriers.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los parientes silvestres de los cultivos ofrecen un recurso genético para el mejoramiento de los cultivos, como por ejemplo el pariente silvestre de la papa *Solanum commersonii* Dun ex Poir. (Correll 1962). El entendimiento de la diversidad genética de esta especie permitirá manejarla y utilizarla de manera óptima. Para cumplir con dichas medidas es necesario primero conocer la descripción taxonómica, morfológica, fisiológica y genética de las especies que serán utilizadas (Sevilla y Holle, 2004). En este sentido, el uso de técnicas moleculares para la caracterización genética de dichas especies es de importancia dada su alta especificidad.

La papa comercial, *Solanum tuberosum* ($2n=4x=48$, 4NBE), constituye un ejemplo de versatilidad por cuanto admite la reproducción sexual y la asexual, la reducción de niveles superiores de ploidía a niveles inferiores a través de la haploidización y el incremento de estos niveles por medio de poliploidización (Camadro y Mendiburu, 1988). *Solanum commersonii* especie nativa de Uruguay, este de Argentina, sur de Paraguay y Brasil (Hawkes, 1990). En su caso presenta valor para el mejoramiento debido a su resistencia a factores adversos, abióticos (sequías, heladas) (Palta *et al.*, 1981) y bióticos (virus X e Y, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Verticillium*, *Alternaria solani*, *Ditylenchus destructor*). Se encuentra reproductivamente aislada de la papa cultivada. Los cruzamientos entre *S. commersonii* y *S. tuberosum* no tienen éxito debido fundamentalmente al desarrollo anormal del endosperma de la semilla híbrida. Para obtener dichos híbridos es necesario realizar manipulaciones deliberadas de ploidía (poliploidización) utilizando químicos antimitóticos o mediante el aprovechamiento de la producción espontánea de gametos no reducidos ($2n$), donde la duplicación del número de cromosomas ocurre en la formación del gametofito. Los gametos no reducidos han sido importantes en la evolución de los complejos poliploides de especies silvestres y

cultivadas de papa (Den Nijs y Peloquin 1977, Quinn et al., 1974). También son utilizados en el mejoramiento genético de *Solanum tuberosum*. Debido a esto es importante que los mismos se produzcan en una alta frecuencia, con una producción estable y que la forma mediante la cual se originan sea conocida (Mendiburu y Peloquin 1977, Chase 1963), para de esta manera saber cuál es la heterocigosis parental esperada y recuperada en la descendencia. Así mismo es importante conocer la variabilidad genética y la distribución de la especie en Uruguay, para de esta forma realizar colectas eficientes y capturar la mayor diversidad posible.

1.1 BARRERAS REPRODUCTIVAS E HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA

Existen una serie de mecanismos de aislamiento los cuales son auténticas barreras genéticas que impiden el flujo de genes entre poblaciones o especies. De manera tradicional se han dividido en aquellas que actúan antes de la formación del cigoto (barreras precigóticas, cuadro 1) y las que actúan después de su formación (barreras postcigóticas, cuadro 1). Sin embargo, debemos recordar que en realidad la acción de las barreras reproductivas actúa de manera continua a lo largo del ciclo de vida de los organismos (Camadro, 2011).

Cuadro 1. Tipos de barreras pre y postcigóticas

Precigóticas	
Aislamiento geográfico	Diferente lugar de ubicación de las poblaciones
Aislamiento fenológico	Distintos picos de floración
Aislamiento floral	Diferentes formas de flores atraen diferentes polinizadores
Sistema de apareamiento	Distintos tiempos de exposición del polen y/o receptividad del estigma
Competencia polínica	Baja o nula germinación de granos de polen interespecíficos
Polinización	Mecanismos de autoincompatibilidad
Postcigóticas	
Inviabilidad	Híbridos de la primera generación
Sobrevivencia	Plántulas
Fecundidad	Esterilidad genético o cromosómica, producción de flores

Cada mecanismo de aislamiento actúa con diferente fuerza, las barreras precigóticas tienden ser más determinantes que las postcigóticas en los cruzamientos interespecíficos (Lowry, 2008). Las barreras precigóticas pueden ser eludidas en los programas de mejoramiento, en algunos casos mediante técnicas sencillas como la polinización asistida, o más sofisticadas como la fecundación *in vitro* o la fusión de protoplastos. Las barreras postcigóticas pueden ser eludidas facilitando la formación y el desarrollo de los embriones y de los híbridos, mediante el rescate de embriones, la cual consiste en aislar los mismos y cultivarlos en un medio estéril el cual contiene los nutrientes necesarios para su desarrollo normal.

En papa, los cruzamientos interespecíficos interploides, pueden ser explicados por la hipótesis que establece que la relación entre los germoplasmas maternos y paterno en el endosperma debe ser de 2:1, respectivamente, para que el desarrollo sea normal (Johnston y Hanneman,

1980). Johnston y Hanneman (1982) propusieron la hipótesis del número de balance del endosperma (EBN), que permite hacer extensiva la relación 2:1 a los cruzamientos interespecíficos. De acuerdo con esta hipótesis, el germoplasma de cada especie tiene una ploidía eficaz o EBN, que le ha sido asignada de acuerdo al funcionamiento del endosperma en cruzamientos con una especie estándar, *Solanum chacoense* (chc, $2n=2x=24$) a la que se le otorgó, arbitrariamente, el valor de 2EBN. A las demás especies de *Solanum* se les asignaron valores de EBN de acuerdo con el comportamiento en cruzamientos con chc, que van de uno en *S. commersonii* (cmm) a cuatro en *S. tuberosum* (tbr) (Hanneman y Bamberg, 1986). Es entonces el EBN el que debe ajustarse a la relación 2:1, para que el endosperma híbrido se desarrolle normalmente. Por lo tanto, los cruzamientos interespecíficos darían descendencia solamente si ambas especies parentales tuvieran el mismo EBN o participara un gameto no reducido.

Más del 70 % de las especies de *Solanum* sect *Petota* Dumort son diploides y presentan 1 o 2 EBN, lo que hace necesario efectuar manipulaciones de ploidía para poder realizar cruzamientos con la papa cultivada. La ploidía puede llevarse a niveles superiores de varias formas: (a) a través de la poliploidización asexual, usando alguna sustancia como la colchicina (inhibidor del huso acromático) que provoca la duplicación del número somático o (b) mediante poliploidización sexual por fusión de dos gametos, donde uno o ambos son no reducidos debido a que la meiosis se encuentra modificada o está ausente (Hermsen 1984, Mendiburu y Peloquin 1977). Cuando participa sólo un gameto no reducido o $2n$ se denomina poliploidización sexual unilateral y si participan dos gametos $2n$ es poliploidización sexual bilateral. La ventaja de este tipo de poliploidización respecto de la asexual es la de poder recuperar en la descendencia gran parte de la variabilidad genética, o sea la heterocigosis presente en los padres. Esto a su vez depende de la forma en que se originan los gametos

$2n$, de la distancia entre el posible locus de interés y el centrómero y del número de entrecruzamientos por brazo cromosómico (Peloquin *et al.*, 1999).

La existencia de gametos $2n$ funcionales, su distribución en especies y frecuencia de la generación de granos de polen $2n$ ha sido ampliamente revisada por Harlan y de Wet (1975) en diversos grupos de plantas. Encontraron que los gametos $2n$ funcionales son producidos naturalmente en un amplio número de géneros y que jugaron un rol importante en la formación de poliploides naturales. Asimismo, Veilleux (1983) realizó un análisis con el mismo objetivo, pero restringiéndose a plantas cultivadas y encontró producción de gametos $2n$ funcionales en monocotiledóneas en las familias Bromeliaceae, Gramineae y Orchidaceae, y en eudicotiledóneas en Compositae, Cruciferae, Ericaceae, Leguminosae, Rosaceae, Solanaceae y Vitaceae. Destacó la variación en la frecuencia en la producción de los mismos entre especies y genotipos, por ejemplo, desde 0 al 3 % en especies del género *Vaccinium* (Ericaceae). En relación a la familia Solanaceae, dicho autor encontró porcentajes entre 3 y 99 % estudiando genotipos diploides híbridos del género *Solanum*, mientras que Watanabe y Peloquin (1993) encontraron que la frecuencia de polen $2n$ en las especies diploides, tetraploides y hexaploides de ese género varía entre 2 % y 36 %. Por lo tanto es esperable que en las poblaciones naturales de *S. commersonii*, se encuentren gametos $2n$ funcionales.

1.2 GAMETOS NO REDUCIDOS EN *SOLANUM* SECT PETOTA

La mayoría de las especies del género *Solanum* que producen tubérculos presentan algún nivel de producción de gametos $2n$ (Peloquin *et al.*, 1989, Camadro y Peloquin 1980, Den Nijs y Peloquin 1977, Quinn *et al.*, 1974,). Estos pueden ser producidos tanto en la microesporogénesis masculina como en la macroesporogénesis femenina, por eventos meióticos

anormales, debido al desarrollo de células apomeióticas del óvulo o por duplicación cromosómica pre- o post-meiótica (Camadro *et al.*, 1993).

El mecanismo meiótico común o normal es un tipo de división especializada, lo cual es esencial para la reproducción sexual. Este proceso consiste en una única duplicación del material genético, seguida por dos rondas de división de los cromosomas (primera y segunda división meiótica o meiosis I y meiosis II), dando como resultado cuatro núcleos con la mitad del número cromosómico (células haploides o n). Durante la profase I ocurre la recombinación entre los cromosomas homólogos, siendo de suma importancia debido a que se origina variabilidad genética mediante nuevas combinaciones entre alelos de genes distintos y entre cromosomas. En anafase I, los cromosomas homólogos son separados, mientras que en anafase II se separan las cromátidas hermanas. En las plantas, la citocinesis puede ser sucesiva, o sea ocurrir luego de cada ronda de separación cromosómica, o simultánea luego de la segunda división. La citocinesis sucesiva se puede observar en muchas monocotiledóneas, mientras que la simultánea es más frecuente en las eudicotiledóneas. En ambos casos, el producto de la meiosis masculina en plantas es una tétrada constituida por cuatro microsporos reducidos, los cuales se encuentran momentáneamente unidos por una pared de callosa. Luego de ser liberados formando cada uno un grano de polen, ocurren en ellos dos divisiones mitóticas que dan lugar a tres núcleos, dos de ellos son células espermáticas necesarias para la doble fecundación típica de los vegetales (McCormick, 2004).

En eudicotiledóneas, la citocinesis en microesporogénesis es simultánea, en donde la primera división meiótica no es seguida por citocinesis. Los bivalentes luego de localizarse en el plano ecuatorial asociados al huso de la metafase I segregan de forma balanceada en anafase I. Los husos meióticos presentes en las metafases II forman un ángulo de aproximadamente 60 grados, y los surcos de fragmentación en telofase II se forman simultáneamente para dar lugar a los cuatro productos reducidos (Mok y

Peloquin, 1975a). Sin embargo, se han descrito variaciones o alteraciones meióticas que conducirían a la formación de granos de polen $2n$. Estas variaciones pueden tener distintas causas y ser debidas a la omisión de segregación de cromosomas homólogos o de cromátidas hermanas, sea en la primera o en la segunda división, orientaciones anormales del huso meiótico o a problemas en el proceso de citocinesis (Ramanna y Jacobsen 2003, Bretagnolle y Thompson 1995). También se ha propuesto que el proceso de citocinesis, podría ser responsable de la formación de gametos $2n$ (Genuardo *et al.*, 1998). La citocinesis es un fenómeno independiente de la cariocinesis (Ramanna, 1974), por lo cual el producto final no sólo depende de la forma en que se divide el núcleo, sino también de cómo se forman los surcos de fragmentación y las paredes de los microsporos. Durante la meiosis los microtúbulos (MT) y los filamentos de actina son muy dinámicos (Traas *et al.*, 1989) y son en gran medida responsables del correcto movimiento de los cromosomas y la posterior citocinesis. Analizando el proceso meiótico es posible seguir la secuencia de acontecimientos que llevan a cabo los microtúbulos. Al comenzar la interfase I, los MT forman una red desde el núcleo hacia la membrana citoplasmática y son acompañados por los filamentos de actina. En metafase I los primeros invaden el espacio nuclear para formar el huso meiótico. Luego que los cromosomas han segregado, comienzan a crecer los MT hacia la membrana citoplasmática. Al mismo tiempo los filamentos de actina forman una estructura en forma de disco, tipo fragmoplasto, que indicaría el sitio de la futura división celular ya que en este caso la citocinesis es simultánea. Durante la metafase II los MT que se encontraban sobre la membrana se despolimerizan para dar lugar a los dos husos, y el disco de actina desaparece, pero es posible observar pequeños agrupamientos remanentes dispersos por el citoplasma. Al comenzar la telofase II, los MT irradian desde el núcleo, pero previamente los filamentos de actina se concentran en las zonas donde se van a formar los planos de división. La formación del fragmoplasto en la citocinesis simultánea se realiza de manera centrípeta a

partir de cuatro puntos de inicio (De Storme y Geelen 2013, Traas *et al.*, 1989).

1.3 MECANISMO DE FORMACIÓN DE POLEN NO REDUCIDOS EN *SOLANUM* SECT *PETOTA*

Los mecanismos de formación de polen $2n$ en el género *Solanum* sect *Petota* han sido estudiados por diferentes autores (Johnston *et al.*, 1986, Iwanaga 1984, Ramanna 1983, Souter *et al.*, 1980, Höglund 1970). Mok y Peloquin (1975a) proponen tres mecanismos que ellos asocian a variantes meióticas debidas a mutaciones naturales que alteran este proceso, ellos son: (a) husos paralelos (ps) y husos fusionados (fs), (b) citocinesis prematura en meiosis I, y (c) citocinesis prematura en meiosis II. La variante (a), husos paralelos, representa el caso en que la primera división meiótica es normal, pero en la segunda los husos se orientan de manera paralela, formándose un solo fragmoplasto que origina una díada con dos microsporos $2n$. Una variación de esta configuración es la formación de husos tripolares (tps), que se originan cuando en anafase II los husos se encuentran fusionados en un polo y dan lugar a una tríada con un microsporo $2n$ y dos n . Estas mutaciones están asociadas a los genes *ps* (*parallel spindles*). Veilleux *et al.* (1982) sugieren que los husos fusionados, tripolares y paralelos podrían representar los niveles de expresividad decreciente de un mismo carácter. En el mecanismo (b), citocinesis prematura uno (pc-1), la primera división meiótica es anormal ocasionando que el movimiento de los bivalentes hacia metafase I se realice de manera asincrónica, y se produce una citocinesis después de telofase I. Por último, la variante (c) citocinesis prematura dos (pc-2), ocurre cuando la primera división meiótica es normal, pero es seguida por una citocinesis en profase II, de modo que no se producen los eventos normales en la segunda división meiótica completa. Además de los tres mecanismos citológicos de formación de polen $2n$ citados por Mok y Peloquin (1975a), otros investigadores han observado otro mecanismo en el que los husos en metafase II se encuentran

fusionados y los cromosomas reunidos en la placa ecuatorial formando un solo grupo y no dos como en el caso de los husos paralelos. (Höglund, 1970).

Los mecanismos mediante los cuales se originan los granos de polen $2n$ son importantes las consecuencias de cada uno con respecto a la retención de heterocigosis que puedan presentar. Los mecanismos de producción de gametos $2n$ se agrupan en dos tipos de acuerdo con sus consecuencias genéticas, equivalentes a la formación de núcleos por restitución en la primera división meiótica (RPD) o en segunda división (RSD). Durante el proceso normal de meiosis, en la primera división se separan los cromosomas homólogos y en la segunda se separan las cromátidas hermanas de cada cromosoma. En la RPD, no se produce la separación de los cromosomas homólogos en la primera división meiótica; mientras que la segunda división ocurre normalmente. En la RSD, el apareamiento y separación de los cromosomas homólogos ocurre normalmente durante la primera división meiótica, mientras que en la segunda división las cromátidas hermanas se separan durante la Anafase II pero posteriormente el núcleo se restituye (Bretagnolle y Thompson, 1995) Las consecuencias genéticas de los mecanismos de husos paralelos y husos tripolares son equivalentes a RPD, y la citocinesis prematura 1 y citocinesis prematura 2 a RSD (Mok y Peloquin, 1975a, 1975b). La formación de husos paralelos provee de una importante herramienta para transferir interacciones génicas del progenitor a la descendencia, debido a que todos los loci heterocigotas en el padre entre el centrómero y el primer entrecruzamiento y la mitad de los loci heterocigotas en el padre entre el primer entrecruzamiento y el segundo, serán heterocigotas en el gameto $2n$ producido. De este modo se transmitiría a la descendencia en promedio el 80 % de la heterocigosis parental (Hermsen, 1984). Mientras que, si ocurren los mecanismos de citocinesis prematura 1 y citocinesis prematura 2, se transferirá a la descendencia en promedio el 40 % de la heterocigosis parental (Hermsen, 1984). Por lo tanto,

es esperable que los gametos provenientes del mecanismo de RPD sean semejantes a su parental, mientras que los originados por RSD sean altamente homocigotas (Peloquin *et al.*, 1999).

Algunos autores (Veilleux *et al.*, 1982, Ramanna 1974) encuentran una alta correlación entre la presencia de husos fusionados (fs) y la formación de díadas, mientras que lo contrario sucede entre husos paralelos y díadas en los mismos materiales. Para estos autores, la formación de husos fusionados está indudablemente asociada con la formación de díadas y por lo tanto de polen $2n$, no así la formación de husos paralelos que fueron observados en todos los materiales estudiados a pesar de que no todos producían polen $2n$. Lam (1974) también afirma que dos grupos de cromosomas sobre husos paralelos en metafase II tienen una meiosis normal y dan como resultado cuatro microsporos reducidos (n).

1.4 VIABILIDAD DE POLEN

Los estudios de la microesporogénesis y viabilidad de polen son de suma importancia, ya que permiten a los mejoradores identificar aquellos individuos que presentan una mayor capacidad de producir polen viable y detectar la existencia de variabilidad intraespecífica en porcentajes de polen viable entre los genotipos utilizados en los programas de mejoramiento (Alonso *et al.*, 2007). Estas variaciones en los porcentajes de viabilidad del polen pueden deberse a variaciones de origen genético, a las irregularidades meióticas observadas en *Solanum* y/o a variaciones en condiciones ambientales. A través de los datos de viabilidad de polen de híbridos interespecíficos entre *Solanum tuberosum* y algunos de sus parientes silvestres es posible inferir cuán adecuadas son esas especies silvestres para su uso en mejoramiento introgresivo.

El término viabilidad se refiere a la capacidad que presentan los granos de polen para germinar en el estigma de la flor. La misma se encuentra

determinada por varios factores internos y externos (ambientales). Los factores internos se encuentran relacionados propiamente con la especie y puede ser por ejemplo mutaciones o interacciones entre genes nucleares y citoplasmáticos (Nikkanen *et al.*, 2000, Hormaza y Herrero 1999). Los factores externos más comunes están vinculados con la temperatura y la humedad (Stone *et al.*, 1995).

La viabilidad del polen se puede determinar indirectamente mediante diversos métodos, los que se pueden agrupar en *in vivo* o *in vitro*. Los primeros son más exactos, sin embargo, los *in vitro* resultan ser los más usados, debido a que son más sencillos y rápidos de realizar y tienen una buena correlación con la viabilidad *in vivo*. Entre los métodos *in vitro* podemos encontrar: 1) las técnicas de tinción morfológicas, mediante la cual se puede observar el contenido citoplasmático, el carmín acético y la orceína acética, 2) los test enzimáticos como la bencidina, las sales de tetrazolio y 3) métodos combinados los cuales permiten determinar tanto la integridad de la membrana citoplasmática como la presencia de actividad enzimática, como la reacción fluorocromática mediante diacetato de fluoresceína-FDA.

En los test enzimáticos o combinados se trata de establecer una conexión entre la fertilidad polínica y alguna característica enzimática o bioquímica de las células vivas. La reacción fluorocromática con diacetato de fluoresceína-FDA se basa en la facilidad que presenta esta sustancia para atravesar las membranas biológicas. Posteriormente este compuesto es hidrolizado en el citoplasma mediante la acción de una esterasa, con lo cual se libera la fluoresceína, que es retenida dentro del grano de polen. Así, se acumula en el citoplasma del polen y al ser observada en un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda adecuada (490 nm), el fluorocromo se excita emitiendo una fluorescencia de color verde brillante, la cual es fácilmente apreciable (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1970). Si la membrana de la célula vegetativa está dañada, la fluoresceína liberada puede salir del grano de polen y no se observa fluorescencia, lo mismo ocurre

si no existe la esterasa funcional. De esta manera se confirma con esta técnica la actividad enzimática y la integridad de la membrana celular.

1.5 TAMAÑO DE LOS GRANOS DE POLEN

Algunos autores proponen utilizar el tamaño del polen como un buen indicador del polen $2n$ (Veilleux *et al.*, 1982). Beaulieu *et al.* (2008) encontraron una correlación positiva entre el tamaño del genoma y tamaño de las células somáticas en general, con lo cual el tamaño del genoma determina el tamaño del polen. Algunos autores sugieren que el tamaño de polen aumenta con la ploidía (Altmann *et al.*, 1994, Orjeda *et al.*, 1990, Gould 1957). Quinn *et al.* (1974) analizaron el tamaño de los granos de polen en 46 especies diploides de *Solanum* siendo una de ellas *S. chacoense* (de Argentina) y encontraron tanto reducidos como $2n$. Los primeros medían en promedio entre 18 y 23 micras, mientras que los $2n$ medían en promedio de 26 a 33 micras. Dichos autores indican que la distribución del tamaño de polen fue bimodal para cada clon testado. Tarn y Hawkes (1986) posteriormente analizaron tamaño de polen en diploides de *S. commersonii* (de Sudamérica), así como la subespecie *malmeanum* ($2n=2x=24$, 1EBN) con la cual también coincide en su área de distribución en Uruguay y encontraron en ocho accesiones (diez clones) un promedio de granos de polen normales de 22 micras y entre 27 a 30 micras en los granos $2n$ (que aparecieron en proporción de 0,25 %) para *S. commersonii* y de 23 micras en el polen reducido para la ssp. *malmeanum*.

Pandolfi (1998) realiza una clasificación de los granos de polen reducidos según su diámetro para plantas de *S. commersonii* colectadas en diferentes localidades de Río Grande do Sul. Aquellos granos de polen que miden entre 7,5 a 10 μm son considerados pequeños, de 15 a 17,5 μm medianos y de 20 a 22,5 μm grandes.

1.6 ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES

Una población es un grupo de individuos de la misma especie que viven en un espacio y momento determinado. La estructura de las poblaciones nos puede dar una fotografía de su dinámica. Para estudiar dicha estructura se pueden utilizar factores demográficos como la edad, el tamaño, el estado reproductivo de cada ejemplar o su estructura genética. La estructura genética describe la variación en la frecuencia de alelos y genotipos entre los individuos (Hasting, 1996).

La diversidad genética es la variación del material genético dentro de una población determinada y es un componente de la diversidad genética. La variación entre poblaciones de una especie, más la variación dentro de las poblaciones es la diversidad genética total. La estructura poblacional constituye la cantidad de variabilidad genética y su distribución dentro y entre subpoblaciones locales e individuos dentro de una misma especie. La diversidad y estructura genética están influenciadas por varios factores, como son la deriva génica, flujo génico, la reducción poblacional, la selección natural y artificial, y los métodos de reproducción (Freeland, 2005). Conocer la diversidad genética de las poblaciones permite realizar un manejo y utilización óptimos. Para esto es necesario conocer la descripción taxonómica, morfológica, fisiológica y genética de las especies (Sevilla y Holle, 2004). Para realizar estudios de diversidad genética se cuenta con herramientas moleculares como los marcadores (Collard *et al.*, 2005).

Existen tres tipos de marcadores genéticos:

1) Morfológicos: los cuales en sí mismos son características fenotípicas tales como color de la flor, forma de la semilla, hábito de crecimiento y pigmentación. El inconveniente que presenta este tipo de marcador es la influencia que a veces tienen las condiciones ambientales sobre el fenotipo (Bonamico *et al.*, 2004).

2) Bioquímicos: como isoenzimas, proteínas, metabolitos secundarios.

3) Marcadores de ADN (o moleculares): los cuales revelan sitios de variación en el ADN. Entre los marcadores moleculares de ADN más destacados para la caracterización se encuentran los RFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), RAPD (Amplificación Polimórfica Aleatoria de DNA) y microsatélites o SSR (Secuencias Simples Repetitivas en tándem) (Jones *et al.*, 1997).

Las secuencias de tipo microsatélite (SSR) son muy abundantes en los genomas eucariotas. Están constituidas por unidades cortas de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem. Su frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies y también entre y dentro de poblaciones. Son altamente informativos a la hora de realizar estudios de diversidad genética poblacional. Dicha variación se observa como diferencias en la longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones (Ellegren, 2004). Son marcadores codominantes (los heterocigotas se pueden distinguir de los homocigotas) y por ello son mucho más informativos que los marcadores dominantes (RAPDs y AFLPs) para definir genotipos individuales. La mayor variabilidad de los microsatélites los hace particularmente útiles para la identificación y seguimiento del flujo de polen o la dispersión de la semilla. Ello hace también que estos marcadores sean sensibles a los cambios en la dimensión o estructura de la población que se mejora genéticamente y a los cambios de los niveles de dispersión (Slatkin, 1995).

El desarrollo de microsatélites en papa se ha basado en gran medida en las secuencias de ADN disponibles en base de datos públicas (Schneider y Douches, 1997, Ghislain *et al.*, 2004; Feingold *et al.*, 2005). Estos marcadores han sido aplicados para mapeo genómico, caracterización del germoplasma y clasificación taxonómica (Milbourne *et al.*, 1998; Ghislain *et al.*, 2004, Feingold *et al.*, 2005, van Os *et al.*, 2006, Spooner *et al.*, 2007).

Ghislain *et al.* (2004, 2009) caracterizaron alrededor de 1000 cultivares usando marcadores microsatélites, y desarrollaron un *kit* de identidad genética útil para la caracterización de los recursos genéticos de papa. El grupo de SSR para la identificación genética de papa (PGI – *kit*), fue desarrollado en el CIP (Ghislain *et al.*, 2004) con el fin de usarlo para caracterizar de manera rápida y eficiente diversas variedades de papa cultivadas y silvestres.

Aunque el desarrollo de los microsatélites se ha hecho más accesible en los últimos años, el costo y esfuerzo para obtenerlos es todavía significativo. La transferencia de cebadores que amplifican loci microsatélites desde otras especies es una práctica habitual para obtener marcadores adecuados para estudios de genética poblacional. Los cebadores diseñados en una especie (fuente) son utilizados para amplificar loci homólogos en especies relacionadas (blanco) (Kayser *et al.*, 1996). Se supone que el éxito de transferencia depende de la conservación de la secuencia en los sitios que flanquean los loci de microsatélites y la estabilidad de estas secuencias durante la evolución (Zhang y Hewitt, 2003). Por lo tanto, se espera que la probabilidad de éxito de la amplificación de especies cruzadas está inversamente relacionada con la distancia genética entre las especies (Zucchi *et al.*, 2002). O sea, que especies cercanas filogenéticamente compartan un mayor número de marcadores y la distancia genética entre especies podría ser un parámetro para predecir el éxito de la transferencia entre diferentes grupos taxonómicos.

También los marcadores moleculares nos permiten hacer una inferencia sobre cómo es la estructura de la población. En el caso de plantas clonales, existen una serie de efectos de este modo de reproducción en su organización espacial. Cada unidad, individuo u organismo potencialmente independiente se denomina ramet y todos los organismos que se formen producto de un cigoto se denominan genet. Partimos del hecho de que las poblaciones se encuentran formados por ramets o sea que pueden o no

tener la misma dotación genética, y que los mismos pueden presentar distintos tipos de patrones de distribución, el cual depende de la forma en la cual el ramet se origina. Teniendo en cuenta esto, se puede observar tres patrones diferentes: aleatorio, uniforme y agregado (Mandujano Sánchez MC, 2007). Asimismo, existe la posibilidad de que ramets de distinta constitución genética de mezclen entre sí o que se mantengan separados (Carrillo-Angeles y Mandujano, 2011).

A partir de toda la información que se dispone, nos planteamos estudiar poblaciones naturales de *Solanum commersonii* en Uruguay. Se analizará la diversidad genéticas de las mismas mediante el uso de marcadores moleculares de tipo SSR. Posteriormente se estudiará la microgametogénesis para determinar que tipo de mecanismo se encuentra involucrado en la formación de los gametos no reducidos.

**2. RIQUEZA CLONAL, DISPERSIÓN CLONAL Y ESTRUCTURA
GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES DE *SOLANUM
COMMERSIONII* DE URUGUAY ANALIZADAS MEDIANTE
MARCADORES MICROSATÉLITES**

Silveira Manuela¹, Gaiero Paola¹, Speranza Pablo¹

**¹ Laboratorio de Evolución y Domesticación de las plantas,
Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad
de la República, Montevideo, Uruguay**

Autor para la correspondencia: Pablo R Speranza pasp@fagro.edu.uy

Garzón 780

CP: 12900

Montevideo, Uruguay

Clones de *Solanum commersonii* en Uruguay

2.1 RIQUEZA CLONAL, DISPERSIÓN CLONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES DE *SOLANUM COMMERSONII* DE URUGUAY ANALIZADAS MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

Resumen

Para analizar la diversidad genética de un pariente silvestre de los cultivos (CWR), *Solanum commersonii* de Uruguay, se evaluó 8 marcadores SSR en una muestra de 12 poblaciones, formadas por individuos 2x, 3x y mezcla de ambos niveles de ploidía. Se caracterizó según número de alelos y contenido de información polimórfica (PIC). Tres marcadores SSR mostraron productos legibles (número de alelos: 6 a 9, PIC promedio 0,67). El análisis de coordenadas principales no detectó estructura poblacional, salvo la separación de las poblaciones del litoral y el sur. Se identificaron hasta 5 clones por población, y se observó que los ramets de un mismo clon tienden a agruparse sin mezclarse con los otros clones, con un rango de dispersión clonal entre 3,90 m - 83,45 m. En caminos con tránsito la dispersión puede aumentar y las barreras geográficas (ej.: cursos de agua) tienden a separar clones diferentes de una misma población. Se observó que los cariotipos 3x no se separan genéticamente de los 2x. Existe una moderada correlación entre diversidad genética y distancia geográfica cuando se analizan todas las poblaciones juntas, pero se pierde al analizar por separado las del litoral y del sur. En principio la captura de la diversidad genética no se vio afectada por la cantidad de individuos colectados. Se sugiere al momento de colectar, que los ramets estén separados entre sí por lo menos unos 50 m para capturar la mayor variabilidad genética posible de *S. commersonii*, prestando atención a las alteraciones antrópicas y las barreras naturales.

Palabras clave: microsatélites, estructura genética, riqueza clonal, distribución geográfica, parientes silvestres de los cultivos

2.2 CLONAL RICHNESS, CLONE DISPERSAL AND GENETIC STRUCTURE IN NATURAL POPULATIONS OF *SOLANUM COMMERSONII* FROM URUGUAY ANALYZED THROUGH MICROSATELLITE MARKERS

Summary

To analyze the genetic diversity of *Solanum commersonii*, a crop wild relative (CWR) from Uruguay, we assessed a set of 8 SSR markers on a sample from 12 populations composed of 2x and 3x individuals and also a mixture of both ploidy levels. Each marker was characterized according to number of alleles and polymorphic information content (PIC). Only 3 SSR markers showed readable products (6 to 9 alleles, PIC = 0,67). The Principal Coordinates analysis did not detect population structure, except for the distinction between populations from the northwest and from the south. Up to 5 clones were identified per population, and ramets from the same clone tend to group without mixing with other clones, with clonal dispersal distances ranging from 3.90 m to 83.45 m. On busy roads or after roadworks, the natural dispersal of ramets can be boosted. Geographic barriers (such as water courses) tend to separate different clones from the same population. We observed that 3x genotypes were not genetically discriminated from 2x genotypes. There is a moderate correlation between genetic diversity and geographic distance when all populations are analyzed together, but it is lost when populations from the northwest and from the south are analyzed separately. Genetic diversity representation was not affected by the number of individuals collected per population. We propose that when planning a collection trip, ramets collected should be separated at least 50 m to capture the most genetic variability possible from *S. commersonii*, taking into account anthropic disturbances and natural barriers.

Keywords: microsatellites, genetic structure, clonal richness, geographic distribution, crop wild relatives

2.3 INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la diversidad genética y la distribución de los parientes silvestres de los cultivos (CWR por su sigla en inglés), tiene varios usos en mejoramiento, conservación de germoplasma (Wu, Krutovskii y Strauss, 1999) y también ayuda a formular estrategias de muestreo apropiadas para su conservación *in situ* y *ex situ* (Millar et al., 2000). Los CWR han sido utilizados durante décadas para el fitomejoramiento, aportando una amplia gama de caracteres agronómicos y nutricionales beneficiosos (Van der Vossen et al., 2003; Hijmans et al., 2003). Es esperable que su uso aumente como resultado de las mejoras continuas en la información disponible sobre su diversidad y los avances en las herramientas de mejoramiento (Laferriere, Helgeson y Allen, 1999; González et al., 2013).

Como todos los cultivos, la papa es susceptible a plagas y enfermedades (factores bióticos), a efectos climáticos adversos como sequías, heladas, así como también a pobreza de suelos y estrés salino (factores abióticos), disminuyendo su producción con consecuencias económicas negativas. Ante esta situación, los programas de mejoramiento buscan introducir a los cultivares la resistencia y tolerancia genética a estos factores, mediante la incorporación de un rango mayor de diversidad genética que proviene básicamente de la cruce con CWR (Palta, Chen y Li, 1981; Ashkenazi et al., 2001).

La especie *S. commersonii* Pior. es nativa de Uruguay, donde tiene su centro de diversidad primario, este de Argentina, sur de Paraguay y Brasil (Hawkes, 1990). Se han descrito dos subespecies, *S. commersonii* ssp. *commersonii* y *S. commersonii* ssp. *malmeanum* (Hawkes, 1990). En trabajos más recientes (Spooner et al. 2014) se las considera dos especies diferentes. La primera se encuentra en nuestro país al sur del Río Negro, mientras la otra está localizada al norte, en la región limítrofe con Brasil (Siri et al., 2009). Es posible distinguir estas dos subespecies por caracteres morfológicos. *S. commersonii* ssp. *commersonii* presenta un folíolo terminal grande con

folíolos laterales sésiles y el cáliz de la flor con sépalos ovales acuminados, en cambio la ssp. *malmeanum* tiene su folíolo terminal y los laterales similares en tamaño? , algunos con peciólulos y los sépalos de la flor son triangulares (Hawkes, 1990). La especie presenta tanto reproducción sexual como asexual. En la reproducción asexual o vegetativa, la nueva planta surge a partir de tubérculos, estolones, brotes o yemas, dando lugar a descendientes genéticamente idénticos a la planta progenitora, o sea un clon. El cariotipo de esta especie es diploide ($2n=2x=24$), teniendo algunos de sus clones la capacidad de producir gametos no reducidos ($2n$) (Masuelli, 1990). Existen poblaciones naturales con individuos triploides ($2n=3x=36$), de los cuales no se sabe su origen.

Es una especie de considerable valor potencial en mejoramiento, ya que presenta resistencia a factores adversos, abióticos (sequías, heladas) (Palta, Chen y Li, 1981) y bióticos (virus X e Y, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, *Verticillium*, *Alternaria solani*, *Ditylenchus destructor*). El inconveniente que presenta es que se encuentra reproductivamente aislada (Ehlenfeldt y Hanneman, 1988) por lo cual para realizar cruzamientos con *S. tuberosum* es necesario realizar manipulaciones de ploidía (poliploidización) que se pueden ver facilitados por la utilización de especies “puente” (Jansky, 2006). La mayoría de las inclusiones de *S. commersonii* en programas de mejoramiento en Uruguay y otros países, se basaron en la utilización de unos pocos clones, por ello es importante ampliar la base genética al evaluar poblaciones que cubren diversos hábitats en nuestro país.

Las plantas clonales forman más de un individuo con la misma dotación genética. El módulo es la unidad básica que se repite a medida que el individuo crece, es el nivel más sencillo (Harper, 1977), o sea que una agrupación de ellos puede originar una unidad potencialmente independiente (denominada ramet). Todos los organismos que se formen producto de un cigoto forman un genet (Jackson, Buss y Cook, 1985; Tiffney y Niklas, 1985), por lo que un ramet es una parte del genet. La mayoría de los trabajos en

plantas clonales presentan análisis a nivel de ramets (Madujano et al., 2001) ya que no se puede diferenciar un genet de un ramet si no se usan técnicas moleculares (Liston et al., 2003). El crecimiento clonal produce descendencia idéntica a la planta progenitora, con lo cual se esperaría que esto afecte negativamente los niveles de diversidad genética dentro de la población, aunque algunos estudios han demostrado lo contrario (Widen, Cronberg y Widen, 1994; Richards et al., 2004). La mayoría de las plantas clonales también se reproducen de manera sexual lo cual provee diversidad genética, la cual se mantiene por reproducción asexual en ambientes estable. (Watkinson y Powell, 1993; Stehlik y Holderegger, 2000). La partición de la diversidad genética (mayor diversidad intra- que interpoblacional o viceversa) estará dada por el grado de reproducción sexual que se produzca, la cantidad de genets en una población y la distribución espacial de ramets de distintos genets (Carrillo-Angeles y Mandujano, 2011).

En este tipo de plantas los patrones de distribución espacial se pueden ver afectados en gran medida debido a la forma por la cual se originan los ramets y se los clasifica en tres patrones: aleatorio, uniforme y agregado (Mandujano Sánchez, 2007). Además, la organización espacial de los genets y ramets puede darse en dos patrones, uno en el cual los ramets del mismo genet se agregan y el otro donde se entremezclan los ramets de distintos genets (Carrillo-Angeles y Mandujano, 2011). En plantas cuya reproducción asexual se basa en la producción de tubérculos y estolones, se esperaría que presenten una distribución agregada y que no haya mezcla de diferentes genets. Esto es lo que esperaríamos encontrar, ya que *S. commersonii*, presenta estolones, los cuales se han descrito como largos (Cardi et al., 1993). Por todo lo mencionado anteriormente, es importante conocer cómo se estructura la diversidad genética de *Solanum commersonii*, lo cual nos permitirá manejarla y utilizarla de manera óptima. Esto permitirá a los programas de mejoramiento seleccionar accesiones más diversas a partir de las cuales incorporar en los cultivares modernos genes para caracteres

como resistencia a factores adversos o relacionados con una mayor productividad (Spooner et al., 1998).

Para realizar estudios de diversidad genética se dispone de herramientas moleculares, como por ejemplo los marcadores codominantes microsatélites (SSR) con las cuales se pueden determinar la diversidad genética y su estructura. Esta información es valiosa para la planificación de colectas eficientes.

El objetivo del presente trabajo es cuantificar la diversidad genética de las poblaciones naturales de *Solanum commersonii* y su distribución espacial en Uruguay, con la finalidad de realizar colectas eficientes y eficaces. Para esto se realizarán colectas exhaustivas en 12 poblaciones naturales en Uruguay y se caracterizarán los individuos con marcadores SSR. Dicha información puede ser utilizada para explorar la posibilidad de introducir nuevas accesiones en los programas de mejoramiento.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Material vegetal

Los individuos analizados corresponden a 12 poblaciones naturales distribuidas como se indica en la Figura 1. Durante la colecta de los ramets en cada población, se utilizó un equipo de GPS para obtener las coordenadas geográficas (Tabla 1). Con ellas se realizó una representación geográfica para observar la dispersión de los ramets, midiendo la distancia entre los dos ramets más lejanos de un mismo genet. Se colectaron hojas de hasta 25 ramets diferentes, las cuales se conservaron en sílica gel para su posterior análisis. El criterio utilizado al momento de elegir los ramets fue que estuvieran lo más alejados entre sí para poder capturar la mayor diversidad posible.

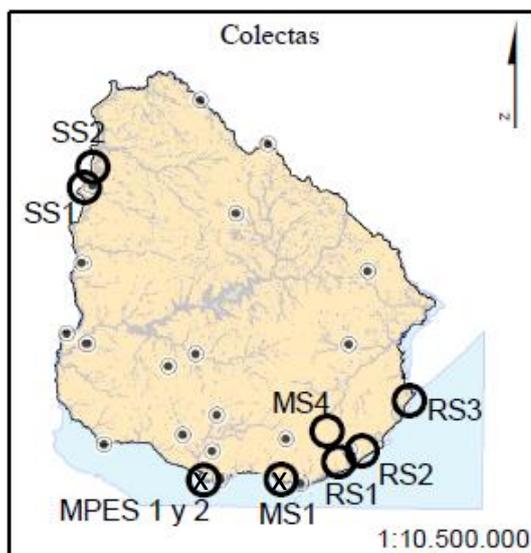


Figura 1. Poblaciones silvestres colectadas en Uruguay con sus correspondientes niveles de ploidía (Círculo vacío: poblaciones 2x, círculo con x: poblaciones con ambos niveles de ploidía 2x y 3x). Coordenadas geográficas Uruguay: 34°50"S/56°24W

Cuadro 1. Individuos analizados, código de identificación, localización y nivel de ploidía.

Identificación	Coordenadas geográficas y Departamento de colecta (*)	Nivel de ploidía
MPES1cmm5	34°50'24.50"S/56°24'17.50"W Montevideo	2x
MPES1cmm19	34°50'25.82"S/56°24'18.7"W Montevideo	2x
MPES1cmm26	34°50'25.94"S/56°24'18.66"W Montevideo	2x
MPES1cmm27	34°50'24.61"S/56°24'17.13"W Montevideo	2x
MPES1cmm6	34°50'25.00"S/56°24'17.70"W Montevideo	2x
MS1cmm6	34°49' 03.8"S/55°19'13.1"W Maldonado	2x
MS1cmm8	34°49' 03.9"S/55°19'12.8"W Maldonado	2x
MS1cmm11	34°49' 04.2"S/55°19'12.7"W Maldonado	2x
MS1cmm36	34°49'3.6"S/55°19'13.6"W Maldonado	2x

MS4cmm1	34°17'26"S/54°39'36.3"W Maldonado	2x
MS4cmm4	34°17'26"S/54°39'36.9"W Maldonado 34°17'30.6"S/54°39'27.7"W	2x
MS4cmm17	Maldonado 34°17'30.6"S/54°39'27.4"W	2x
MS4cmm21	Maldonado	2x
RS1 cmm1	34°38'48.36"S/54°30'42.72"W Rocha	2x
RS1 cmm10	34°38'48.06"S/54°30'41.34"W Rocha	2x
RS1 cmm15	34°38'48.3"S/54°30'39.06"W Rocha	2x
RS2cmm1	34°28'2.28"S/54°10'42.48"W Rocha	2x
RS2cmm10	34°28'1.08"S/54°10'43.98"W Rocha	2x
RS2cmm14	34°27'59.94"S/54°10'45.36"W Rocha	2x
RS3cmm3	33°55'2.04"S/53°34'13.56"W Rocha	2x
RS3cmm7	33°55'2.1"S/53°34'13.08"W Rocha	2x
SS1chc13	31°27'21.18"S/58°01'11.04"W Salto	2x
SS1chc14	31°27'21.54"S/58°01'11.82"W Salto	2x
SS2chc2	31°16'37.74"S/57°53'45.06"W Salto	2x
SS2chc13	31°16'38.34"S/57°53'42.06"W Salto	2x
SS2chc9	31°16'37.62"S/57°53'43.44"W Salto 32°56'8.4"S/54°58'1.0"W Treinta y	2x
TTS1cmm2	Tres	2x
AS1chc8	30°29'27.66"S/56°28'31.8"W Artigas 34°50'23.5"S/56°24'40.4"W	3x
MPES2cmm1	Montevideo 34°50'22.8"S/56°24'38.6"W	3x
MPES2cmm8	Montevideo 34°50'24.7"S/56°24'40.74"W	3x
MPES2cmm18	Montevideo 34°53'47.6"S/55°02'17.3"W	3x
MS2 cmm16	Maldonado 34°50'02.5"S/54°38'14.0"W	3x
MS3 cmm1	Maldonado	3x

(*) Departamento: es la subdivisión político-territorial del Uruguay

2.4.2 Extracción de ADN

El ADN de cada ramet se obtuvo a partir de hojas conservadas en sílica gel mediante el protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987), con algunas modificaciones. La molienda de tejido folial (10-20 mg) se realizó con nitrógeno líquido, luego se adicionó 500 µL de buffer CTAB y se puso a

incubar a 55 °C por 60 minutos. Se agregó 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima, para luego recuperar la fase acuosa. Para la precipitación del ADN se agregó acetato de amonio 7.5 M junto con iso-propanol y se incubó a -20° C por 30 minutos. Después se realizaron dos lavados con alcohol 70 % y 95 % respectivamente. El ADN se resuspendió en agua mili-Q. La calidad de las extracciones se verificó en geles de agarosa al 2 %, en una solución amortiguadora TBE 1X (90mM tris, 90mM ácido bórico, 20mM EDTA pH=8) a 110 voltios constantes. Se cargaron 9 µL de muestra junto con 1 µL de solución amortiguadora de carga (glicerina 50 %, azul de bromofenol 0,25 % y xileno cianol FF 0,25 %). Se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Cat. n° SM0331). Luego se tiñó el gel con bromuro de etidio (10 mL de bromuro de etidio 10 mg/mL diluidos en 100 mL de H₂O destilada) durante 5 minutos. Para visualizar el ADN genómico extraído se utilizó un transiluminador UV con una cámara digital acoplada.

2.4.3 Loci SSRs y condiciones de amplificación

Se utilizó un grupo de 8 marcadores microsatélites descritos por Ghislain et al. (2009) y de posición conocida en el mapa genético de la papa (Cuadro 1). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 15 µL, que contenía 2 µL de ADN resuspendido en agua mili-Q, 10X de buffer PCR (Tris 20 mM, KCl 50mM, pH 8,4), 25 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada dNTP, 5 µM de M13 (CACGACGTTGTAACGAC), FAM o HEX, 5 µM de cada cebador y 5 U de enzima Taq polimerasa. El programa de PCR consistió en un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 4 min; 33 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento de 53 a 58 °C por 1 min dependiendo del cebador, elongación a 72 °C por 1 min y finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 4 min.

Cuadro 2. Caracterización de los marcadores microsatélites utilizados según Ghislain et al. (2009). Se incluye la identificación del cebador SSR, la unidad de repetición, la secuencia del cebador tanto *Forward* como *Reverse*, su localización en el mapa genético de la papa y su temperatura de renaturalización.

SSR	Repetición	Primer 5'-3'	Localización	T _A (°C)
STI0009	(AGC)n(AAC)n	F: GCGAAAACCTTGAAGCAACT R: CTGCTGTTGCTGTTGATGGT	Cromosoma I	56
STM0037	(TC)n (AC)n AA (AC)n (AT)n	F: ATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC R: ATTTGGTTGGGTATGATA	Cromosoma XI	53
STM2028	(TAC)n..(TA)n.. (CAT)n	F: TCTCACCAGCCGGAACAT R: AAGCTGCGGAAGTGATTTTG	Cromosoma XII	56
STG0021	(AAGA)n	F: TGCCTACTGCCCAAACATT R: ACTGGCTGGGAAGCATAAC	Cromosoma V	54
STI0014	(TGG)n (AGG)n	F: AGAACTGAGTTGTGTTGGGA R: CAACAGTCTCAGAAAACCTCT	Cromosoma IX	54
STG0010	(TG)n	F: CGATCTCTGCTTTGCAGGTA R: GTTCATCACTACCGCCGACT	Cromosoma III	58
STG0033	(CGG)n	F: GCTCATTGACTGCTAAACCC R: GAAAGAATTGTGCCGTCGAT	Cromosoma II	54
STG0025	(AAAC)n	F: TGAATCCGAATTACGCTCT R: AGTTTTACCACTCGGGCTT	Cromosoma X	56

Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2 % en una solución amortiguadora TBE 1X a 110 voltios constantes durante dos horas. La visualización de las bandas se realizó con un transiluminador UV con una cámara digital acoplada. Todas las muestras que presentaron amplificación de fragmentos de ADN fueron enviadas a resolver mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems) en el Instituto Pasteur y en la DNA Analysis Facility de la Universidad de Yale (<http://dna-analysis.research.yale.edu/>). En última instancia, los electroferogramas resultantes fueron analizados usando el software Peak Scanner™ Version: 1.0 © Copyright 2006 Applied Biosystems para poder asignar los alelos y formar una base de datos conteniendo los genotipos de cada una de las muestras. Cada alelo de SSR correspondiente a una banda amplificada se registró con “1” ó “0”, según su presencia o ausencia, respectivamente, para cada genotipo.

2.4.4 Análisis estadísticos

Con los datos obtenidos con los SSR se realizó un análisis de coordenadas principales, correlogramas y análisis de distancia genética. El cálculo del contenido de información polimórfica (PIC) se realizó utilizando el programa *Info-Gen* (Balzarini y Di Rienzo, 2003). Este parámetro es frecuentemente utilizado para medir la capacidad discriminadora de marcadores SSRs. El PIC calculado puede variar entre 0 y 1, indicando un mayor nivel de polimorfismo o variación cuando el valor es más cercano a 1.

El cálculo de la diversidad genotípica (genet) o riqueza clonal se realizó utilizando la fórmula $R=(G-1)/(N-1)$, donde G corresponde a los genets y N el número total de ramets muestreados (N) (Dorken y Eckert. 2001). Los valores posibles van desde 0 (cuando hay un solo clon en la población) hasta 1.

2.5 RESULTADOS

Tres de los pares de cebadores ensayados no amplificaron en el material de estudio (STG0010, STG0033, STG0025) y dos resultaron monomórficos (STG0021, STI0014). Los tres marcadores que resultaron polimórficos (STI0009, STM0037, STM2028) mostraron altos valores de PIC que variaron entre 0,580 y 0,757 (Cuadro 3). Ninguna de las poblaciones presentó alelos exclusivos.

Cuadro 3. Marcadores SSR seleccionados y polimorfismos detectados en términos de número de alelos e índice de contenido polimórfico (PIC).

SSR	Número de alelos	PIC
STI0009	9	0,757
STM0037	9	0,674
STM2028	6	0,580

El Análisis de Coordenadas Principales obtenido para los datos de los marcadores SSRs empleados se representa en la figura 2. Las dos primeras coordenadas, que explican una variación del 24,10 % y 14,97 %, respectivamente, separan las poblaciones del litoral y sur, sin evidenciar patrones espaciales y de estructura genética. Lo que se observa también, es que los individuos triploides (AS1, MPES2, MS2 y MS3) no se separan genéticamente de los individuos diploides.

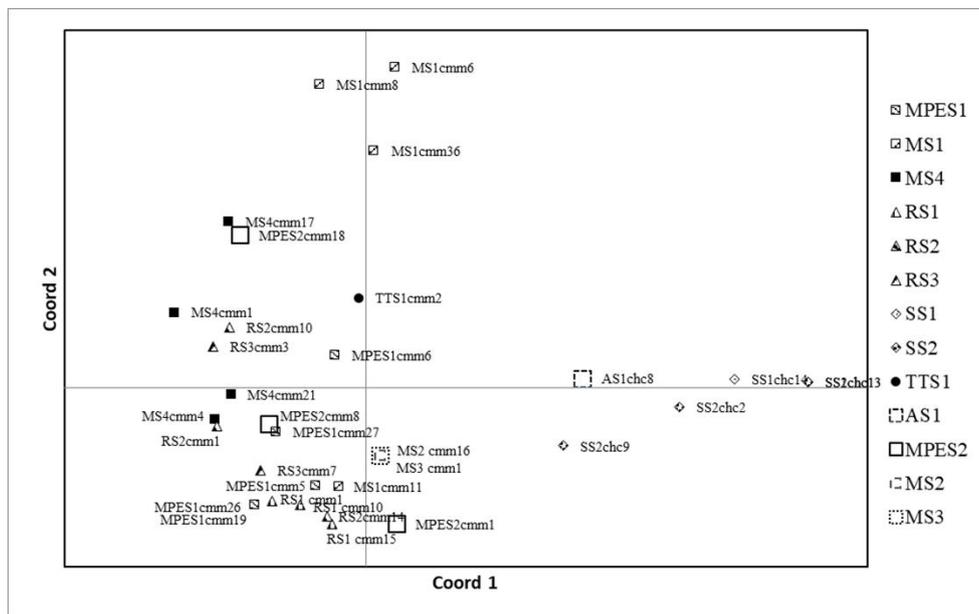


Figura 2. Coordenadas principales de la variabilidad genética de *Solanum commersonii* en Uruguay. AS1, MPES2, MS2 y MS3 son poblaciones constituidas por individuos triploides.

En las 12 poblaciones estudiadas se identificaron entre uno y cinco clones como genotipos multilocus. En aquellas que se encuentran formadas sólo por individuos diploides (MPES1, MS1, MS4, RS1, RS2, RS3 y SS2) fue posible identificar hasta cinco, salvo en TTS1 en que sólo se observó un clon. En AS1, MS2 y MS3 (constituidas por individuos triploides) se encontró sólo un clon, mientras que en MPES2 se pudo identificar 3. Los valores de la riqueza clonal encontrados variaron desde 0 hasta 0,43.

Se recogieron la misma cantidad de plantas (12) en RS1 y en RS2, siendo el área de la primera mucho mayor (2098,6 m² y 1058,4 m² respectivamente).

Pero en las dos poblaciones se encontraron la misma cantidad de clones (tres). En cambio, se recolectaron muchas más plantas en TTS1 (16) que en MS4 (ocho), teniendo las dos un área similar (2636,5 m² y 2169,2 m²), encontrándose en la primera un solo clon, mientras que en la segunda fueron cuatro.

Cuadro 4. Información poblacional y resultados de diversidad genética. Se detallan códigos de poblaciones, tamaños poblacionales (en número de ramets), área que ocupa la población, G: genotipos multilocus, R: riqueza clonal y la dispersión que alcanza cada ramet en los diferentes clones.

Población	Tamaño	Área (m ²)	G	R	Dispersión clonal (m)
AS1	28	822,60	1	0	46,97
MPES1	21	1160,50	5	0,20	29,05-58,80
MPES2	15	1205,20	3	0,14	7,92-47,10
MS1	15	411,20	4	0,21	3,90-20,52
MS2	15	587,50	1	0	56,16
MS3	15	1920,50	1	0	57,34 81,19-
MS4	8	2169,20	4	0,43	244,15*
RS1	12	2098,60	3	0,18	15,52-51,21
RS2	12	1058,40	3	0,18	57,13
RS3	9	517,10	2	0,13	42,87
SS2	13	3239,70	3	0,17	**
TTS1	16	2636,50	1	0	83,45

*probablemente debido a dispersión antrópica. **población en plantación de naranjos

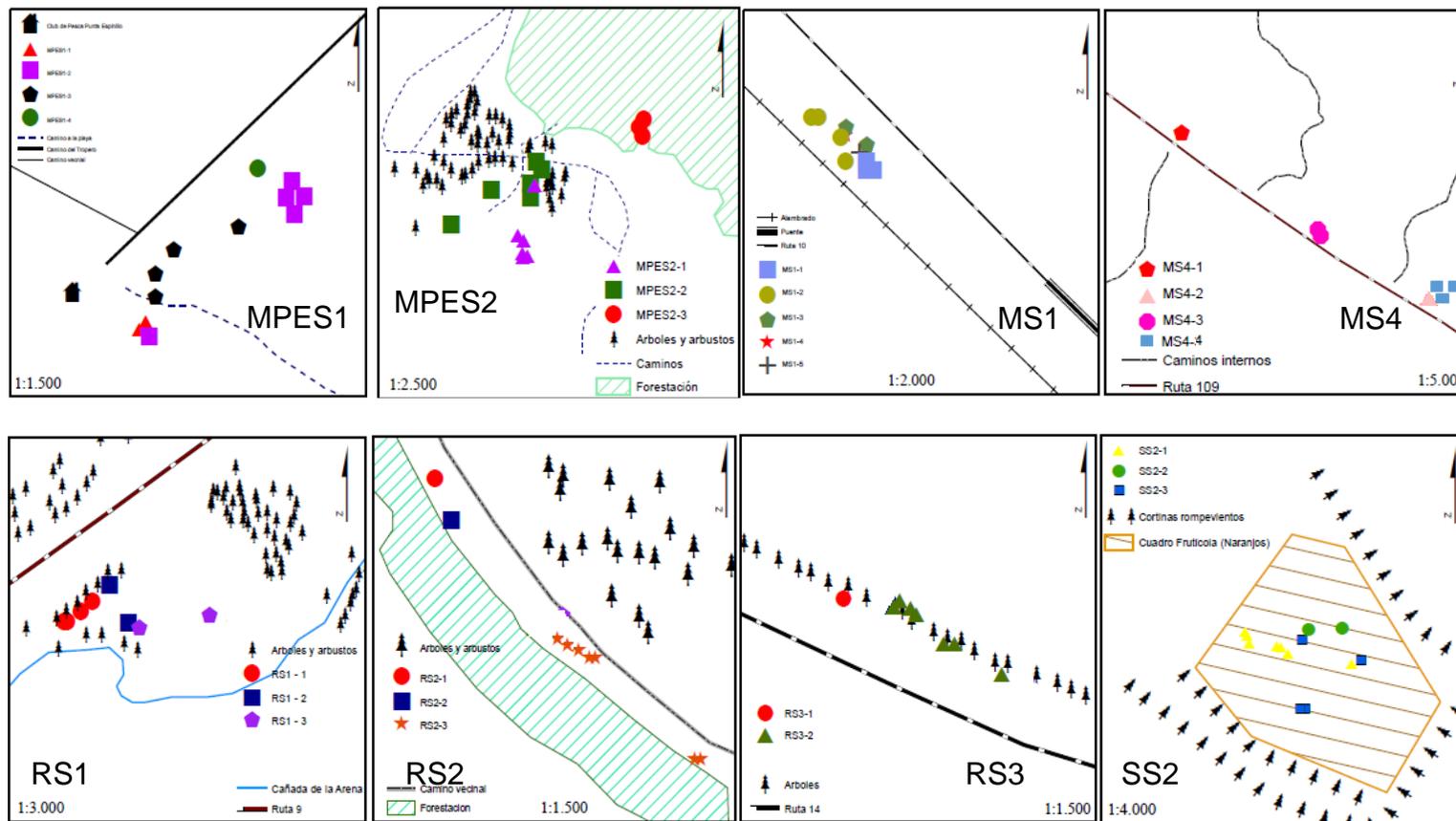


Figura 3. Distribución espacial de los ramets y genets en poblaciones naturales de *Solanum commersonii*. Distintos símbolos representan distintos genets. Puntos con un mismo símbolo dentro de un mismo cuadro, representan ramets del mismo genet. Símbolos en común en diferentes cuadros, no representan genets iguales.

En las poblaciones naturales analizadas es posible observar cómo los ramets de un mismo clon tienden a agruparse sin mezclarse con los otros clones, salvo en alguna excepción (población MPES1) (figura 3). Se encontraron diferentes rangos de dispersión de los clones que van desde 3,90 m hasta 83,45 m. En la población MS4, ubicada sobre un camino rural transitado, se obtuvo un valor muy grande (244,15 m). En SS2 no se tomaron datos, debido a que la misma se encuentra en una plantación que puede haber afectado los resultados.

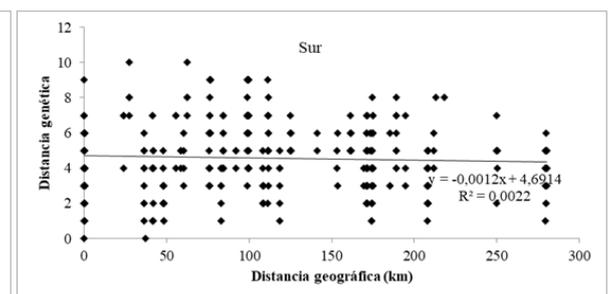
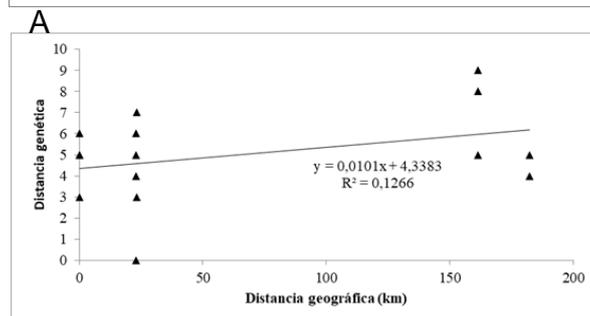
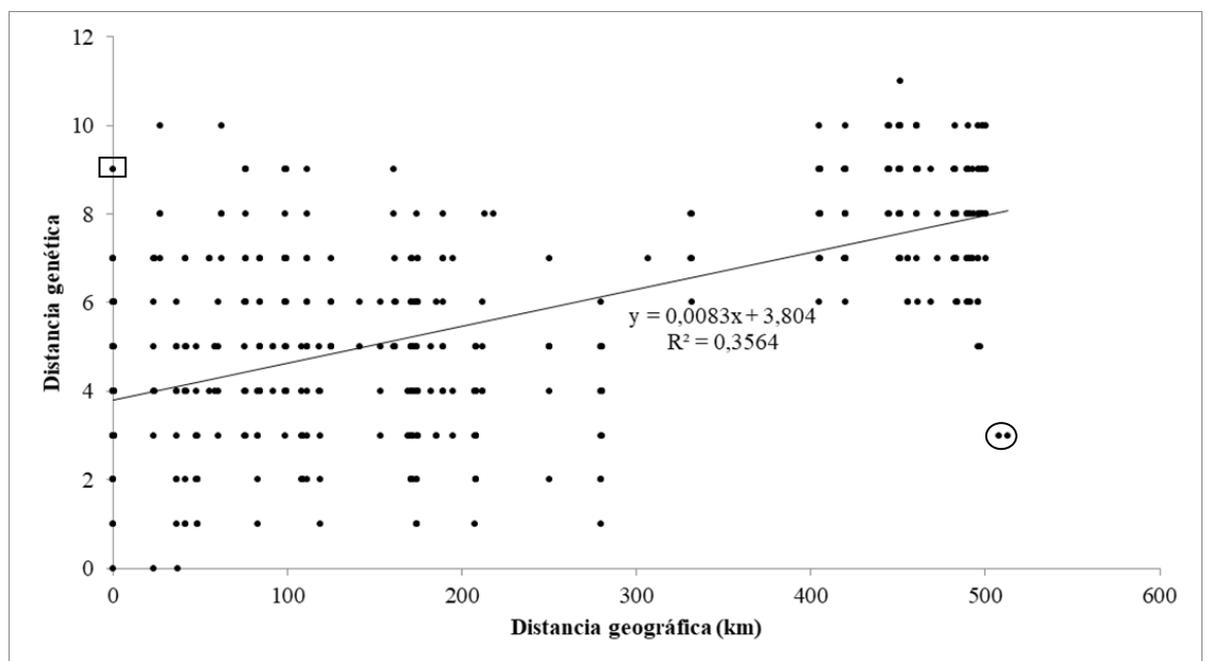


Figura 4. Correlograma de distancia genética y distancia geográfica. A) total de las poblaciones, B) poblaciones del sur (Maldonado, Montevideo, Rocha y Treinta y Tres), C) poblaciones del litoral (Artigas y Salto).

Para conocer si existe correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, se realizó un correlograma (figura 4). Cuando se analizan las poblaciones del litoral y las del sur juntas, es posible observar una moderada correlación ($R=0,35$) entre distancia genética y geográfica. En cambio, cuando se analizan por separado dicha correlación se pierde (Litoral $R=0,1266$, Sur $R=0,0022$). Es posible observar algunos casos particulares donde la diversidad genética es importante a pesar que se encuentran próximos geográficamente (dos clones de MS1, figura 4A rectángulo) o la distancia genética es baja a pesar de que se encuentran muy lejos (AS1 y MS2 o AS1 y MS3 (figura 4a elipse).

2.6 DISCUSIÓN

Esta investigación estudia el acervo genético de diversas poblaciones de *Solanum commersonii* en Uruguay empleando marcadores moleculares de tipo SSR. El conocimiento de los niveles y distribución de la diversidad genética en estas poblaciones es un requisito importante para diseñar estrategias eficientes y exitosas de muestreo (Francisco-Ortega et al., 2000). También es importante contar con herramientas adecuadas para evaluar esa diversidad genética.

Los marcadores SSR empleados mostraron valores promedios de información polimórfica ($PIC = 0,67$) dentro del rango esperado. Estudios previos de SSRs donde se incluyen genotipos diploides de *S. tuberosum* muestran valores de PIC en un rango de 0,00 - 0,64 (Ghislain et al., 2006) y 0,25 - 0,89 (Ghislain et al., 2009). Ghislain et al. (2009) indican que para *S. tuberosum* el uso de SSRs que presenten altos valores de PIC ($> 0,5$), es el más apropiado para la caracterización genética de una población. En caso que los valores de PIC sean menores a 0,5, sería necesario aumentar el número de marcadores. Por lo tanto, a pesar que no utilizamos un número elevado de marcadores, estos fueron altamente informativos.

Para capturar la máxima diversidad, en este trabajo proponemos la estrategia de basar las colectas en la información obtenida en los correlogramas. Esto proporciona una ventaja sobre la recolección indiscriminada, ya que resulta en una representación consistente de la variabilidad genética de la especie y minimiza la probabilidad de muestrear individuos con la misma constitución genética. Por lo tanto, coleccionar más o menos plantas no nos asegura tener una buena representación de la diversidad genética, aunque Marshall y Brown (1975) proponen recolectar entre 50 a 100 individuos si no se ha realizado previamente un estudio utilizando marcadores moleculares. Hay que considerar también el tipo de sistema de reproducción (Brown 1990), el tamaño de la población, el ciclo de vida, entre otros. Considerando que en este trabajo se coleccionaron un máximo de 25 individuos por población y que finalmente el número de muestras que tuvieron datos de SSRs fue menor y variable (Cuadro 1), la diversidad genética representada en las muestras coleccionadas de cada población es promisorias y capturamos varios clones distintos incluso con muestras muy pequeñas.

Debido a que *S. commersonii* presenta tanto reproducción asexual como sexual, es importante considerar si la recolección sólo de clones, y no de semillas, estaría ocasionando una captura menor de diversidad, ya que se asume que la recolección de semillas *in situ* captura una mayor diversidad genética. En *Solanum stoloniferum*, especie tetraploide disómico que presenta reproducción asexual y autógama, se capturó más diversidad genética coleccionando clones que semillas y en *Solanum jamesii* (también emparentada con *S. commersonii*), que es diploide de fecundación cruzada (alógama), se encontró lo contrario (Bamberg, del Río y Moreira, 2009). Por lo tanto, al momento de planificar una colecta y decidir qué tipo de propágulos coleccionar, es importante tener en cuenta el comportamiento reproductivo de la especie.

También es necesario tener en cuenta al planificar las colectas que las poblaciones naturales de *S. commersonii* en Uruguay varían en su riqueza clonal. Esto se debe a que en las poblaciones constituidas por plantas clonales el número de ramets no refleja la cantidad de genets que contienen. La relación entre estas dos (genet/ramet) proporciona un índice del grado de clones en una población. La riqueza clonal entre las especies con diversos modos de propagación asexual varía entre 0,17 (Ellstrand y Roose 1987) y 0,47 (en especies que presentan estolones) (Arnaud-Haond et al., 2007). Asimismo, Honnay y Jacquemyn (2008) han estimado un valor promedio de 0,4 excluyendo especies apomícticas y los árboles. Los valores encontrados en este trabajo van de 0 a 0,43 (Cuadro 1), o sea que se encuentran dentro del rango descrito incluso llegando al extremo superior, siempre considerando el pequeño tamaño de muestra en relación al área de las poblaciones.

Otro efecto causado por la clonalidad es la disposición espacial de los ramets de los diferentes clones. Las plantas que se clonan por órganos que no se dispersan fácilmente (por ejemplo, tubérculos), presentan altos niveles de agregación clonal (Vallejo-Marín, Dorken y Barrett, 2010). Cuando se reproducen mediante estolones también tienden a agregarse, pero se puede llegar a observar algún ramet de un clon mezclado con los ramets de otro clon. En algunas de las poblaciones de este trabajo se puede observar esa situación (Figura 3), pero en la mayoría los ramets de cada clon se presentan por separado. Estas observaciones aisladas pueden deberse al efecto de la mayor dispersión de los estolones o a acciones antrópicas (Rusterholz, Kissling y Baur, 2009) (construcción de carreteras, remoción de terreno, etc) que dispersen los tubérculos a grandes distancias. Sin embargo, en general la dispersión observada corresponde a las pequeñas distancias abarcadas por tubérculos y las más lejanas a los estolones, como lo proponen Vallejo-Marín, Dorken y Barrett (2010). Estudios previos hallaron que los clones pueden extenderse más de 10 m, como es el caso de *Spartina patens* (Silander 1979), siendo la más extrema *Pteridium aquilinum*

con una extensión de 1015 m (Parks y Werth 1993). En nuestro caso, lo máximo fue de 83,45 m y lo mínimo de 3,90 m. En la población MS4, ubicada sobre un camino rural transitado, se obtuvo un valor muy grande (244,15 m), lo cual podría atribuirse a una dispersión artificial.

Al momento de realizar las próximas colectas es importante tener en cuenta estos datos, por ejemplo, que los ramets estén separados entre sí por lo menos unos 50 m y en lo posible identificar visualmente hasta dónde se extiende cada ramet. También es importante que, si la población se ubica cerca de un camino con tránsito y trabajos de mantenimiento que involucran movimiento de tierra, esto puede ocasionar una sobreestimación de la dispersión clonal. En aquellos lugares donde haya una barrera que separe una población, nuestros datos sugieren como regla de campo recolectar de ambos lados, ya que podrían tratarse de clones diferentes, como se pudo observar en la población MS4 (Figura 1).

El análisis de coordenadas principales no evidenció una estructura poblacional determinada, salvo la separación de las poblaciones del litoral y el sur. Estudios moleculares en otras especies (*Turnera sidoides* y el complejo *Petunia axillaris*), encontraron diferencias genotípicas significativas asociadas a la estructura geográfica del país (Speranza et. al., 2007; Turchetto et. al., 2014), lo cual podría explicar estos resultados. También es necesario tener en cuenta que las poblaciones del litoral aún deben analizarse en mayor detalle debido a que su morfología las relaciona con *Solanum chacoense*. Varios autores mencionan que dicha especie se ubica en la zona del litoral limítrofe con Brasil (Hawkes y Hjerting 1969; Hijmans et al., 2002) y debido a que no hay estudios morfológicos especializados realizados en las mismas, se podrían confundir con *Solanum commersonii*. En un estudio realizado por Siri et al. (2009) en accesiones de *S. commersonii* también de Uruguay, se reveló por primera vez que existen por lo menos dos acervos genéticos diferentes, uno situado en el norte y otro en el sur, resultado que nosotros también encontramos. Ellos proponen que,

debido a características morfológicas, las accesiones correspondientes al norte podrían clasificarse como *S. commersonii* subsp. *malmeanum*, mientras que las del sur como subsp. *commersonii*. Dos de las accesiones pertenecientes a los departamentos de Colonia y Rio Negro presentaron una variabilidad genética que no correspondía a ninguna de estas dos divisiones poblacionales. La evaluación morfológica de las mismas indicó que podrían ser híbridos naturales entre *S. commersonii* y *S. chacoense* (Siri et al. 2009). En este momento nuestro equipo está ampliando e intensificando las colectas de poblaciones en aquellos departamentos que no se encuentran representados y se va a realizar un estudio morfológico detallado con la finalidad de determinar de manera correcta la especie estudiada. Asimismo, se está aumentando la cantidad de SSRs para tener una estimación más precisa de la distribución de la diversidad genética de *Solanum commersonii* en Uruguay y afinar la identificación de clones, así como también dilucidar a qué grupo genético pertenecen las muestras del litoral. Esto sería posible debido a que se cuenta con genets de *Solanum chacoense* de Argentina correctamente identificados, los cuales se podrían utilizar como estándar para detectar alelos de SSRs específicos y compararlos con los obtenidos en las poblaciones del litoral.

Un dato interesante que aportó el análisis de diversidad genética global es que los individuos con cariotipo triploide no se separan genéticamente de los diploides. Si los progenitores diploides forman o formaron parte de la población donde se encuentran los triploides, es esperable que no se separen genéticamente. Estudios realizados en citogenética de dichas poblaciones, detectaron la presencia de polen $2n$ o de posibles mecanismos involucrados en su origen, como por ejemplo fallas en alguno de los estadios de la meiosis, con lo cual es de esperar que los individuos triploides sean genéticamente parecidos a sus progenitores.

Comprender la estructura y diversidad genética de las únicas especies emparentadas para la papa que encontramos en Uruguay es importante,

debido a que podría presentar caracteres deseables en el mejoramiento genético, sobre todo si estos ayudan a disminuir el uso de agrotóxicos y aumentar su productividad. Esta investigación encontró que existe una división entre las poblaciones del litoral y del sur. El siguiente paso a seguir es aumentar la cantidad de SSRs para ver si esta división se mantiene y comparar con alelos característicos de *Solanum chacoense*, para confirmar si las poblaciones del litoral pertenecen a esta especie o a *Solanum commersonii*. Este trabajo también proporciona indicios de que las poblaciones naturales están formadas en algunos casos por varios clones (hasta 5) y que los mismos tienden a agregarse, con lo cual es necesario realizar una planificación de las colectas en función a esta información para capturar la mayor diversidad posible. También se deben considerar las barreras geográficas y modificaciones de origen antrópico a la hora de coleccionar muestras de la manera más eficiente y representativa.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto CSIC I+D 2010 “Recursos genéticos para el mejoramiento de papa en Uruguay: variabilidad natural en *Solanum commersonii* y su relación con especies emparentadas” Responsable Cristina Mazzella. A Alejandro Vaco por las poblaciones coleccionadas.

2.7 BIBLIOGRAFÍA

Arnaud-Haond, S., Duarte, C.M., Alberto, F. and Serrão, E.A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 16, 5115–5139.

- Ashkenazi, V., Chani, E., Levy, D., Hillel, J. y Eilleux, R.E. (2001). Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, 62, 44–50.
- Balzarini, M. y Di Rienzo, J. (2003). *Info-Gen*: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Bamberg, J.B. y del Rio, A.H. (2004). Genetic heterogeneity estimated by RAPD polymorphism of four tuber-bearing potato species differing by breeding system. *American Journal of Potato Research*, 81, 377–383.
- Bamberg, J.B., del Rio, A.H. y Moreyra, R. (2009). Genetic consequences of clonal versus seed sampling in model populations of two wild potato species indigenous to the USA. *American Journal of Potato Research*, 86, 367–372.
- Brown, A.H.D. (1990). Genetic characterization of plant mating systems. In *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, ed. A.H.D Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir, 162. Sinauer Associates.
- Cardi, T., D'Ambrosio, E., Consoli, D., Puite, K.J. Ramulu, K.S. (1993). Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 193–200.
- Carrillo-Angeles, I.G. y Mandujano, M. (2011). Patrones de distribución espacial en plantas clonales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 89, 1–18.
- Dorken, M.E. y Eckert, C.G. (2001). Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, 89, 339–350.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry*, 19, 11–15.

- Ehlenfeldt, M.K. y Hanneman Jr, R.E. (1988). Genetic control of Endosperm Balance Number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, 825–832.
- Ellstrand, N.C. y Roose, M.L. (1987). Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany*, 74, 123–31.
- Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Kim, S.C. y Crawford, D.J. (2000). Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany*, 87, 909–919.
- Ghislain, M., Andrade, D., Rodriguez, F., Hijmans, R. y Spooner, D. (2006). Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 1515–1527.
- Ghislain, M., Núñez, J., Herrera, M.R., Pignataro, J., Guzman, F., Bonierbale, M. y Spooner, D.M. (2009). Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*, 23, 377–388.
- González, M., Galván, G., Siri, M.I., Borges, A. y Vilaró, F. (2013). Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii*. *Agrociencia Uruguay*, 7, 45–54.
- Harper, J. (1977). Population biology of plants. London, Academic Press.
- Hawkes, J.G. (1990). The potato: evolution, diversity and genetic resources. London, Belhaven Press. 259 pp.
- Hawkes, J.G. y Hjerting, J.P. (1969). The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematic study. Oxford University Press, Oxford.
- Hermsen, J.G. (1984). Mechanisms and genetic implication of 2n-gamete formation. *Iowa State Journal of Research*, 58, 421–434.

- Hijmans, R.J., Jacobs, M., Bamberg, J.B. y Spooner, D.M. (2003). Frost tolerance in wild potato species: Assessing the predictivity of taxonomic, geographic, and ecological factors. *Euphytica*, 130, 47–59.
- Hijmans, R.J., Spooner, D.M., Salas, A.R., Guarino, L. y de la Cruz, J. (2002). Atlas of wild potatoes. Systematic and Ecogeographic Studies in Crop Genepools 8. IPGRI, Rome.
- Honnay, O. y Jacquemyn, H. (2008). A meta-analysis of the relation between mating system, growth form and genotypic diversity in clonal plant species. *Evolutionary Ecology*, 22:299–312.
- Jackson, J.B.C., Buss L.W. y Cook R.E. (1985). Population biology and evolution of clonal organisms. Yale University Press, New Haven, Connecticut.
- Jansky S. (2006). Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*, 125(1): 1 – 12.
- Laferriere, L.T., Helgeson, J.P. y Allen, C. (1999). Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 1272–1278.
- Liston, A., Wilson, B.L., Robinson W.A., Doescher, P.S., Harris N.R. y Svejear, T. (2003). The relative importance of sexual reproduction versus clonal spread in arid land bunchgrass. *Oecologia*, 137, 216–225.
- Lockwood, D.R., Richards, C.M. y Volk, G.C. (2007). Probabilistic models for collecting genetic diversity: Comparisons, caveats, and limitations. *Crop Science*, 47, 861–868.
- Mandujano Sánchez, M.C. (2007). La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En: Eguiarte L.E., Souza V. y Aguirre X. Comp. *Ecología Molecular*, pp. 215-250. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología-Universidad Nacional Autónoma de

México-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D.F.

Mandujano Sánchez, M.C., Montaña, C., Franco, M., Golubov, J. y Flores-Martínez, A. (2001). Integration of demographic annual variability in a clonal desert cactus. *Ecology*, 82, 344–359.

Marshall, D.R. y Brown, A.H.D. (1975). Optimum sampling strategies in genetic conservation. In *Crop genetic resources for today and tomorrow*, ed. O.H. Frankel, and J.G. Hawkes, 378–779. Cambridge University Press.

Masuelli, R.W. (1990). Gametos 2n y poliploidización sexual en la especie silvestre de papa *Solanum commersonii* Dun. Tesis M.Sc. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 54p.

Millar, M.A., Brine, M., Coates, D.J., Stuckely, M.J.C. y McComb, J.A. (2000). Mating system studies in Jarrah, *Eucalyptus marginata* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 48, 475–479.

Palta, J., Chen, H. y Li, P. (1981). Relationship between Heat and Frost Resistance of Tuber-Bearing Solanum Species: Effect of Cold Acclimation on Heat Resistance. *Botanical Gazette*, 142, 311–315.

Parks, J.C. y Werth, C.R. (1993). A study of spatial features of clones in a population of bracken fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, 80, 537–544.

Richards, C.L., Hamrick, J.L., Donovan, L.A. y Rodney, M. (2004). Unexpectedly high clonal diversity of two salt marsh perennials across a severe environmental gradient. *Ecology Letters*, 7, 1155–1162.

Rusterholz, H.P., Kissling, M. y Baur, B. (2009). Disturbances by human trampling alter the performance, sexual reproduction and genetic diversity in a clonal woodland herb. *Evolution and Systematics*, 11, 17–29.

- Silander, J.A. (1979). Microevolution and clone structure in *Spartina patens*. *Science*, 203, 658–660.
- Siri, M.I., Galván, G.A., Quirici, L., Silvera, E., Villanueva, P., Ferreira, F., Franco Fraguas, L. y Píansola, M.J. (2009). Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica*, 165, 371–382.
- Speranza, P.R., Seijo, J.G., Grela, I.A. y Solís Neffa, V.G. (2007). Chloroplast DNA Variation in the *Turnera sidoides* L. Complex (Turneraceae): Biogeographical Implications. *Journal of Biogeography*, 34, 427–436.
- Spooner, D.M., Hoekstra, R., van den Berg, R.G. y Martínez, V. (1998). *Solanum* sect. Petota in Guatemala: taxonomy and genetic resources. *American Journal of Potato Research*, 75, 3–17.
- Stehlik, I. y Holderegger, R. (2000). Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemorosa* in late successional deciduous woodlands of central Europe. *Journal Ecology*, 23, 424–435.
- Tiffney, B.H. y Niklas, K.J. (1985) Clonal growth in land plants, a paleobotanical perspective. In J.B.C. Jackson, L.W. Buss and R.E. Cook (eds) *Population Biology and Evolution of Clonal Organisms*. Yale University Press, New Haven, pp. 35–66.
- Turchetto, C., Fagundes, N.J.R., Segatto, A.L.A., Kuhlemeier, C., Solis Neffa, V.G., Speranza, P.R., Bonatto, S.L. y Freitas, L.B. (2014). Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology*, 23, 374–389.
- Vallejo-Marín, M., Dorken, M.E. y Barrett, S.C.H. (2010). The ecological and evolutionary consequences of clonality for plant mating. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 193–213.

Van der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters D., Pereira, A., Stiekema, W. y Allefs, S. (2003). An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant Journal*, 36, 82–86.

Watkinson, A.R. y Powell, J.C. (1993). Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant populations: a computer simulation model of *Ranunculus repens*. *Journal of Ecology*, 81, 707–717.

Widen, B., Cronberg, N. y Widen, M. (1994). Genotypic diversity molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants a literature survey. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica Journal*, 29, 245–263.

Wu, J., Krutovskii, K.V. y Strauss, S.H. (1999). Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-clone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome*, 42, 893–908.

**3 MECANISMOS CITOLÓGICOS DE FORMACIÓN DE POLEN NO
REDUCIDOS EN SOLANUM COMMERSONII**

**Silveira Manuela¹, Mazzella Cristina¹, Speranza Pablo¹, Solis Neffa
Viviana²**

**¹ Laboratorio de Evolución y Domesticación de las plantas,
Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad
de la República, Montevideo, Uruguay**

**² Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensurs (UNNE), Corrientes,
Argentina**

Autor para la correspondencia: Pablo R Speranza pasp@fagro.edu.uy

Garzón 780

CP: 12900

Montevideo, Uruguay

3.1 MECANISMOS CITOLÓGICOS DE FORMACIÓN DE POLEN NO REDUCIDO EN *SOLANUM COMMERSONII* .

Resumen

Solanum commersonii Dun. (cmm) es una especie silvestre diploide es la que se ha detectado producción de gametos no reducidos ($2n$). Estos gametos son de gran importancia para los programas de mejoramiento de la papa. Para poder aprovechar su utilidad, es necesario determinar el mecanismo mediante el cual se forman. Se colectaron poblaciones naturales en Uruguay y mediante citometría de flujo se identificaron poblaciones con individuos diploides, triploides y ambos. En las últimas se analizó la microesporogénesis de siete individuos y tres triploides y se registraron los diámetros de sus granos de polen. Sólo en una población se identificó polen $2n$ en muy baja proporción (3 % en una planta y 1 % en otra planta), aunque en todas se identificaron díadas y tríadas en la microesporogénesis. En los siete individuos se detectó husos paralelos en metafase II, en un 39 a 42 % de las células observadas que posiblemente este sería el mecanismo de formación de polen $2n$. En los individuos triploides, la formación de multivalentes indica una alta homología entre los tres genomios, por lo que estos individuos se comportarían como autopoliploides producto de la hibridación con entre especies muy emparentadas.

Palabras claves: polen $2n$, microesporogénesis, husos paralelos.

3.2 CYTOLOGICAL MECHANISMS OF UNREDUCED GAMETE FORMATION IN *SOLANUM COMMERSONII*

Summary

Solanum commersonii Dun. (cmm) is a wild diploid species that in which production of unreduced gametes ($2n$) has been detected. These gametes are essential for potato breeding programmes based on sexual hybridization. For unreduced gametes to be useful, it is necessary to determine the mechanism through which they are formed. Samples from natural populations in Uruguay were collected and diploid, triploid and mixed ploidy populations were identified through flow cytometry. In the latter, microsporogenesis was analyzed and $2n$ male gametes were detected through measurements of pollen diameter. We identified $2n$ pollen in a very low proportion (3 % in one plant and 1 % in another plant), only in one population, although in microsporogenesis we detected dyads and triads in all populations. In all seven diploid individuals analyzed we observed parallel spindles in metaphase II, in 39 to 42 % of the cells assessed. It is likely that this is one of the mechanisms of $2n$ pollen formation. In the triploids, meiotic irregularities indicate high homology among the three genomes, so these individuals either autopolyploids or the product of hybridization to a closely related species.

Keywords: $2n$ gametes, microsporogenesis, parallel spindles

3.3 INTRODUCCIÓN

Uruguay es centro de diversidad primario de los parientes silvestres de la papa *Solanum commersonii* (ssp. *commersonii* y ssp. *malmeanum*) y *S. chacoense* (Hawkes, 1978). En el mapa se observa la distribución actual y potencial de ambas (Figura 1).

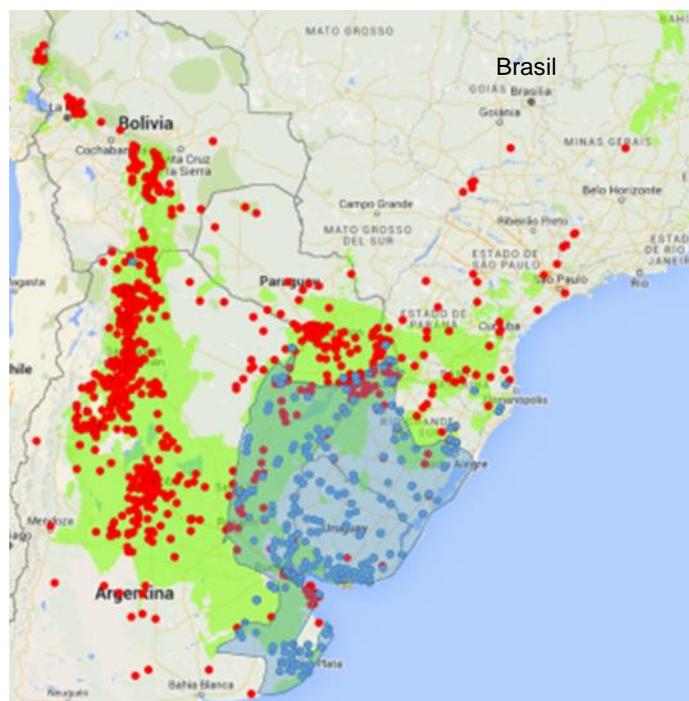


Figura 1. Mapa de ocurrencia de *S. commersonii* (círculos azules) y *S. chacoense* (círculos rojos) con sus respectivas distribuciones potenciales (zonas azul y verde). Adaptado de <http://www.cwrdiversity.org/distribution-map/> basado en Castañeda-Álvarez *et al.* 2015. Agergar coordenadas para el área de distribución

S. commersonii presenta un cariotipo diploide ($2n=2x=24$) con un número de balance endospérmico (EBN) de 1, y algunos de sus clones tienen la capacidad de producir gametos no reducidos ($2n$) (Masuelli, 1990). Existen también individuos triploides ($2n=3x=36$), los cuales pueden ser identificados por el aumento en el tamaño de las hojas y de las flores y por un incremento en su vigor (Tarn y Hawkes, 1986). Hawkes y Hjerting (1969) identificaron

formas anómalas que supusieron eran triploides y parecían ser estériles ya que no observaron frutos. El origen de estos citotipos triploides no ha sido determinado. El análisis de la meiosis de la microesporogénesis en citotipos poliploides de muchas especies ha sido tradicionalmente una herramienta (Sybenga, 1975) que permite inferir en algunos casos el origen de los genomios. La formación de bivalentes, univalentes o trivalentes en triploides podría permitir evaluar la homología de los genomios.

Muchas de las especies del género *Solanum* presentan producción de gametos no reducidos o $2n$. Los mecanismos de formación de estos gametos han sido estudiados y se han descrito mecanismos de formación durante el proceso meiótico (Mok y Peloquin, 1975a, 1975b). Uno de estos es controlado por la acción de alelos recesivo *ps* (husos paralelos o “*parallel spindles*”) que provoca consecuencias genéticas del tipo de restitución de la primera división (RPD) (Hanneman, 1999). Otro mecanismo mediado por dos (*pc1* y *pc2*), genes ocasiona la citocinesis prematura formando polen $2n$ por restitución de la segunda división meiótica (RSD). En *S. commersonii* (cmm) se ha propuesto que el mecanismo más común en la formación de polen $2n$ son los husos paralelos (Oliveira et al., 2009; Alonso et al., 2007; Camadro, Ortiz, Iwanaga, 1993; Masuelli, Camadro, Mendiburu, 1992).

La importancia de los gametos $2n$ en la evolución y mejoramiento de los complejos poliploides de especies silvestres y cultivadas de papa, ha sido puesta de manifiesto por diferentes autores (Den Nijs y Peloquin 1977; Quinn, Mok, Peloquin, 1974). Para una utilización más eficiente de los gametos $2n$ es importante que los mismos se produzcan en una alta frecuencia, que su producción sea estable y que la forma mediante la cual se originan sea conocida (Mendiburu y Peloquin 1977; Chase 1963), de manera de saber cuál es la heterocigosis parental esperada y recuperada en la descendencia.

Este trabajo tuvo como objetivos i) identificar poblaciones naturales en Uruguay de *Solanum commersonii* con individuos diploides y triploides, ii)

identificar plantas diploides formadoras de polen no reducidos a través de cuantificación de la microsporogénesis, iii) determinar su mecanismo de formación durante la microesporogénesis y iv) analizar el comportamiento meiótico de plantas triploides.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Materiales vegetales

Entre 2011 y 2014 se registraron y colectaron varias poblaciones naturales de *Solanum commersonii* (Figura 2). Las plantas fueron mantenidas en invernáculo y se determinó su nivel de ploidía en el Servicio de Clasificación celular y citometría de flujo (SECIF) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, siguiendo el protocolo de Doležel y Gohde (1995). Se seleccionaron dos poblaciones con individuos diploides y triploides para este trabajo MS1 (Maldonado) y MPES (Punta Espinillo-Montevideo). Además, se incluyó una tercera población, la SS3 (Salto), ya que en estudios previos de los estadios de meiosis se observaron ciertas características como husos paralelos y tripolares en la segunda división, que podrían estar involucrados en la formación de los polen $2n$ (Paola Gaiero, comunicación personal, 2012). Se analizaron en total siete individuos diploides y cuatro triploides (Cuadro 1).

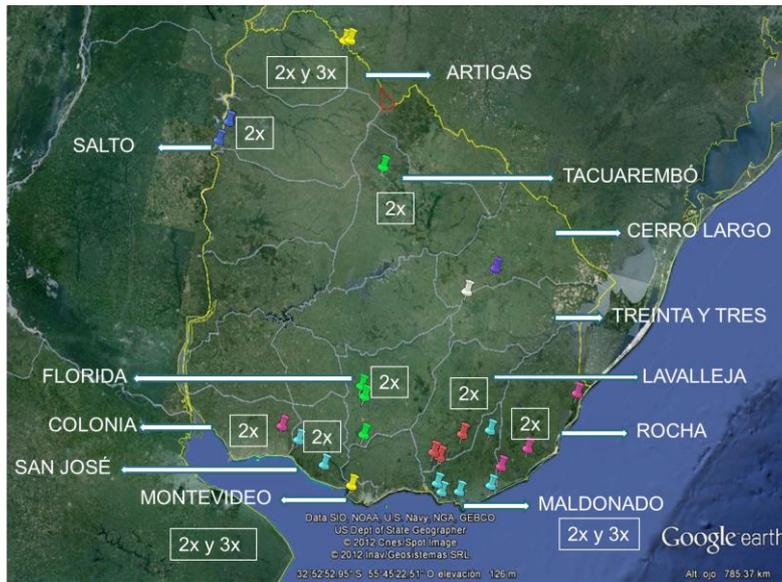


Figura 2. Distribución de las poblaciones silvestres de cmm colectadas en Uruguay con sus correspondientes niveles de ploidía, y el nombre del Departamento donde están localizadas.

Cuadro 1. Individuos analizados, código de identificación, localización y nivel de ploidía.

Identificación	Coordenadas Geográficas y Departamento de colecta (*)	Nivel de ploidía
MS1cmm22	34°49'4,1"S/55°19'11,9"W Maldonado	3x
MS1cmm29	34°49'4,3"S/55°19'12,7"W Maldonado	2x
MS1cmm44	34°49'1,5"S/55°19'16,0"W Maldonado	2x
MPES1cmm16	34°50'S/56°24'W Montevideo	2x
MPES1cmm18	34°50'S/56°24'W Montevideo	2x
MPES1cmm19	34°50'S/56°24'W Montevideo	2x
MPES1cmm45	34°50'25,2"S/56°24'18,4"W Montevideo	2x
	34°50'23,5"S/56°24'40,4"W Montevideo	
MPES2cmm1	34°50'23,4"S/56°24'40,5"W Montevideo	3x
	34°50'23,9"S/56°24'40,6"W Montevideo	
MPES2cmm2	34°50'23,9"S/56°24'40,6"W Montevideo	3x
	34°50'23,9"S/56°24'40,6"W Montevideo	
MPES2cmm4	Montevideo	3x
SS3cmm15	31°16'14,4"S/57°53'31,1"W Salto	2x

(*) Departamento: es la subdivisión político-territorial del Uruguay

3.4.2 Microesporogénesis

Se analizó la microesporogénesis desde la metafase de la primera división meiótica hasta el estadio de esporada. Se realizó un análisis previo para identificar el tamaño de los pimpollos que estuvieran en meiosis (1 a 4 mm). Luego se separaron de la planta los pimpollos de este tamaño y se fijaron en solución de alcohol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1 v/v. A las 24 h se los transfirió a una solución de alcohol 70 % y se guardaron en la heladera hasta su uso. Cuando se realizaron los preparados, se separaron las anteras bajo lupa, se disgregaron y los meiocitos liberados se tiñeron con orceína lacto-propiónica al 2 % (Dyer, 1963) y se aplastaron suavemente con un cubreobjetos.

En el microscopio óptico, se estudió el comportamiento meiótico de los diez individuos y se registró la frecuencia de los procesos normales y anormales observados. Se calculó el porcentaje en cada etapa, utilizando los meiocitos encontrados en cada una y el total de meiocitos analizados para cada individuo. Se consideró meiosis normal o regular en el caso de los diploides, aquella donde se observan en metafase I sólo 12 bivalentes, y en metafase II se identifican 12 cromosomas duplicados y en disposiciones tales que las placas ecuatoriales y por lo tanto los husos meióticos forman aproximadamente un ángulo de 60°. Finalmente, se calculó el índice meiótico (IM) como la proporción de meiocitos normales/total de meiocitos analizados.

3.4.3 Análisis de esporadas

Se analizó la constitución de las esporadas en botones florales fijados en etanol absoluto: ácido acético (3:1) durante 24 h a 4 °C, conservados en etanol 70 % a 4 °C y coloreados con carmín-glicerina (1:1). Se registró el número de tétradas, tríadas, díadas y mónadas y se calculó los porcentajes correspondientes tomando en cuenta el total de esporadas analizadas.. En base a los datos observados de cada uno de estos tipos de esporadas se

calcularon las frecuencias esperadas de polen x, 2x y 4x, considerando que las tétradas formarán 4 micrósporas x, las díadas 2 microsporas 2x, las tríadas 2 microsporas x y uno 2x, mientras que las mónadas originan una microspora 4x. Se descartaron para este análisis las preparaciones de anteras en las que aparecían meiocitos en alguna fase de la segunda división.

Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss Axioplan HBO 100W/2. Se seleccionaron al azar 50 campos y se tomaron fotografías digitales con una cámara Canon Powershow A640 y se procesaron utilizando los programas Corel Draw y Photoshop aplicando cambios que afectaron a todos los píxeles por igual.

3.4.4 Viabilidad del polen

Para la determinación indirecta de la viabilidad de polen, se utilizó la técnica de tinción con diacetato de fluoresceína (FDA), que se basa en una reacción fluorocromática (FCR), según el protocolo modificado descrito por Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (1970). Se analizaron tres botones florales para cada planta. Para realizar la técnica FCR, a la solución de FDA en acetona (2 mg/ml) se le adicionó, gota a gota, una solución de sacarosa hasta que la mezcla se tornó persistentemente turbia. El polen colectado diariamente de cada flor se colocó en un portaobjeto, se incorporó una gota de solución y se incubó en cámara húmeda por 10 min, para luego cubrirlo con un cubreobjeto. Las observaciones al microscopio se realizaron en un Microscopio Olympus Vanox AHBS3. Se seleccionaron al azar 50 campos y se tomaron fotografías digitales con una cámara de fotos Olympus DP71 usando el software DP. Se contabilizaron 250 granos en total por individuo. La cuantificación se realizó analizando las fotografías y registrando el conteo en el programa de uso libre ImageJ. Se cuantificaron los granos de polen viables de color verde brillante y con citoplasma uniformemente teñido. Entre los granos de polen viables se midieron sus diámetros con el programa ImageJ. El volumen de los granos de polen fue estimado según la fórmula

$\frac{1}{6} \pi p^3$ (Buchmann y O'Rourke, 1991), donde p es la distancia entre el ángulo apertura y el punto medio del lado opuesto.

Los granos de polen que mostraban un volumen 1,26 veces mayor que la media de los reducidos, fueron considerados no reducidos de acuerdo con los criterios propuestos (Larrosa et al., 2012). Utilizando el programa Infostat se obtuvieron histogramas y se identificaron las plantas productoras de polen no reducido por su histogramas bimodales (Ramsey y Schemske 1998; Orjeda, Freyre, Iwanaga, 1990).

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Análisis de meiosis en células madre del polen

Se constató gran sincronía en el proceso meiótico en los individuos diploides, mientras que en los triploides en una misma antera se pudieron observar tanto fases de la meiosis I como de la II. La mayor parte de las meiosis en los diploides presentaron comportamiento normal de sus cromosomas y disposición de los husos. Sin embargo, también se encontraron anomalías. Si bien no se utilizó tinción fluorocromática diferencial para observar los husos, generalmente se pudieron ver al microscopio óptico levemente contrastados. (Figuras 3 y 4).

Este análisis de las meiosis se llevó a cabo cuantificando en total 48.443 meiocitos. En el individuo MPES1cmm19 no fue posible encontrar las fases de la meiosis I en los botones florales que estaban fijados.

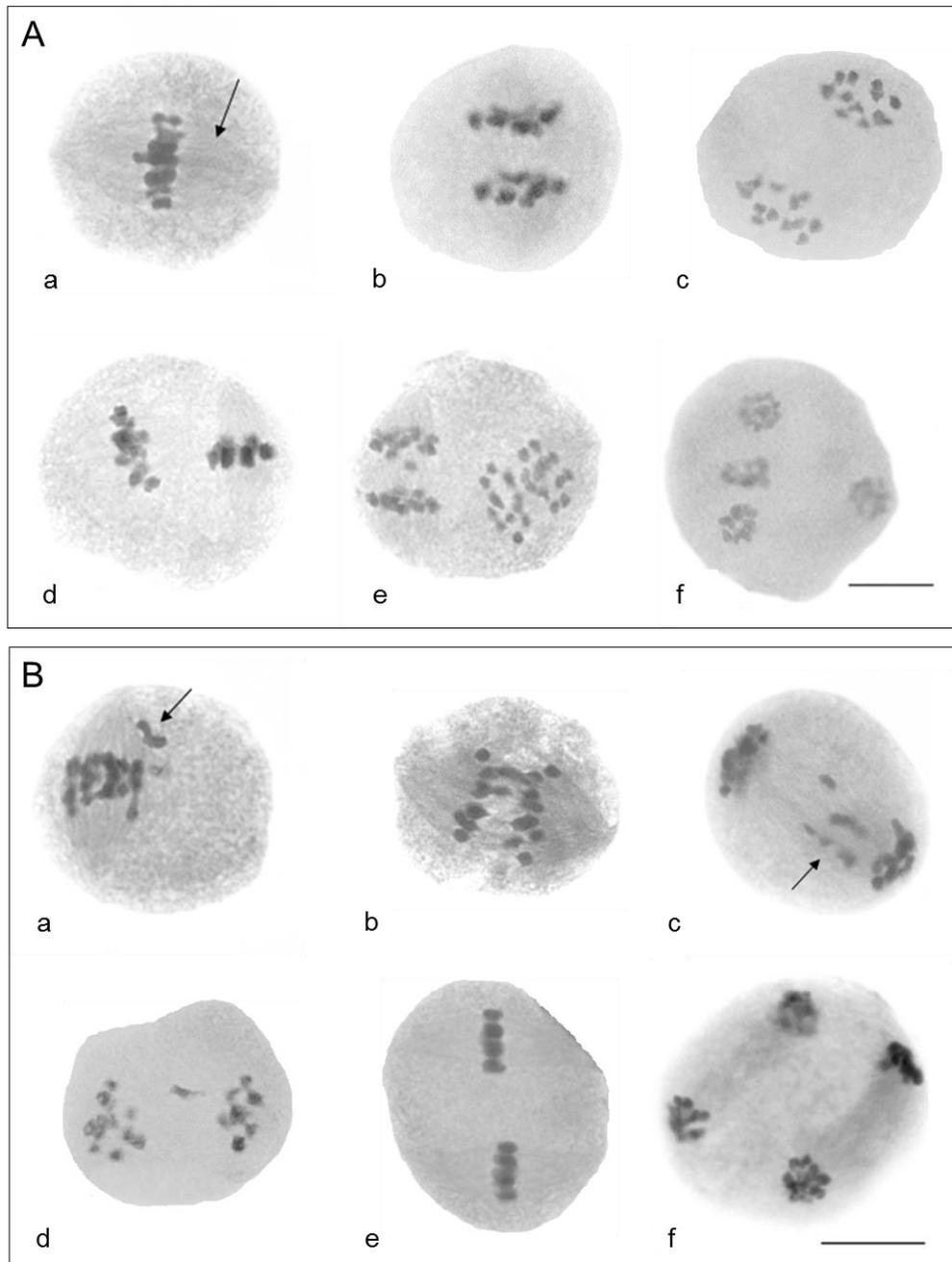


Figura 3. Meiocitos normales (A) y anormales (B) en planta diploide de la población SS3cmm15. A. a: metafase I, huso levemente contrastado (flecha), b: anafase I, c: telofase I, d: metafase II, e: anafase II, f: telofase II. B. a: metafase I con bivalente fuera de placa, b: anafase I con puente, c: ana-telofase I con cromosomas rezagados, d: telofase I, e: metafase II con husos paralelos, f: telofase II con husos paralelos. Barras 10 μ m.

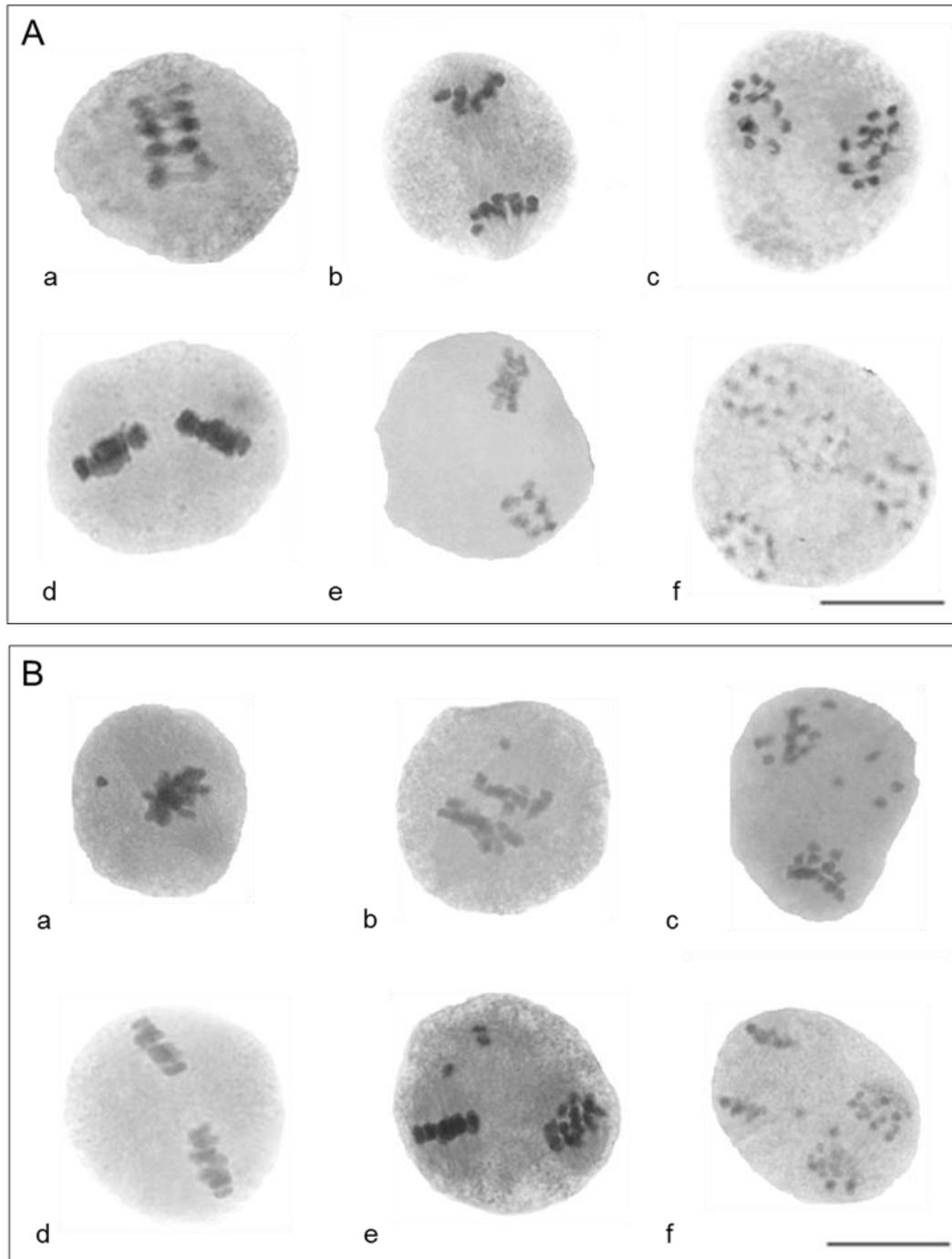


Figura 4. Meiocitos normales (A) y anormales (B) en plantas diploides de las poblaciones MS1 y MPES1. A. a: meta-anafase I, b: anafase I, c: ana-telofase I, d: metafase II, e: anafase II, f: telofase II. B. a: metafase I con univalente fuera de placa, b: anafase I con cromosoma adelantado, c: telofase I con cromosomas rezagados, d: metafase II con husos paralelos, e: metafase II con cromosomas fuera de placa, f: ana-telofase II. A: a, e, f, MPES1cmm18; b, MS1cmm29; c, d, MPES1cmm16. B: a, MPES1cmm18; b, d, e, MS1cmm29; c, MPES1cmm16; f, MPS1cmm19. Barras 10 μ m.

Las irregularidades meióticas detectadas incluyeron: segregación precoz de cromosomas hacia los polos, cromosomas fuera de placa, puentes cromosómicos, cromosomas rezagados y husos paralelos en metafase II (Cuadro 2). La frecuencia de husos paralelos fue cercana a 40% en todos los individuos analizados (Cuadro 3). En las células madres del polen (CMP) analizadas el comportamiento normal o regular en cada estadio dio lugar a un índice meiótico entre 78 % y 94 % (Cuadro 4).

Cuadro 2. Irregularidades detectadas en meiosis de individuos diploides de *S. commersonii*

Estadios	Anormalidades	MS1cmm29		MS1cmm44		MPES1cmm16		MPES1cmm18		MPES1cmm19		MPES1cmm45		SS3cmm15	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Metafase I	I fuera de placa	10	0,24	20	0,43	12	0,28	82	0,56	0	0,00	41	0,71	0	0,00
	II fuera de placa	0	0,00	0	0,00	7	0,16	90	0,62	0	0,00	45	0,78	133	1,35
Anafase I	Crom. rezagados	14	0,34	49	1,06	10	0,23	34	0,23	0	0,00	17	0,30	1	0,01
	II rezagados	0	0,00	0	0,00	15	0,35	19	0,13	0	0,00	10	0,17	0	0,00
	Puentes	25	0,61	0	0,00	42	0,99	77	0,53	0	0,00	35	0,61	500	5,09
Telofase I	Crom. rezagados	2	0,05	43	0,93	3	0,07		0,00	0	0,00		0,00	2	0,02
Metafase II	Husos paralelos	165	4,03	250	5,41	145	3,40	770	5,27	480	9,08	225	3,91	53	0,54
	husos paralelos con crom. fuera de placa	9	0,22	10	0,22	7	0,16	6	0,04	20	0,38	10	0,17	0	0,00
	Crom. fuera de placas	0	0,00	0	0,00	7	0,16	5	0,03	15	0,28	10	0,17	3	0,03
Anafase II	Husos paralelos	110	2,69	170	3,68	15	0,35	1344	9,20	630	11,91	700	12,16	101	1,03
	Husos paralelos con crom. rezagados	0	0,00	1	0,02	0	0,00	6	0,04	10	0,19	4	0,07	0	0,00
	Crom. rezagados	0	0,00	1	0,02	0	0,00	4	0,03	0	0,00	4	0,07	0	0,00
Telofase II	Crom. rezagados	1	0,02	28	0,61	0	0,00	2	0,01	13	0,25	6	0,10	0	0,00

n: número de meiocitos anormales observados; I: univalentes; II: bivalentes; crom.: cromosomas.

Cuadro 3. Husos paralelos en metafase II en individuo diploides

	Total	Husos paralelos
	meiocitos analizados	(%)
MS1cmm29	434	40
MS1cmm44	640	42
MPES1cmm16	389	41
MPES1cmm18	2001	39
MPES1cmm19	1235	42
MPES1cmm45	575	39
SS3cmm15	141	40

Cuadro 4. Porcentaje de meiocitos normales y anormales en etapas de la meiosis de individuos diploides de *S. commersonii*

Individuos	Total	Metafase I		Anafase I		Telofase I		Metafase II		Anafase II		Telofase II		IM
		N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	
MS1cmm29	4092	5,1	0,24	7,7	0,95	55,2	0,05	6,4	4,25	3,4	2,69	14	0,02	92
MS1cmm44	4622	4,8	0,43	7,6	1,06	49,8	0,93	8,2	5,61	4,3	3,72	13	0,61	88
MPES1cmm16	4262	18,7	0,44	11,9	1,57	27,4	0,07	5,4	3,72	0,5	0,35	30	0	94
MPES1cmm18	14603	17,2	1,18	14,5	0,89	3,4	0	8,4	5,34	3,2	9,7	36,7	0,01	83
MPES1cmm19	5278	0	0	0	0	0	0	13,6	9,74	12,4	12,1	52	0,25	78
MPES1cmm45	5757	21,8	1,49	18,3	1,08	4,3	0	6,1	4,25	4,2	12,3	26,1	0,1	81
SS3cmm15	9829	57,5	1,35	7	5,1	25,9	0,02	0,9	0,57	0,1	1,03	0,7	0	92
	48443													

N: normal; A: anormal; IM: Índice meiótico. Total: número de células analizadas

3.5.2 Análisis de esporadas y de viabilidad de polen

Se analizaron en total 13.860 esporadas, correspondientes a los siete individuos diploides. Este análisis reveló una gran variación en los tipos de esporadas producidas, se identificaron mónadas, díadas, tríadas y tétradas en porcentajes variables. Se realizó la estimación de la producción de polen $2n$ (Figura 5) a partir de las esporadas observadas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Esporadas observadas y estimación de polen esperado en los individuos diploides

	Esporadas observadas (%)					Polen esperado (%)		
	Total	Tétrada	Tríada	Díada	Mónada	x	2x	4x
MS1cmm29	2710	99,63	0,04	0,3	0,03	99,83	0,16	0,01
MS1cmm44	1004	99,6	0,2	0,1	0,1	99,88	0,1	0,02
MPES1cmm16	2509	99,64	0,04	0,24	0,08	99,85	0,13	0,02
MPES1cmm18	3601	99,78	0,03	0,17	0,02	99,88	0,09	0,03
MPES1cmm19	1207	99,59	0,08	0,25	0,08	99,83	0,15	0,02
MPES1cmm45	1524	99,74	0,07	0,13	0,06	99,9	0,08	0,02
SS3cmm15	1305	99,62	0,08	0,23	0,07	99,85	0,13	0,02

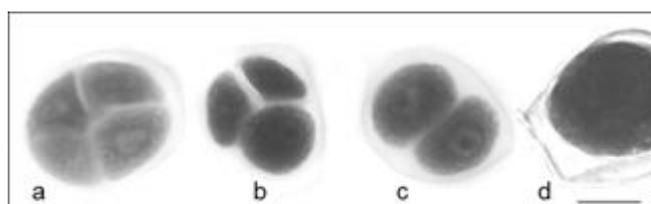


Figura 5. Esporadas: a: tétrada; b: tríada; c: díada, d: mónada. Barra 10 μ m.

Se observaron granos de polen viables en todos los individuos (Figura 6) y el porcentaje varió entre un 79 % y 96 % (Cuadro 6). La proporción de polen viable en MPES1cmm16 (79 %) y SS3cmm15 (81 %) fue inferior al índice meiótico detectado de 94 % y 92 %, respectivamente. En los demás individuos la frecuencia de viabilidad fue superior.

Cuadro 6. Granos de polen viables en los individuos diploides. Tamaño de la muestra: 250

	Viable (%)
MS1cmm29	93
MS1cmm44	96
MPES1cmm16	79
MPES1cmm18	92
MPES1cmm19	91
MPES1cmm45	96
SS3cmm15	81

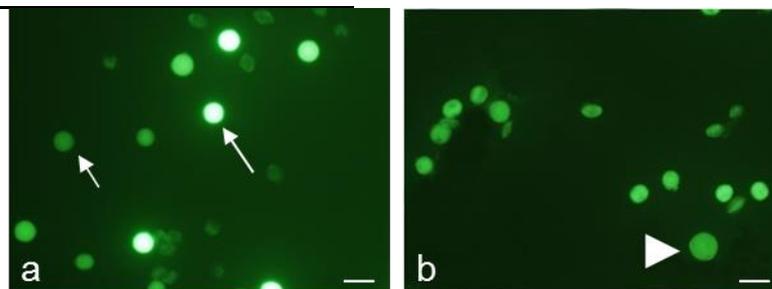


Figura 6. Granos de polen viables y no viables; Total: número de granos contabilizados. a y b :granos de polen con tinción FDA, granos viables (flecha larga), no viables opacos (flecha corta), polen no reducido (punta de flecha). Barra 20 μm .

Dentro de la subpoblación de polen viable, en cinco de los individuos analizados se observó polen de diámetro constante y forma redondeada y diámetro correspondiente a polen normal reducido. En los dos restantes, se observan con baja frecuencia granos de polen de tamaño mayor (Figura 6). Se puede observar una distribución unimodal en tres individuos que presentan granos de polen con tamaños similares, mientras que en dos hay un porcentaje de granos de mayor tamaño con lo cual la curva que representa su distribución es bimodal (Figura 7). En todos los casos el porcentaje de polen $2n$ observado fue mucho menor que el esperado a partir de la observación de husos paralelos, pero en algunos casos mayor que el esperado a partir de las díadas observadas (Cuadro 7)

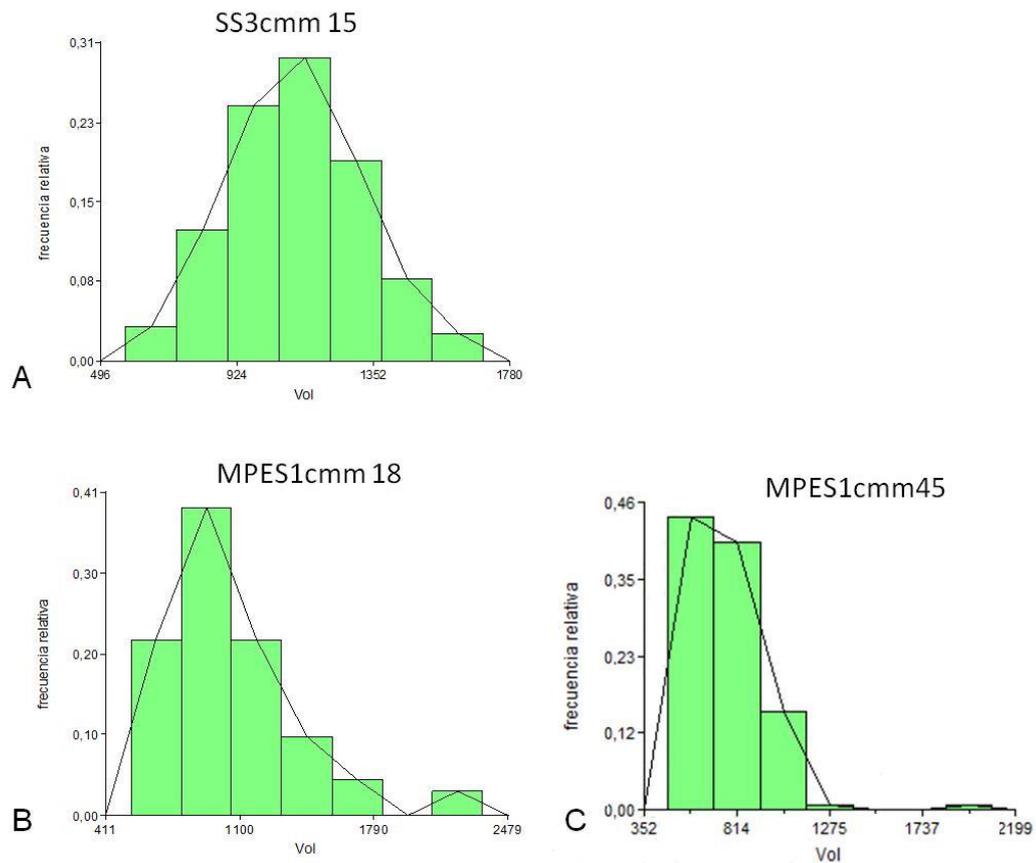


Figura 7. Distribución del tamaño (volumen) de los granos de polen viables. A: Curva unimodal en un individuo; B, C: Curvas bimodales en dos individuos.

Cuadro 7. Relación entre la proporción de irregularidades meióticas y polen no reducido observado

Individuos	Husos paralelos		Díadas		Polen 2n observado (%)
	Observados (%)	Polen 2n esperado (%)	Observadas (%)	Polen 2n esperado (%)	
MPES1cmm18	39	24	0,17	0,08	3
MPES1cmm45	39	25	0,13	0,07	1
MS1cmm29	40	25	0,3	0,15	0
MS1cmm44	42	26	0,1	0,05	0
MPES1cmm19	42	26	0,25	0,12	0
MPES1cmm16	41	26	0,24	0,12	0
SS3cmm15	40	25	0,23	0,12	0

3.5.3 Análisis de meiosis en individuos triploides

El análisis de los estadios de la meiosis en triploides se llevó a cabo cuantificando en total 22.652 meiocitos, los cuales se clasificaron en normales o anormales (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de meiocitos normales y anormales observados en individuos triploides de *S. commersonii*

	Total	Metafase I		Anafase I		Telofase I		Metafase II		Anafase II		Telofase II		IM
		N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	
MS1cmm22	3613	0,66	19,53	0,06	1,83	11,62	20,62	5,81	19,05	0,17	0,36	14,53	5,73	33
MPES2cmm1	8170	2,46	18,36	1,79	5,79	11,38	15,06	2,45	13,37	0,58	3,79	18,52	6,45	37
MPES2cmm2	7031	8,39	59,78	1,21	5,23	6,12	18,16	0,24	0,65	0,01	0,14	0,06	0	16
MPES2cmm4	3838	2,32	33,01	0,91	2,42	11,02	12,51	4,82	22,85	0,63	2,22	4,38	2,92	24
	22652													

N: normales; A: anormales; IM: índice meiótico. Total: número de células analizadas.

En los individuos triploides se observó una amplia variedad de irregularidades durante el proceso meiótico con formación de trivalentes y asincronía en la separación de los cromosomas, lo cual también se ve reflejado en los bajos valores de índice meiótico (Figuras 8 y 9, Cuadro 8). También se observó en un mismo botón floral todas las fases meióticas, desde metafase I hasta telofase II (datos no cuantificados).

Durante la primera división meiótica se observó una alta frecuencia de univalentes fuera de la placa ecuatorial en metafase I, entre 16 y 53 % (Figura 8c) y en la misma fase, pero en bajo porcentaje fue posible identificar segregación precoz de cromosomas (Figura 8d). También se observaron cromosomas rezagados tanto en anafase I (Figura 8e) como en telofase I (Figura 8f). (Cuadro 9)

En la segunda división meiótica se observaron cromosomas fuera de placa (0,2 a 14 %) y la formación de husos paralelos en metafase II. Debido a que los cromosomas están altamente condensados, es posible contabilizar los cromosomas en esta fase (Figura 9c y d). En anafase II también se pudo contabilizar, en algunos casos, el número de cromosomas. Durante telofase II se observaron cromosomas fuera de los pronúcleos (3 a 6 %).

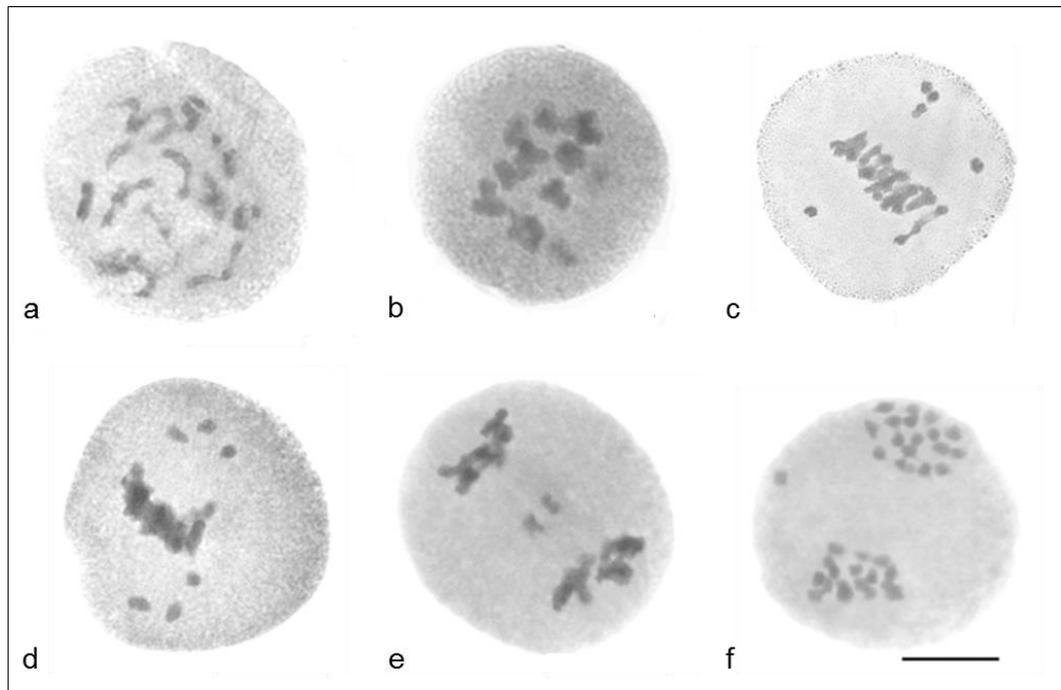


Figura 8. Meiosis I en individuos triploides. a: profase I, diploteno con varios trivalentes, b: profase I, diacinesis con trivalentes, c: metafase I con univalentes fuera de la placa ecuatorial, d: metafase I con tres bivalentes con segregación precoz, e: anafase I con dos cromosomas rezagados, f: telofase I con un cromosoma fuera de los dos pronúcleos. a, b, c, MS1cmm22; e, f, g, MPES2cmm1. Barra 10 μ m.

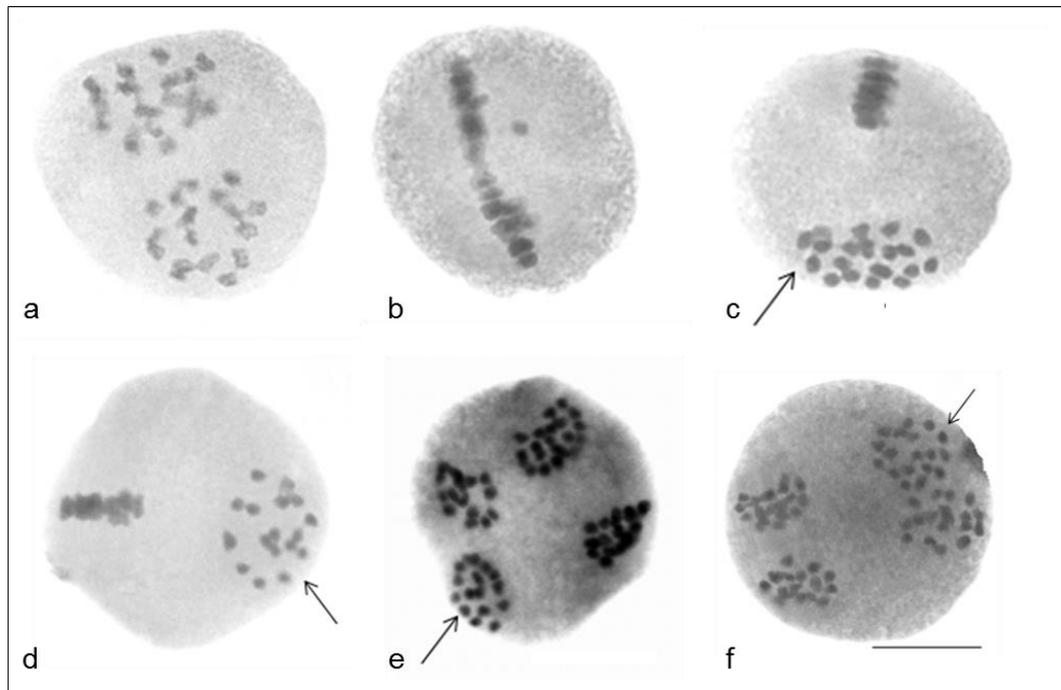


Figura 9. Meiosis II en individuos triploides. a: telofase I, b: metafase II con los husos fusionados y un cromosoma fuera de la placa ecuatorial, c y d: metafase II en vista polar y ecuatorial, en c con 19 cromosomas (flecha) y en d con 17 cromosomas (flecha), e y f: cuatro telofase II, entre 16 y 19 cromosomas (flecha). a, b, c, MPES2cmm2; e, f, g, MPES2cmm4. Barra 10 μ m.

Cuadro 9. Irregularidades detectadas en meiosis de plantas triploides de *S. commersonii*

Etapas	Anormalidades	MS1cmm22		MPES2cmm1		MPES2cmm2		MPES2cmm4	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Metafase I	I fuera de placa	640	17,71	1315	16,10	3739	53,18	1267	33,01
	II fuera de placa	24	0,66	40	0,49	104	1,48	0	0,00
	II con segregación precoz	42	1,16	145	1,77	360	5,12	0	0,00
Anafase I	Cromosomas rezagados	66	1,83	263	3,22	97	1,38	93	2,42
	II rezagados	0	0,00	210	2,57	271	3,85	0	0,00
Telofase I	Cromosomas rezagados	700	19,37	631	7,72	183	2,60	480	12,51
	Varios cuerpos cromosómicos	45	1,25	600	7,34	1094	15,56	0	0,00
Metafase II	Husos paralelos	40	1,11	172	2,11	10	0,14	115	3,00
	Husos paralelos con crom. fuera de placa	131	3,63	478	5,85	21	0,30	306	7,97
	Cromosomas fuera de placa	517	14,31	442	5,41	15	0,21	456	11,88
Anafase II	Husos paralelos	4	0,11	64	0,78	5	0,07	16	0,42
	Husos paralelos con crom. rezagados	7	0,19	161	1,97	5	0,07	33	0,86
	Cromosomas rezagados	2	0,06	85	1,04	0	0,00	36	0,94
Telofase II	Cromosomas fuera de núcleo	207	5,73	527	6,45	0	0,00	112	2,92

n: número de meiocitos triploides anormales observados; I: univalentes; II: bivalentes; crom: cromosomas.

Se analizaron 6.336 esporadas de dos individuos (MPES2cmm2 y MS1cmm22) (Cuadro 10) los cuales presentaron una alta frecuencia de microsporas anormales (94 % a 97 %). El tipo más frecuentemente hallado fue la poliesporada o políadas (mayor de tétrada). La muy baja proporción de tétradas observadas, se corresponde con el bajo porcentaje de polen viable (Figura 10).

Cuadro 10. Porcentaje de los distintos tipos de esporadas observados en plantas triploides.

	Díadas	Tríadas	Tétradas	Péntadas	Políadas	Polen viable (%)	Polen no viable (%)
MPES2cmm2	0	0,44	5,66	27,66	66,25	44	56
MS1cmm22	0,04	0,17	3,06	35,62	61,12	23	77

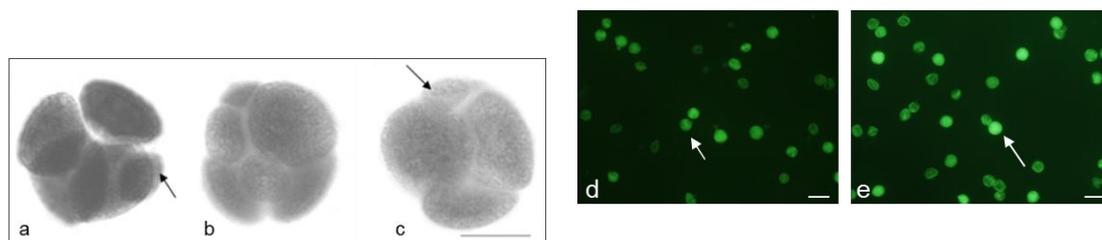


Figura 10. Microfotografías representativas de esporadas anómalas. a: tétrada con célula pequeña (flecha); b: hexas; c: tríada con célula pequeña (flecha). a, b, MPES2cmm2; c, MS1cmm22. Barra 10 μ m. Fotos de granos de polen con tinción con FDA en plantas triploides. Granos no viables opacos (d, flecha corta), granos viables fluorescentes (e, flecha larga). d, MS1cmm22; e, MPES2cmm1. Barra 20 μ m.

3.6 DISCUSIÓN

En nuestro análisis en plantas diploides, identificamos polen tanto n como $2n$ en sólo dos ramets de una población de Montevideo. Los valores encontrados de polen $2n$ en el individuo MPES1cmm18 fueron de 3 % y en MPES1cmm45 de 1 %, ello está a su vez relacionado con la presencia al final de la microesporogénesis de díadas y tríadas, lo que es evidencia de la posibilidad de no reducción. Masuelli, Camadro y Mendiburu (1992) estudiando esta misma especie, encontraron producción de gametos $2n$ en

entre 1 % y 3 % de las plantas analizadas. La proporción de individuos que producen gametos no reducidos identificados en otras especies de *Solanum* es variable. En *S. chacoense* ($2n=2x=24$, 2EBN) en un 2 % de los individuos se reportó una proporción de gametos $2n$ del 5 % (Quinn, Mok, Peloquin 1974). Veilleux (1983) encontró producción de gametos $2n$ funcionales entre genotipos diploides híbridos del género *Solanum*, los cuales iban desde un 3 al 99 %. Watanabe y Peloquin (1993) encontraron que la frecuencia de polen $2n$ en las especies diploides, tetraploides y hexaploides en *Solanum* variaba entre 2 % y 36 %. La estimación del número de granos de polen no reducido esperado a partir de las diadas en todos los casos es mayor a 0 y entre 0,05 y 0,15. Sin embargo no se descarta la presencia de granos no reducidos en otros genotipos en muy bajas frecuencias que podrían detectarse por otras tecnologías que permitan un muestreo más amplio como el uso de un citómetro de flujo, (Sora, Kron, Husband, 2016).

La detección de polen $2n$ se realizó mediante la medición de su diámetro, siendo el tamaño promedio en micras en el genotipo MPES1cmm18 de 16,3 micras (rango de 15,6 a 16,5 micras) y mientras que en el polen reducido de 12,35 (rango de 10,1 a 15,15 micras). En el genotipo MPES1cmm45 en el único grano de polen $2n$ observado el diámetro fue de 15,85 micras, mientras que en polen normal fue de 11,25 micras (rango de 9,6 a 13,23 micras). Según la clasificación propuesta por Pandolfi (1998) del diámetro de los granos de polen reducido para *S. commersonii*, en nuestro caso encontramos granos de polen que van desde 9,6 a 15,1 μm , con un promedio de 11,78 μm , lo cual pertenecería al grupo de granos pequeños. Al comparar tanto polen normal como polen $2n$ en *S. commersonii* cuantificado por otros trabajos (Watanabe y Peloquin 1993; Tarn y Hawkes 1986; Veilleux 1983) y en materiales de distintos orígenes, las diferencias con el nuestro son importantes. Si bien están analizados con técnicas distintas, ellas no explican las diferencias. Un factor que debe ser considerado está vinculado a la carencia de un estudio exhaustivo sobre las relaciones taxonómicas y delimitación de especies en este género. De todas maneras, en todos los

trabajos es similar la relación encontrada entre los diámetros de polen n y $2n$, siendo en este último entre un 20 y un 30 % mayor. Este aumento del diámetro en el tamaño del polen se correlaciona positivamente con los niveles de ploidía (Jacob y Pierret, 2000). En las poblaciones naturales de *cmm* en Uruguay, fue posible identificar granos de polen no reducidos los cuales se evidencian por el aumento del diámetro. Además la observación de posibles mecanismos meióticos (modificaciones en la orientación del huso meiótico en metafase II) asociados a dicha producción en todos los individuos analizados.

Varios autores proponen para *Solanum* sect *Petota* el origen de los gametos $2n$ por el mecanismo de husos paralelos en la segunda división meiótica. Los trabajos comprenden un alto número de especies pertenecientes en su mayoría a la Serie *Tuberosa* pero también a siete Series más, entre ellas en *S. tuberosum* (Souter, Dawe, Peloquin, 1980), en los diploides *S. spegazzini*, *S. gourlayi* y *S. infundibuliforme* (Camadro y Peloquin, 1980); en *S. tuberosum*, *S. chacoense*, *S. phureja*, *S. andigena*, *S. sparsipilum* (Camadro, Ortiz, Iwanaga, 1993), en varias especies de *Solanum* (15 diploides, 12 tetraploides y 4 hexaploides) (Watanabe y Peloquin, 1993), en triploides naturales de *S. chacoense* y *S. commersonii* (Mok, Peloquin, Tarn, 1975). Otros autores (Veilleux, McHale, Lauer, 1982; Mok y Peloquin 1975a; 1975b) proponen además otros mecanismos como los husos fusionados y/o los tripolares los cuales serían un grado de expresión diferente del gen *ps*, o también la citocinesis prematura.

En los siete individuos de *S. commersonii* analizados se observaron husos paralelos en metafase II, siendo el porcentaje promedio 40 %, y el rango entre 39 % y 42 %. Si sólo tenemos en cuenta los dos individuos que presentaron polen $2n$, el porcentaje de polen $2n$ esperado a partir de la proporción de husos paralelos sería mucho mayor al observado mientras que si se estima en base al tipo de esporadas sería mucho menor al observado. La planta SS3cmm15 originaria de Salto presentó características

que la diferencian del resto de las estudiadas. La presencia de un 5 % de anafases I con puentes de cromatina, frente a porcentajes de 0 a 0,99 del resto, podría ser un indicio de que podría tratarse de una planta híbrida.

Si bien no se descarta que en parte la alta proporción de husos paralelos observados pueda ser un artificio de la técnica de aplastado utilizada, los valores observados, fueron bastante similares a los que obtuvieron Masuelli et al. (1992) utilizando híbridos de *S. commersonii* con *S. gourlayi*. Ellos observaron una alta frecuencia de meiocitos en metafase II con husos paralelos (44 % a 54 %) que no estaba correlacionada con la formación de díadas (5 %), tríadas (3 a 23 %) y la producción de polen $2n$. Estos autores proponen que la presencia de husos paralelos en metafase II puede ser una condición necesaria, pero no suficiente para la formación de díadas y polen $2n$, lo cual explicaría la discrepancia entre los valores estimados y observados, así como la ausencia de polen $2n$ en los demás individuos analizados. Barone et al. (1997) observaron en las progenies híbridas diploides de los cruzamientos entre *S. tuberosum* x *S. chacoense* y *S. phureja* x *S. tuberosum* una discrepancia entre la formación del polen $2n$ y las anomalías meióticas asociadas a la alteración de los husos meióticos en metafase II. Otros autores (Ramanna 1983; Veilleux, McHale, Lauer, 1982) hipotetizan que sólo los husos fusionados originarían polen $2n$ mientras que Mok y Peloquin (1975a) proponen que la citocinesis prematura sería el mecanismo principal. Es de hacer notar que en nuestras muestras de individuos diploides, no se identificaron husos tripolares, fusionados o citocinesis prematura 1 a pesar del alto número de meiocitos observados ($n = 48.443$).

La citocinesis es un fenómeno independiente de la cariocinesis (Ramanna, 1974) y por lo tanto el producto final no sólo depende de la forma en que se divide el núcleo, sino también cómo se forman los surcos de fragmentación y las paredes de los microsporos. Genualdo et al. (1998) discute las anomalías en los microtúbulos del citoesqueleto que estarían

involucradas en la formación del polen $2n$. Considerando todo esto, las observaciones realizadas en este trabajo podrían explicarse por lo propuesto por Traas et al. (1989). Estos autores propusieron que al final de la meiosis I los filamentos de actina señalizaban el lugar donde debería ocurrir la citocinesis. Entonces la citocinesis ocurriría de manera correcta al final de la meiosis II y no en la habitual forma perpendicular a los husos. Esto explicaría la discrepancia observada aquí entre el bajo porcentaje de gametos no reducidos y la alta proporción de husos paralelos en meiosis II.

Un tema importante es analizar qué componentes ambientales podrían influir en la disposición anormal de los husos en *Solanum*. Desde el comienzo de la microesporogénesis hasta la apertura de la flor, transcurre alrededor de una semana, con lo cual los botones florales utilizados para las muestras meióticas podrían haber estado expuestos a diferentes condiciones ambientales que los utilizados para las muestras para el análisis del polen. Veilleux y Lauer (1981) observaron que en la especie tetraploide *S. tuberosum* (Grupo Phureja) la expresión relativamente constante o variable de la producción de polen $2n$ dependía de cada genotipo. Los clones presentaban igual nivel de expresión del carácter independientemente del ambiente en el que eran cultivados. El fotoperíodo en *S. phureja* (Owen et al., 1988) y las temperaturas en híbridos diploides de *S. tuberosum* (Grupo Phureja y *Stenotomum*) (Haynes, Haynes, Swallow, 1987) también pueden afectar la frecuencia de polen $2n$

Sería interesante para contestar algunas de las preguntas que surgen de este trabajo analizar los husos en meiosis anormales utilizando fluorocromos para identificar sin dudas si existen husos tripolares, debido a que algunos autores proponen a éstos como los responsables de la formación del polen $2n$. Asimismo, sería de gran interés para utilizar en programas de mejoramiento llevar a cabo experimentos en los cuales se sometan las plantas de *S. commersonii* a diferentes temperaturas para luego cuantificar el tipo de polen que producen, específicamente en qué condición se

incrementa la formación de gametos no reducidos, tanto femeninos como masculinos.

Los resultados observados por el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis en los individuos triploides, revelan una alta irregularidad del proceso, lo que indica que los tres genomios presentan alta homología. Esto indicaría que los individuos se comportarían como autoploides. Otros estudios de nuestro equipo de trabajo realizando comparaciones con marcadores citogenéticos (CMA DAPI y FISH con sondas de ADNr), no observaron evidencias que permitan diferenciar los tres genomios del triploide (Paola Gaiero, comunicación personal, 31 de mayo de 2012). En base a esos datos y a las especies presentes en Uruguay, se podría hipotetizar que estos individuos podrían ser autotriploides, o el producto del cruzamiento de *cmm* y *S. chacoense* (*chc*) ambos con baja diferenciación genómica (Wang, Liang, Heyne, 1977).

Sin embargo, para fundamentar lo anterior es necesario considerar el concepto del EBN (Johnston y Hanneman, 1982). El modelo del EBN predice que dentro de una especie con 1EBN no podrían darse fecundaciones a partir de un gameto normal (n) y otro no reducido ($2n$), ya que el habría un desbalance en el endosperma que no haría viable el desarrollo del embrión ($2n$). *Solanum commersonii* (*cmm*) tiene 1EBN y *S. chacoense* (*chc*) presenta un valor de 2EBN. No podrían cruzarse gametos reducidos normales de ambas especies diploides, sin embargo, podrían cruzarse gametos normales de *chc* con gametos $2n$ de *cmm* ya que en ese caso se igualarían los EBN. Según Jansky (2006) cuando se cruzan especies con distinto EBN son más exitosos los cruzamientos en donde el parental femenino tiene un EBN mayor que el parental masculino. Asimismo, Hanneman (1999) plantea que a veces cruzamientos intra EBN fallan y otras veces cruzamientos inter EBN son exitosos. Por lo tanto, el modelo EBN es sólo un componente de un complejo sistema de barreras al cruzamiento entre especies, tanto pre como postcigóticas (Jansky 2006; Camadro y col.

2004). Por todo lo expuesto, para resolver este importante aspecto del origen y la genética de las plantas triploides se requieren estudios de cruzamientos controlados y marcadores moleculares.

3.7 BIBLIOGRAFÍA

Alonso A., Salgado C.C., Pereira C.A., Davide L.C. y Oliveira L.G. (2007). Pollen viability and meiotic analysis of *Solanum commersonii commersonii* Dun., *Solanum commersonii malmeanum* Bitt. and *Solanum tuberosum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7(4): 387 – 393.

Barone A., Carputo D., La Rotonda G. y Frusciante L. (1997). Discrepancy between spindle anomalies and 2n pollen production in *Solanum* interspecific hybrids. *American Potato Journal*, 74(6): 399 – 403.

Buchmann S. y O'Rourke M.K. (1991). Importance of pollen grain volumes for calculating bee diets. *Grana*, 30(3-4): 591 – 595.

Camadro E.L., Carputo D. y Peloquin S.J. (2004). Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(7): 1369 – 1376.

Camadro E.L., Ortiz R. y Iwanaga M. (1993). Control genético de la producción de polen 2n por "husos paralelos" en papas diploides. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 5(6): 20 – 29.

Camadro E.L. y Peloquin S.J. (1980). The occurrence and frequency of 2n pollen in three diploid *Solanum* from Northwest Argentina. *Theoretical Applied Genetics*, 56(1-2): 11 – 15.

Castañeda-Álvarez N.P., de Haan S., Juárez H., Khoury C.K., Achicanoy H.A., Sosa C.C., Bernau V., Salas A., Heider B., Simon R., Maxted N. y

Spooner D.M. (2015). *Ex Situ* Conservation Priorities for the Wild Relatives of Potato (*Solanum* L. Section *Petota*). *PLoS ONE*, 10(4).

Chase S.S. (1963). Analytic breeding in *Solanum tuberosum* L. A scheme utilizing parthenotes and other diploid stocks. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 5(4): 359 – 363.

Den Nijs T.P. y Peloquin S.J. (1977). 2n gametes in potato species and their function in sexual polyploidization. *Euphytica*, 26(3): 585 – 600.

Doležel J. y Gohde W. (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry Part A*, 19(2): 103 – 106.

Dyer A.F. (1963). The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods of chromosome preparations. *Stain Technology*, 38(2): 85 – 90.

Genuardo G., Errico A., Tiezzi A. y Conicella C. (1998). α -tubulin and F-actin distribution during microsporogenesis in a 2n pollen producer of *Solanum*. *Genome*, 41(5): 636 – 641.

Hanneman R.E. (1999). The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. *Potato Research*, 42(2): 283 – 312.

Hawkes J.G. (1978). History of the potato. En: *The Potato Crop: The Scientific Basis for Improvement*, P.M. Harris, London, Chapman and Hall, 1-12pp.

Hawkes J.G. y Hjerting J.P. (1969). The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay; a biosystematic study. En: Oxford University Press. 525pp.

Haynes K.G., Haynes F.L. y Swallow W.H. (1987). Variability of flowering and 2n pollen production in diploid potatoes under high temperatures. *American Potato Journal*, 64(1): 35 – 40.

- Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45(3): 115 – 120.
- Jacob Y. y Pierret V. (2000). Pollen size and ploidy level in the genus *Rosa*. *Acta Horticulturae*, 508: 289 – 292.
- Jansky S. (2006). Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*, 125(1): 1 – 12.
- Johnston S.A. y Hanneman R.E. (1982). Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science*, 217(4558): 446 – 448.
- Larrosa F.H., Maune J.F., Erazzú L.E. y Camadro E.L. (2012). Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. *Plant Biology*, 14(1): 223 – 233.
- Mandujano Sanchez M.C. (2007). La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En: Introducción a la Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México DF. pp: 215 – 244.
- Masuelli R.W. (1990). Gametos $2n$ y poliploidización sexual en la especie silvestre de papa *Solanum commersonii* Dun. Tesis M.Sc. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 54p.
- Masuelli W., Camadro E.L. y Mendiburu A.O. (1992). $2n$ gametes in *Solanum commersonii* and cytological mechanisms of triplandroid formation in triploid hybrids of *Solanum commersonii* × *Solanum gourlayi*. *Genome*, 35(5): 864 – 869.
- Mendiburu A.O. y Peloquin S.J. (1977). The significance of $2n$ gametes in potato breeding. *Theoretical Applied Genetics*, 49(2): 53 – 61.

- Mok D.W. y Peloquin S.J. (1975a). Three mechanisms of $2n$ pollen formation in diploid potatoes. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 17(2): 217 – 225.
- Mok D.W. y Peloquin S.J. (1975b). The inheritance of three mechanisms of diplandroid ($2n$ pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity*, 35(3): 295 – 302.
- Mok D.W., Peloquin S.J. y Tarn T.R. (1975). Cytology of potato triploids producing $2n$ pollen. *American Potato Journal*, 52(6): 171 – 174.
- Oliveira L.G., Alonso A., Salgado C.C., Davide L.C. y Pintos C.A. (2009). $2n$ pollen and meiotic mechanisms of formation in *Solanum commersonii* ssp. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(2): 473 – 477.
- Orjeda G., Freyre R. y Iwanaga M. (1990). Production of $2n$ pollen in diploid *Ipomoea trifida*, a putative wild ancestor of the sweet potato. *Journal of Heredity*, 81(6): 462 – 467.
- Owen H.R., Veilleux R.E., Haynes F.L. y Haynes K.G. (1988). Photoperiod effects on $2n$ pollen production, response to anther culture, and net photosynthesis of a diplandrous clone of *Solanum phureja*. *American Potato Journal*, 65(3), 131 – 139.
- Pandolfi V. (1998). Microsporogenese em *Solanum commersonii*. Tesis M. Sc. Universidad Federal de Pelotas, Brasil. 82p.
- Quinn A., Mok D.W.S. y Peloquin S.J. (1974). Distribution and significance of diplandroids among the diploid *Solanum*. *American Potato Journal*, 51(1): 16 – 21.
- Ramanna M.S. (1974). The origin of unreduced microspores due to aberrant cytokinesis in the meiocytes of potato and its genetic significance. *Euphytica*, 23(1): 20 – 30.

- Ramanna M.S. (1983). First division restitution gametes through fertile desynaptic mutants of potato. *Euphytica*, 32(2): 337 – 350.
- Ramsey J. y Schemske D.W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 29(1): 467 – 501.
- Sora D., Kron P. y Husband B.C. (2016). Genetic and environmental determinants of unreduced gamete production in *Brassica napus*, *Sinapis arvensis* and their hybrids. *Heredity*, 117(6): 440 – 448.
- Souter E.W., Dawe J.C. y Peloquin S.J. (1980). 2n pollen formation via parallel spindles in the potato cultivar Sebago. *American Potato Journal*, 57(9): 449 – 454.
- Sybenga J. (1975). Meiotic Configurations. En: Monographs on Theoretical and Applied Genetics 1, New York, Springer – Verlag, 251 pp.
- Tarn T.R. y Hawkes J.G. (1986). Cytogenetic studies and the occurrence of triploidy in the wild potato species *Solanum commersonii* Dun. *Euphytica*, 35(1): 293 – 302.
- Traas J.A., Burgain S. y Dumas de Vaulx R. (1989). The organization of the cytoskeleton during meiosis in eggplant (*Solanum melongena* (L.)): microtubules and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. *Journal of Cell Science*, 92(4): 541 – 550.
- Veilleux R. (1983). Diploid and polyploid gametes in crop plants: Mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 3: 253 – 288.
- Veilleux R.E. y Lauer F.I. (1981). Variation for 2n pollen production in clones of *Solanum phureja* Juz. and Buk. *Theoretical Applied Genetics*, 59(2): 95 – 100.

Veilleux R.E., McHale N.A. y Lauer F.I. (1982). 2n gametes in diploid *Solanum*: frequency and types of spindle abnormalities. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 24(3): 301 – 314.

Wang R.C., Liang G.H. y Heyne E.G. (1977). Effectiveness of ph gene in inducing homoeologous chromosome pairing in *Agroticum*. *Theoretical Applied Genetics*, 51(3): 139 – 142.

Watanabe K. y Peloquin S.J. (1993). Cytological basis of 2n pollen formation in a wide range of 2x, 4x, and 6x taxa from tuber-bearing *Solanum* species. *Genome*, 36(1): 8 – 13.

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Solanum commersonii es una especie de amplia distribución en Argentina, Uruguay y Brasil. Crece en una amplia diversidad de hábitats y posee tolerancia a estreses bióticos y abióticos, de gran importancia para su utilización en el mejoramiento genético de la papa (*Solanum tuberosum*). Para su uso, es necesario evaluar la diversidad genética presente en poblaciones naturales y conocer cómo se distribuye.

Dado que esta especie presenta citotipos diploides y triploides, se identificaron poblaciones naturales integradas por individuos diploides (2x), triploides (3x) y mezcla de ambos niveles de ploidía mediante citometría de flujo. En los individuos muestreados de estas poblaciones fue posible constatar la producción de polen no reducido (2n) y mediante estudios citológicos se identificó uno de los mecanismos propuestos para su formación, los husos paralelos durante meiosis II. No se encontró una relación directa entre la cantidad de husos paralelos detectados con la frecuencia de gametos 2n. Para obtener dichos valores sólo se documentó metafase II, con lo cual podrían estar subestimados. En próximos estudios se debería analizar tanto metafase como anafase II. Otra explicación podría ser la forma en que se realizaron los aplastados, ocasionando que el ángulo de los husos obtenido no sea el real biológico y que se tergiverse la observación en la foto del ángulo en el que están. También sería interesante continuar su análisis empleando otras técnicas, como por ejemplo tinción de los husos meióticos y microtúbulos, para comprender cómo es su funcionamiento durante la división celular.

La presencia de polen no reducidos podría permitir el flujo génico con especies con diferentes valores de EBN como por ejemplo *Solanum chacoense*, lo cual sería interesante evaluar mediante cruzamientos dirigidos. Además, se ha sugerido que formas atípicas o intermedias que no se corresponden con los grupos genéticos identificados para *S. commersonii*

y *S. chacoense* podrían ser híbridos interespecíficos. Los análisis citológicos en la planta SS3cmm15 podrían indicar que se trata de un híbrido, debido a los altos valores de puentes en anafase I en comparación con los demás individuos. Su condición híbrida deberá ser analizada mediante el uso de marcadores moleculares. Sin embargo, se trata de una planta diploide y siguiendo la teoría del EBN esperaríamos que los híbridos entre estas dos especies fueran 3x. Observaciones preliminares indican que los individuos 3x colectados tienen formas intermedias entre las dos especies, si bien con los marcadores utilizados en este trabajo no se separaron de los individuos diploides de sus mismas poblaciones. Se están realizando nuevas colectas en base a los criterios propuestos en este trabajo. Además, se está sistematizando la descripción morfológica de los individuos y se espera utilizar mayor número de marcadores SSR. También esperamos contar con alelos de estos marcadores que sean específicos de *S. chacoense* identificados a partir de los individuos estándares de Argentina. Esta combinación de estrategias permitirá arrojar luz sobre el origen de los individuos triploides de poblaciones naturales.

La utilización de marcadores moleculares SSRs también permitió avanzar en el estudio de la diversidad genética de las poblaciones naturales. Por un lado, el análisis de coordenadas principales no evidenció una estructura poblacional determinada, salvo la separación de las poblaciones del litoral y el sur. También es necesario tener en cuenta que las poblaciones del litoral aún deben analizarse en mayor detalle debido a que su morfología atípica las relaciona con *Solanum chacoense*. Asimismo, se identificó que las poblaciones se encuentran formadas por pocos clones y algunas sólo por uno, independientemente de si estaban constituidas por individuos 2x o 3x.

Debido a que *S. commersonii* presenta propagación vegetativa, los estudios de la diversidad genética deben tener en cuenta la distribución de los ramets para la forma en la cual se realizan las colectas. Observamos que los mismos tienden a agregarse, algo que no fue previamente reportado y que

se debe considerar si se quiere capturar la mayor diversidad posible. En esta tesis se sugiere una estrategia de muestreo teniendo en cuenta que los ramet estén separados entre sí por lo menos unos 50 m y en lo posible identificar visualmente hasta dónde se extiende cada ramet. Se debe considerar además que en el caso que la población a coleccionar se ubique cerca de un camino con tránsito y trabajos de movimiento de tierra, se puede sobreestimar la dispersión de los ramets y que si existe una barrera que separe una población, nuestros datos sugieren recolectar de ambos lados, ya que podrían tratarse de clones diferentes.

5 BIBLIOGRAFÍA

Alonso A, Salgado CC, Pereira CA, Davide LC, Oliveira LG. 2007. Pollen viability and meiotic analysis of *Solanum commersonii commersonii* Dun., *Solanum commersonii malmeanum* Bitt. and *Solanum tuberosum* L. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 7(4): 387 – 393.

Altmann T, Damm B, Frommer WB, Martin T, Morris PC, Schweizer D, Willmitzer L, Schmidt R. 1994. Easy determination of ploidy level in *Arabidopsis thaliana* plants by means of pollen size measurement. Plant Cell Reports, 13(11): 652 – 656.

Beaulieu JM, Leitch IJ, Patel S, Pendharkar A, Knight CA. 2008. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. New Phytologist, 179(4): 975 – 986.

Bonamico N, Aiassa J, Ibañez M, Di Renzo M, Díaz D, Salerno J. 2004. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 33(2): 129 – 144.

Bretagnolle F, Thompson JD. 1995. Gametes with somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. New Phytologist, 129(1): 1 – 22.

Camadro EL, Mendiburu AO. 1988. Utilización de germoplasma en el mejoramiento de la papa. Revista Latinoamericana de la Papa, 1(1): 35 – 43.

Camadro EL, Ortiz R, Iwanaga M. 1993. Control genético de la producción de polen 2n por "husos paralelos" en papas diploides. Revista Latinoamericana de la Papa, 5(6): 20 – 29.

Camadro EL, Peloquin SJ. 1980. The occurrence and frequency of 2n pollen in three diploid *Solanum* from Northwest Argentina. *Theoretical Applied Genetics*, 56(1-2): 11 – 15.

Carrillo-Angeles IG, Mandujano MDC. 2011. Patrones de distribución espacial en plantas clonales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 89: 1 – 18.

Chase SS. 1963. Analytic breeding in *Solanum tuberosum* L. A scheme utilizing parthenotes and other diploid stocks. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 5(4): 359 – 363.

Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2):169 – 196.

Correll, D. S. 1962. The potato and its wild relatives: section Tuberarium of the genus *Solanum*. Texas Research Foundation, Renner, TX

De Storme N, Geelen D. 2013. Cytokinesis in plant male meiosis. *Plant Signaling and Behavior*, 8(3): 1 –9.

Den Nijs TP, Peloquin SJ. 1977. 2n gametes in potato species and their function in sexual polyploidization. *Euphytica*, 26(3): 585 – 600.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 5(6): 435 – 445.

Feingold SE, Lloyd J, Norero N, Bonierbale M, Lorenzen J. 2005. Map location and diversity values for new potato SSRs developed from EST databases. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 456 – 466.

Freeland Jr. 2005. Molecular markers in ecology. En: Molecular Ecology, Kirk, London, Wiley-Blackwell, 11-62pp.

Genuardo G, Errico A, Tiezzi A, Conicella C. 1998. α -tubulin and F-actin distribution during microsporogenesis in a 2n pollen producer of *Solanum*. Genome, 41(5): 636 – 641.

Ghislain M, Núñez J, Herrera M, Pignataro J, Guzman F, Bonierbale M, Spooner DM. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. Molecular Breeding. 23(3): 377 – 388.

Ghislain M, Spooner DM, Rodríguez F, Villamón F, Núñez J, Vásquez C, Waugh R, Bonierbale M. 2004. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. Theoretical and Applied Genetics, 108(5): 881 – 890.

Gould FW. 1957. Pollen size as related of polyploidy and speciation in the *Andropogon saccharoides*-*A. barbinodis* complex. Brittonia, 9(2): 71 – 75.

Hanneman RE, Bamberg JB. 1986. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. Research Division, College of Agricultural and Life Sciences. University of Wisconsin, EEUU. 216pp.

Harlan JR, de Wet JM. 1975. On Ö. Winge and a prayer: The origins of polyploidy. The Botanical Review, 41(4): 361 – 390.

Hastings, A. 1996. Population Genetics. En: Population biology: concepts and models, Hastings, New York, Springer-Verlag. 219pp.

Hawkes JG. 1990. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. *American Potato Journal*, 67(10): 733 – 735.

Hermesen JG. 1984. Mechanisms and genetic implications of 2n-gamete formation. *Iowa State Journal of Research*, 58: 421 – 434.

Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45(3): 115 – 120.

Höglund M. 1970. Meiosis in *Solanum phureja*. *Hereditas*, 66(2): 183 – 188.

Hormaza JI, Herrero M. 1999. Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma*, 208(1-4): 129 – 135.

Iwanaga M. 1984. Discovery of a synaptic mutant in potato haploids and its usefulness for potato breeding. *Theoretical Applied Genetics*, 68(1-2): 87 – 93.

Johnston SA, Hanneman RE. 1980. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *American Potato Journal*, 57(1): 7 – 14.

Johnston SA, Hanneman RE. 1982. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science*, 217(4558): 446 – 448.

Johnston SA, Ruhde RW, Ehlenfeldt MK, Hanneman RE. 1986. Inheritance and microsporogenesis of a synaptic mutant (sy-2) from *Solanum*

commersonii Dun. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 28(4): 520 – 524.

Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sale C. Van Wiel, Bredemeijer C, Buianti M, Maestri E, Malcevshi A, Marmioli N, Aert R, Volckaet G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding, 3(5): 381 – 390.

Kayser M, Ritter H, Bercovitch F, Mrug M, Roewer L, Nurnberg P. 1996. Identification of highly polymorphic microsatellites in the rhesus macaque *Macaca mulatta* by cross species amplification. Molecular Ecology, 5(1): 157 – 159.

Lam S. 1974. Origin and formation of unreduced gametes in the potato. The Journal of Heredity, 65(3): 175 – 178.

Mandujano Sanchez MC. 2007. La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En: Introducción a la Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México DF. pp: 215 – 244.

McCormick S. 2004. Control of male gametophyte development. The Plant Cell, 16(1): 142 – 153.

Mendiburu AO, Peloquin SJ. 1977. The significance of 2n gametes in potato breeding. Theoretical Applied Genetics, 49(2): 53 – 61.

Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. Molecular Genetics, 259: 233 – 245.

Mok DW, Peloquin SJ. 1975a. Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 17(2): 217 – 225.

Mok DW, Peloquin SJ. 1975b. The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity*, 35(3): 295 – 302.

Nikkanen T, Aronen T, Häggman H, Venäläinen M. 2000. Variation in pollen viability among *Picea abies* genotypes –potential for unequal paternal success. *Theoretical Applied Genetics*, 101(4): 511 – 518.

Orjeda G, Freyre R, Iwanaga M. 1990. Production of 2n pollen in diploid *Ipomoea trifida*, a putative wild ancestor of the sweet potato. *Journal of Heredity*, 81(6): 462 – 467.

Palta J, Chen H, Li P. 1981. Relationship between Heat and Frost Resistance of Tuber-Bearing *Solanum* Species: Effect of Cold Acclimation on Heat Resistance. *Botanical Gazette*, 142(3), 311 – 315.

Peloquin SJ, Boiteaux LS, Carputo D. 1999. Meiotic mutants in potato: valuable variants. *Genetics*, 153(4): 1493 – 1499.

Peloquin SJ, Yerk GL, Werner JE, Darmo E. 1989. Potato breeding with haploids and 2n gametes. *Genome*, 31(2): 1001 – 1004.

Quinn A, Mok DWS, Peloquin SJ. 1974. Distribution and significance of diplandroids among the diploid *Solanum*. *American Potato Journal*, 51(1): 16 – 21.

Ramanna MS. 1974. The origin of unreduced microspores due to aberrant cytokinesis in the meiocytes of potato and its genetic significance. *Euphytica*, 23(1): 20 – 30.

Ramanna MS. 1983. First division restitution gametes through fertile desynaptic mutants of potato. *Euphytica*, 32(2): 337 – 350.

Ramanna MS, Jacobsen E. 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - A review. *Euphytica*, 133(1): 3 – 18.

Schneider K, Douches D. 1997. Assessment of PCR based sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *American Potato Journal* 74:149 – 160.

Sevilla R, Holle M. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Perú, Luis León Asociados,.445pp.

Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139(1): 457 – 462.

Souter EW, Dawe JC, Peloquin SJ. 1980. 2n pollen formation via parallel spindles in the potato cultivar Sebago. *American Potato Journal*, 57(9): 449 – 454.

Spooner DM, Núñez J, Trujillo G, Herrera M, Guzmán F, Ghislain M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *PNAS*, 104(49): 19398 – 19403.

Stone JL, Thomson JD, Dent-Acosta SJ. 1995. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: A Review. *American Journal of Botany*, 82(9): 1186 – 1197.

Tarn TR, Hawkes JG. 1986. Cytogenetic studies and the occurrence of triploidy in the wild potato species *Solanum commersonii* Dun. *Euphytica*, 35(1): 293 – 302.

Traas JA, Burgain S, Dumas de Vaulx R. 1989. The organization of the cytoskeleton during meiosis in eggplant (*Solanum melongena* (L.)): microtubules and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. *Journal of Cell Science*, 92(4): 541 – 550.

Van Os H, Andrzejewski S, Bakker E, Barrena I, Bryan GJ, Caromel B, Ghareeb B, Isidore E, de Jong W, van Koert P, Lefebvre V, Milbourne D, Ritter E, van der Voort J, Rousselle-Bourgeois F, van Vliet J, Waugh R, Visser RGF, Bakker J, van Eck HJ. 2006. Construction of a 10,000-marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genome wide physical map. *Genetics*, 173(2): 1075 – 1087.

Veilleux R. 1983. Diploid and polyploid gametes in crop plants: Mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 3: 253 – 288.

Veilleux RE, McHale NA, Lauer FI. 1982. 2n gametes in diploid *Solanum*: frequency and types of spindle abnormalities. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 24(3): 301 – 314.

Watanabe K, Peloquin SJ. 1993. Cytological basis of $2n$ pollen formation in a wide range of $2x$, $4x$, and $6x$ taxa from tuber-bearing *Solanum* species. *Genome*, 36(1): 8 – 13.

Zhang DX, Hewitt GM. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3): 563 – 584.

Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Brondani C, Vencovsky R. 2002. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Molecular Ecology Resources*, 2(4): 512 – 513.